



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UnB  
CURSO DE FARMÁCIA**

**BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do grau de Bacharel  
em Farmácia, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP896a Prado, Bruno  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS / Bruno Prado; orientadora Daniela Orsi. -- Brasília, 2019.  
71 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. própolis verde. 2. própolis marrom. 3. própolis vermelha. 4. atividade antioxidante. 5. Concentração Bactericida Mínima. I. Orsi, Daniela, orient. II. Título.

BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

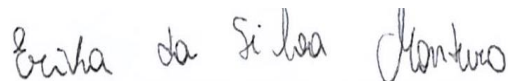
(FCE/ Universidade de Brasília)



---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

(FCE/ Universidade de Brasília)



---

Mestranda Erika da Silva Monteiro

(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro a Deus, a força maior que comanda o universo e nossas vidas. Agradeço por sempre ter me dado saúde e animo para seguir em frente.

Agradeço aos meus pais, que eu os amo, sempre me incentivaram e mostraram a importância dos estudos na vida.

Agradeço a Universidade de Brasília, essa instituição maravilhosa que tem a missão de gerar o conhecimento e que tenho muito orgulho de ter sido estudante.

Agradeço a todos que contribuem para o funcionamento da Universidade, desde aos empregados da limpeza até os servidores.

Agradeço a todos os professores que compartilharam seus conhecimentos para a minha formação.

E por fim, agradeço imensamente pela orientação recebida, a minha orientadora a professora Dra. Daniela Castilho Orsi, simplesmente melhor orientadora e professora da Universidade, sempre disposta a passar seus conhecimentos.

## RESUMO

No presente estudo foi realizada a caracterização físico-química e determinação da atividade antimicrobiana de seis extratos comerciais de própolis brasileiras. Os extratos de própolis marrom e verdes apresentaram de 12,22-13,36% de extrato seco e se enquadraram nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira (mínimo de 11%), indicando que foram elaborados com no mínimo 30% de própolis *in natura*. Esses extratos de própolis (verdes e marrom) apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos (1,54-1,86%) em comparação com o extrato de própolis vermelha. A própolis vermelha apresentou um menor teor de compostos fenólicos (0,86%) devido ao baixo teor de extrato seco (7,90%). E o extrato de própolis verde elaborado com 70% de própolis apresentou um maior teor de compostos fenólicos (4,48%) devido ao elevado teor de extrato seco (24,03%). Foi encontrada uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de própolis. O extrato elaborado com 70% de própolis apresentou a maior capacidade antioxidante (DPPH 349,70 mM trolox e ABTS 449,46 mM trolox) enquanto o extrato de própolis vermelha apresentou a menor atividade antioxidante (DPPH 53,96 mM trolox e ABTS 186,83 mM trolox). No ensaio por disco difusão todos os extratos de própolis testados apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas testadas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos Gram negativos testados. A própolis vermelha que apresentou o menor valor de extrato seco e fenólicos totais, mostrou os melhores resultados para o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM). A bactéria *B. cereus* mostrou-se mais sensível aos efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis em relação as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*. A CBM do *B. cereus* variou de 3 a 9 mg/mL para os extratos de própolis vermelha, verdes e marrom. As propriedades biológicas da própolis estão ligadas à sua composição, que varia de acordo com a flora visitada pelas abelhas e o período de coleta das resinas. Apesar de a CBM variar bastante entre os diferentes extratos de própolis, pode-se constatar que as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans* apresentam-se sensíveis a própolis, que tem efeito bactericida sobre essas bactérias.

**Palavras-chave:** própolis verde, própolis marrom, própolis vermelha, atividade antioxidante, compostos fenólicos, Concentração Bactericida Mínima.

## ABSTRACT

In the present study the physical-chemical characterization and determination of the antimicrobial activity of six commercial extracts of Brazilian propolis were carried out. The extracts of brown and green propolis presented 12.22-13.36% of dry extract and were within the parameters required by Brazilian legislation (minimum of 11%), indicating that they were made with at least 30% of propolis *in natura*. These extracts of propolis (green and brown) presented higher value of phenolic compounds (1.54-1.86%) in comparison to the extract of red propolis. Red propolis had a lower content of phenolic compounds (0.86%) due to the low content of dry extract (7.90%). And the green propolis extract prepared with 70% of propolis presented a higher content of phenolic compounds (4.48%) due to the high content of dry extract (24.03%). A positive correlation was found between the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of the propolis extracts. The extract prepared with 70% of propolis presented the highest antioxidant capacity (DPPH 349.70 mM trolox and ABTS 449.46 mM trolox) while the red propolis extract showed the lowest antioxidant activity (DPPH 53.96 mM trolox and ABTS 186, 83 mM trolox). In the disc diffusion assay all the propolis extracts tested showed antimicrobial activity for the Gram-positive bacteria tested (*S. aureus*, *B. cereus* and *S. mutans*). However, there was no antimicrobial activity for the Gram-negative microorganisms tested. The red propolis that presented the lowest value of dry extract and total phenolics, showed the best results for the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test. The bacterium *B. cereus* showed to be more sensitive to the antimicrobial effects of the extracts of propolis in relation to the bacteria *S. aureus* and *S. mutans*. The MBC of *B. cereus* ranged from 3 to 9 mg/mL for extracts of red, green and brown propolis. The biological properties of propolis are related to its composition, which varies according to the flora visited by the bees and the period of collection of the resins. Although the MBC varies widely among the different propolis extracts, it can be observed that the bacteria *S. aureus*, *B. cereus* and *S. mutans* are susceptible to propolis, which has a bactericidal effect on these bacteria

**Keywords:** green propolis, brown propolis, red propolis, antioxidant activity, phenolic compounds, Minimum Bactericidal Concentration



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análises físico-químicas dos extratos de própolis.....	28
<b>Tabela 2.</b> Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis.....	32
<b>Tabela 3.</b> Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis.....	34

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b> - Testes de CMB dos extratos de própolis.....	51
<b>ANEXO 2</b> - NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)
- ATCC - American Type Culture Collection
- ATP – Adenosina trifosfato
- BHT – Hidroxitolueno butilado
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- COX - Cicloxigenase
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPPH - 2,2- difenil-1-picril-hidrazil
- EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
- HEp-2 – Células de carcinoma epidermóide de laringe humana
- HSV – Herpes-vírus simples
- IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%
- IL-1 $\beta$  – Interleucina um beta
- IL-6 – Interleucina 6
- LB – Luria Bertani
- LOX - Lipoxigenase
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear kappa beta
- PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A2
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- TISTR – Thailand Institute of Scientific and Technological Research
- TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa
- UFC – Unidade formadora de colônia

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$  - Micromolar

g – gramas

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

mg - Milegrama

mL - mililitros

mm – milímetros

mM - Milimolar

$^{\circ}\text{C}$  - grau Celsius

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Definição de própolis e características das própolis brasileiras .....	13
1.1.1 Composição química da própolis .....	13
1.1.2 Tipos de própolis brasileiras .....	14
1.2 Usos da própolis (antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano) .....	16
1.2.1 Potencial antioxidante .....	17
1.2.2 Atividade antimicrobiana .....	18
1.2.3 Atividade anti-inflamatória .....	19
1.2.4 Outras propriedades biológicas da própolis .....	20
1.3 Legislação brasileira .....	21
1.4 Própolis como antimicrobiano natural e o problema da resistência aos antimicrobianos.....	22
2. OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
3. JUSTIFICATIVA .....	24
4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO .....	25
RESUMO.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
5.1 Amostras.....	29
5.2 Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco .....	29
5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo .....	30
5.4 Análises físico-químicas dos extratos de própolis .....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO .....	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	50
10. ANEXOS .....	56
ANEXO 1 – Testes de CMB dos extratos de própolis.....	56
ANEXO 2- NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO .....	65

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Definição de própolis e características das própolis brasileiras**

A própolis é um produto natural, produzido pelas abelhas, de composição química complexa e aspecto resinoso. As abelhas misturam enzimas salivares, cera, pólen e vários tecidos vegetais coletados para a produção de própolis (BAYRAM et al., 2018; SFORCIN e BANKOVA, 2011). A Instrução Normativa nº 03, de 19/07/2001 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) define própolis como um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas por abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas, acrescentadas às secreções salivares, enzimas, cera e pólen (BRASIL, 2001).

Uma das principais funções da própolis é conferir proteção à colmeia (SFORCIN e BANKOVA, 2011). As abelhas utilizam a própolis para reparos estruturais da colmeia, oclusão de fendas, isolamento térmico e como barreira de proteção à invasão de insetos e/ou animais. Por suas propriedades antisséptica e antimicrobiana, a própolis confere proteção à colmeia contra bactérias, fungos e parasitas. Devido ao seu caráter resinoso, a própolis também é empregada para embalsamar intrusos que invadiram a colmeia, evitando a sua decomposição e mantendo a integridade da população de abelhas e da prole (SALATINO et al., 2011; SFORCIN, 2016; WAGH, 2013).

#### **1.1.1 Composição química da própolis**

A própolis possui uma natureza lipofílica, sendo dura e quebradiça quando fria e maleável e pegajosa quando aquecida, possui aroma agradável e sua coloração pode ser distinta a depender de sua origem botânica (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). A composição química da própolis é variada e mais de 300 compostos já foram identificados incluindo compostos fenólicos, terpenos e ácidos orgânicos (SUN et al., 2015). A própolis também contém outros constituintes como óleos voláteis, cera de abelha, naftaleno e componentes como vitaminas, minerais, proteínas, aminoácidos, beta-esteróis, álcoois, açúcares e

algumas enzimas glandulares das abelhas (KUREK-GÓRECKA et al., 2014; TIVERON et al., 2016).

A constituição bruta da própolis é de, aproximadamente, 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de impurezas e artefatos. A área geográfica, condições climáticas, sazonalidade, período da coleta e altitude influenciam na composição química e variedade das própolis (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

De acordo com Sforcin e Bankova (2011), “mesmo sendo de origem vegetal, a própolis é um produto de diferentes ecossistemas, as abelhas coletam material de diferentes plantas escolhendo o representante apropriado da flora local”. Com isso há uma variedade de própolis de acordo com a flora da região geográfica onde as abelhas coletam o material vegetal para a sua produção. A composição intrínseca da própolis depende das fontes vegetais de diferentes regiões geográficas e muitos tipos de própolis já foram reportados (LÓPEZ et al., 2014).

### **1.1.2 Tipos de própolis brasileiras**

Os tipos de própolis mais difundidos mundialmente são: verde, vermelha, marrom, álamo, bétula, própolis do Mediterrâneo, clusia, própolis do Pacífico, própolis do Egito, própolis da Tunísia e própolis iraniana, todas distintas em origem vegetal e geográfica (BENHANIFIA e MOHAMED, 2015; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018). Em países de dimensões continentais e de grande biodiversidade como o Brasil é possível identificar distintos tipos de própolis como verde, vermelha e marrom (MACHADO et al., 2016).

A própolis verde brasileira é muito estudada e sua origem vegetal predominante é a *Baccharis Dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018), sendo amplamente distribuída pela região sudeste do Brasil e se estendendo para áreas da Argentina e do Uruguai (LÓPEZ et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

Kumazawa et al. (2003), observaram o comportamento das abelhas operárias de colmeias localizadas no estado de Minas Gerais a fim de constatar a origem vegetal do material coletado. Verificou-se que o material foi coletado de resinas do ápice vegetativo da *Baccharis Dracunculifolia* e levado à colmeia para a produção da

própolis verde. O extrato etanólico dessa própolis foi comparado com o extrato etanólico de *Baccharis Dracunculifolia* e não houve diferenças no perfil cromatográfico dos extratos. Nascimento et al. (2008), isolaram o composto 3-prenilcinâmico, detectado por cromatografia gasosa, e o apresentaram como marcador químico volátil do alecrim do campo. Esse composto esteve presente em concentrações consideráveis no extrato de alecrim do campo e nos extratos de própolis verdes provenientes dessas regiões em que há a *Baccharis Dracunculifolia*. Própolis provenientes de regiões sem o alecrim do campo não apresentaram esse marcador químico.

A própolis verde é rica em compostos prenilados, não-prenilados e ácido p-cumárico como artepilin C, sendo estes compostos também encontrados na *Baccharis Dracunculifolia*. Muitas propriedades farmacológicas são atribuídas à própolis verde, como antibacteriana, antitumoral e antioxidante e segundo alguns estudos os níveis elevados de artepilin C e ácido p-cinâmico são responsáveis por grande parte de suas atividades biológicas (SALATINO et al., 2011; VEIGA et al., 2017). Machado et al. (2016) analisaram a composição química de oito amostras de diferentes tipos de própolis brasileiras (verde, vermelha e marrom) e os marcadores artepilin C e ácido p-cinâmico estavam presentes em elevadas concentrações em todos os extratos de própolis verdes.

A própolis vermelha foi recentemente descoberta no Brasil e ela é encontrada em colmeias localizadas em troncos de arbustos de manguezais e ao longo da costa da região nordeste, em especial nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco. Sua origem botânica foi atribuída principalmente a *Dalbergia ecastophyllum* e foi observado que as abelhas coletam o exsudato de coloração vermelha dessa planta conhecida por nome popular como marmeleiro da praia ou rabo-de-bugio. Amostras do exsudato dessa planta e de extratos de própolis vermelhas foram comparadas revelando o mesmo perfil cromatográfico entre ambos (LOPES et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

A própolis vermelha possui uma rica composição química incluindo terpenos, pterocarpanas, benzofenonas preniladas e principalmente flavonoides (RUFATTO et al., 2017). Dentre as própolis verdes, vermelhas e marrons, a própolis vermelha é que revelou maior potencial antioxidante devido, principalmente, aos compostos fenólicos. Compostos como viz acetina, artepilin C, ácido gálico, isoramnetina, ácido

protocatecuico, vanilina e ácido vanílico foram encontrados na própolis vermelha (ANDRADE et al., 2017). A própolis vermelha exibe ampla atividade biológica como antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória. Substâncias de sua composição são promissoras no desenvolvimento de novos fármacos com benefícios clínicos e comerciais (PONTES et al., 2018).

A própolis marrom apresenta origem botânica variada que ainda não está bem definida (BITTENCOUT et al., 2015). O estudo de Park et al. (2002), indicou que um tipo de própolis marrom produzida principalmente no nordeste brasileiro tem como origem botânica principal as folhas de *Hyptis divaricata*. Fernandes et al. (2014) reportaram um estudo com própolis marrom coletada do Cerrado brasileiro. Segundo Castro et al. (2009), a própolis marrom é caracterizada pela baixa concentração de flavonoides e presença elevada de ácidos graxos (oleato, palmitato, linoleato e estearato) e possui atividade bacteriostática. No entanto, Gomes et al. (2016) concluíram que a própolis marrom coletada no estado do Mato Grosso do Sul apresentou atividade bactericida contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de processos infecciosos de animais.

## **1.2 Usos da própolis (antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano)**

A própolis é extensivamente utilizada na medicina popular e seu uso é conhecido desde os tempos remotos por povos antigos, sendo empregada para o tratamento de queimaduras, feridas, usada como antisséptico, cicatrizante, desinfetante bucal e como agente antipirético. É amplamente consumida pelos japoneses, sendo atualmente considerada um produto de propriedades farmacológicas promissoras e com baixa toxicidade. A própolis é incorporada em cosméticos e formulações diversas para tratar várias doenças na medicina popular (ANDRADE et al., 2017; SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015; WAGH, 2013).

As propriedades medicinais e terapêuticas da própolis contribuíram para seu uso empírico na medicina popular tradicional. Vários estudos surgiram a fim de verificar e comprovar seus efeitos terapêuticos e farmacológicos. Machado et al. (2016) realizaram a caracterização química, capacidade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral de vários tipos de própolis brasileiras e Tiveron et al. (2011) avaliaram



o perfil antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório de diferentes extratos de própolis provenientes da região sul do Brasil.

### **1.2.1 Potencial antioxidante**

A oxidação de sistemas biológicos, oriunda de processos metabólicos e fisiológicos normais produz radicais livres que se apresentam, principalmente, na forma de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Um desequilíbrio a favor destes radicais livres diante dos mecanismos antioxidantes dos sistemas biológicos gera uma condição de estresse oxidativo, que está associado à patogênese de muitas doenças (KUREK-GORECKA et al., 2014).

Uma das propriedades biológicas mais exploradas da própolis é o seu potencial antioxidante. Dentre os produtos apícolas, a própolis se destaca por possuir o maior potencial antioxidante, sendo essa propriedade atribuída à sua variada composição química. Devido a sua alta atividade antioxidante, supõe-se que a própolis possua efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo, reduzindo o efeito tóxico dos radicais livres (NAKAJIMA et al., 2009).

A atividade antioxidante da própolis é resultante, principalmente, da presença de compostos fenólicos e flavonoides em sua composição (SILVA et al., 2018). Tendo em vista a complexa composição química da própolis foram isolados compostos para verificar sua atividade biológica. Compostos isolados como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, conhecido como Artepilin C são um dos principais componentes com atividade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana e imunomoduladora (VEIGA et al., 2017).

Kunrath et al. (2017) caracterizaram a atividade antioxidante de um extrato de própolis coletado no estado do Paraná e o aplicaram na elaboração de salame tipo italiano, comparando a sua ação antioxidante com um antioxidante sintético (BHT). Na caracterização, o extrato de própolis apresentou baixo teor de compostos fenólicos e flavonoides e, ainda assim, foram obtidos resultados antioxidantes próximos ao do composto sintético. Assim a própolis pode ser empregada como antioxidante natural em alimentos. Nascimento et al. (2009) incorporaram extratos de própolis verde e vermelha em formulações de protetores solares e obtiveram a intensificação da proteção solar com a incorporação dos extratos.

### 1.2.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da própolis é amplamente estudada. Os compostos responsáveis por sua ação antimicrobiana são os flavonoides, terpenos e ácidos orgânicos, no entanto seu mecanismo de ação não está ainda totalmente elucidado. Acredita-se que os compostos da própolis atuam de forma sinérgica e afetam a permeabilidade da membrana das bactérias aos íons, levando a uma diferença de potencial que implica na redução da síntese de ATP, transporte iônico e motilidade, uma vez que estes fatores são cruciais na viabilidade do microrganismo (SFORCIN, 2016; FIGUEREDO et al., 2014).

Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação da própolis do que as Gram-negativas (NASCIMENTO et al., 2013). A parede celular de bactéria Gram-positiva é mais permeável, o que facilita a penetração de compostos que alteram a permeabilidade da membrana. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular quimicamente constituída de lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas, dificultando a penetração e atuação dos compostos da própolis (ABUBAKAR et al., 2014; BENHANIFIA e MOHAMED, 2015).

Machado et al. (2016) testaram extratos de própolis verde, vermelha e marrom frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Todos os extratos apresentaram maior atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva). Silva et al. (2017) avaliaram a atividade antibacteriana, também de extratos de própolis verde, vermelha e marrom contra cepas ATCC de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp.), bactérias Gram-negativas (*Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*) e levedura *Candida albicans*. Somente foi observada atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas, não havendo atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas e para *Candida albicans*. Os autores ainda relataram que a própolis vermelha obteve melhor atividade antimicrobiana do que a própolis verde e que a própolis marrom não apresentou atividade antimicrobiana.

Já no estudo Freires et al. (2016) os extratos de própolis brasileiras apresentaram atividade antifúngica contra *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Al-Daamy et al. (2015)

mostraram a atividade da própolis contra fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* (fungos dermatófitos) e *Candida albicans*.

A própolis é capaz de potencializar o efeito dos antimicrobianos quando em associação com estes. Orsi et al. (2012) investigaram, in vitro, o sinergismo entre própolis e antimicrobianos com mecanismo de ação no ribossomo (cloranfenicol, tetraciclina e neomicina) frente a bactéria Gram-negativa *Salmonella Typhi*. O resultado revelou que a própolis foi capaz de diminuir a resistência bacteriana aos antimicrobianos, bem como atuou em sinergismo com os antimicrobianos. Scazzocchio et al. (2006) testaram a atividade antimicrobiana in vitro da própolis frente a 263 cepas Gram-positivas de isolados clínicos. Além de obter inibição bacteriana com o extrato de própolis, a sua associação com antimicrobianos intensificou a atividade antimicrobiana da ampicilina, gentamicina e estreptomicina.

### **1.2.3 Atividade anti-inflamatória**

No processo inflamatório, as células do tecido lesionado liberam substâncias mediadoras inflamatórias, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROS), que são responsáveis pelos eventos iniciadores da inflamação. Na próxima etapa enzimas envolvidas no processo como a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são ativadas e convertem fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico, cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). O ácido araquidônico formado é convertido em prostaglandina e leucotrieno, os principais mediadores inflamatórios (ARAUJO et al., 2012).

A literatura tem reportado a atividade anti-inflamatória apresentada pela própolis, in vitro e in vivo. A sua ação anti-inflamatória é devido à sua propriedade antioxidante com sequestro de EROS dos tecidos (conhecidos como radicais livres liberados pelas células) (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018; CORNARA et al., 2017). As espécies reativas têm a capacidade de estimular a translocação do fator NK-κB para o núcleo celular para o aumento da expressão das enzimas COX, LOX e PLA<sub>2</sub> e mediadores inflamatórios como TNF-α (FAROOQUI et al., 2010). A inibição do fator NK-κB pode ser a base molecular para a atividade anti-inflamatória da própolis (TIVERON et al., 2016). Tiveron et al. (2016) testaram, in vitro, a atividade anti-inflamatória da própolis e obtiveram alta atividade anti-inflamatória com a redução de ativação do fator NF-κB e da liberação de TNF-α por macrófagos.

Componentes isolados da própolis como o ácido fenil éster cafeico, composto conhecido por sua elevada capacidade antioxidante, tem capacidade de inibir citocinas mediadoras da inflamação, enzimas COX, LOX e óxido nítrico (FAROOQUI et al., 2010). A crisina, outro composto ativo isolado da própolis também possui atividade anti-inflamatória. A crisina inibiu o fator NF- $\kappa$ B, a proteína p65, citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em ratos com lesão medular e reduziu os níveis de óxido nítrico, outro mediador inflamatório (JIANG et al., 2014).

Regeneração e cicatrização tecidual é outra atividade biológica atribuída a própolis. Na cicatrização de feridas a própolis é capaz de acelerar o tempo de cicatrização e aumentar a contração da ferida levando à rápida recuperação do tecido lesionado (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

#### **1.2.4. Outras propriedades biológicas da própolis**

As propriedades biológicas da própolis são intensamente investigadas como objeto de estudo farmacológico. A própolis possui uma gama de outras ações biológicas reportadas na literatura (SHABBIR et al., 2016), além das propriedades relatadas acima. Outra ação biológica da própolis é sua atuação como antitumoral e atualmente há muitos estudos *in vitro* e pré-clínicos sobre a atividade antitumoral da própolis (CORNARA et al., 2017).

Atenção especial tem sido dada a própolis do tipo vermelha, que tem se revelado um potente agente antitumoral natural em relação aos outros tipos de própolis (MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2017). No estudo de Frozza et al. (2013) o extrato de própolis vermelha revelou efeitos citotóxicos em linhagens de células cancerosas de: carcinoma epidermoide da laringe humana (Hep2); adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e células não tumorais de epitélio renal (HEK 283). O extrato foi capaz de inibir a proliferação de linhagens de células cancerosas de forma significativa em comparação às células de linhagem não cancerosa. No estudo de Franchi et al. (2012), compostos da própolis verde e vermelha foram capazes de inibir a proliferação de células de linhagem leucêmica.

A atividade antiviral da própolis é pouco relatada na literatura, porém é conhecida. O tipo de própolis originária da Turquia contendo ácido cafeico mostrou resultados eficazes em herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV) (YILDIRIM et al., 2016).

Coelho et al. (2015) investigaram a atividade de própolis de abelhas brasileiras sem ferrão (*Scaptotrigona postica*) e obtiveram a inibição da replicação do vírus HSV 1. E no estudo de Takemura et al. (2012) um constituinte da própolis verde, o ácido 3,4 – dicafeuoquímico, inibiu a multiplicação do vírus influenza em ratos.

A ação antiprotozoária da própolis também foi estudada e esta é capaz de inibir o crescimento in vitro de parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis* (SILVA et al., 2017).

### **1.3 Legislação brasileira**

Os produtos apícolas (mel, própolis, geleia real, cera) estão presentes na atividade produtiva e comercial no mercado nacional. O Brasil é um dos principais produtores e exportador de própolis, tendo o Japão como o principal importador de própolis brasileira (LIMA, 2006). Atualmente, existem aproximadamente noventa formulações farmacêuticas contendo própolis (dentre eles cápsulas, extratos hidroalcoólico ou glicólico, enxaguatórios bucais, cremes, pomadas, pós, condicionadores, xampus, sabonetes, dentifrícios, batons, protetor solar e géis pós-barba) disponíveis no mercado brasileiro (LUSTOSA et al., 2008).

O aumento do consumo e da produção dos produtos apícolas fez o Brasil estabelecer os padrões de identidade e qualidade desses produtos (SOARES et al., 2017). Assim o MAPA estabeleceu através da Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 o regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos apícolas, que abrange a própolis in natura e o extrato de própolis (BRASIL, 2001).

Essa instrução normativa regulamenta os padrões de identidade e qualidade da própolis in natura e do extrato de própolis com os seguintes requisitos físico-químicos e provas qualitativas: propriedades físico-químicas (umidade, cera, cinzas, compostos fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante), características sensoriais (como aroma, cor, sabor e aspecto) e demais condições para o produto ser considerado apto e seguro para comercialização e consumo (ausência de contaminantes sintéticos e aditivos e critérios de qualidade higiênico e sanitárias) (BRASIL, 2001).

Os extratos de própolis são comercializados como alimento apícola e diante de pesquisas comprovando sua atividade biológica, há a tendência de ser

comercializado como um produto farmacêutico com finalidade profilática, curativa e paliativa. Assim, os produtos da própolis devem manter estabilidade dos compostos responsáveis pela sua atividade biológica (BAPTISTA, 2016). Produtos elaborados a base de própolis que apresentem indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamento específico, conforme determina a RDC nº 24 de 14 de junho de 2011, sendo classificados como opoterápicos (preparação obtida a partir de glândulas, tecidos, outros órgãos e secreções animais, destinada a fim terapêutico ou medicinal) (BRASIL, 2011).

#### **1.4 Própolis como antimicrobiano natural e o problema da resistência aos antimicrobianos**

As bactérias possuem a capacidade de empregar diferentes mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas. O uso indiscriminado e excessivo de fármacos antimicrobianos favoreceu o surgimento de cepas bacterianas resistentes a várias classes de antimicrobianos. A resistência antibiótica ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos (TAVARES et al., 2013). A ocorrência comum de resistência cruzada entre as classes de drogas antimicrobianas e o número limitado de classes de antimicrobianos gerou a necessidade urgente em descobrir novas drogas antimicrobianas (CHUNG et al., 2013).

Por suas propriedades farmacológicas e perfil de segurança, a própolis tem atraído o interesse da comunidade científica tornando-a uma potencial candidata à nova droga antimicrobiana (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015; SFORCIN e BANCOVA, 2016). Por possuir uma complexa composição química, a própolis dificulta o desenvolvimento de bactérias resistentes. Também apresenta segurança no uso sendo considerado um produto com baixa toxicidade, além de apresentar custo acessível se tornando uma alternativa promissora para novos tratamentos (BAPTISTA, 2016).

A própolis como agente antimicrobiano e em sinergia com um fármaco antimicrobiano convencional pode ser uma alternativa interessante para reduzir a dose, os efeitos adversos e evitar o surgimento de cepas bacterianas resistentes (BENHANIFIA e MOHAMED, 2015).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e realizar a caracterização físico-química de diferentes extratos comerciais de própolis brasileiras.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis empregando ensaio de difusão em disco;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis;
- Determinar as características físico-químicas dos extratos de própolis.

### 3. JUSTIFICATIVA

A própolis brasileira apresenta uma variada composição química de acordo com a sua origem em diferentes regiões do país. Tal variação é explicada pela enorme diversidade da flora brasileira (SALATINO et al., 2011). No Brasil os três tipos mais citados de própolis são: a própolis verde originada do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), a própolis vermelha originada do marmeleiro da praia (*Dalbergia ecastophyllum*) e a própolis marrom que tem variada origem botânica (ANDRADE et al., 2017; GUIMARÃES et al.; 2012). Vários estudos comprovam o potencial da própolis para diversas aplicações farmacológicas e confirmam a sua eficácia como antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (BITTENCOURT et al., 2015). Atualmente muitas bactérias desenvolveram resistência contra várias classes de antibióticos e o que se tem notado é uma intensa busca por novos medicamentos, com destaque para a própolis. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e realizar a caracterização físico-química de diferentes extratos de própolis brasileiras.



#### 4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS

Bruno Alcântara do Prado, Lorena Cristina Fernandes Messias da Silva, Daniela Castilho Orsi

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

#### RESUMO

No presente estudo foi realizada a caracterização físico-química e determinação da atividade antimicrobiana de seis extratos comerciais de própolis brasileiras. Os extratos de própolis marrom e verdes apresentaram de 12,22-13,36% de extrato seco e se enquadraram nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira (mínimo de 11%), indicando que foram elaborados com no mínimo 30% de própolis *in natura*. Esses extratos de própolis (verdes e marrom) apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos (1,54-1,86%) em comparação com o extrato de própolis vermelha. A própolis vermelha apresentou um menor teor de compostos fenólicos (0,86%) devido ao baixo teor de extrato seco (7,90%). E o extrato de própolis verde elaborado com 70% de própolis apresentou um maior teor de compostos fenólicos (4,48%) devido ao elevado teor de extrato seco (24,03%). Foi encontrada uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de própolis. O extrato elaborado com 70% de própolis apresentou a maior capacidade antioxidante (DPPH 349,70 mM trolox e ABTS 449,46 mM trolox) enquanto o extrato de própolis vermelha apresentou a menor atividade antioxidante (DPPH 53,96 mM trolox e ABTS 186,83 mM trolox). No ensaio por disco difusão todos os extratos de própolis testados apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas testadas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos Gram negativos testados. A própolis vermelha que apresentou o menor valor de extrato seco e fenólicos totais, mostrou os melhores resultados para o teste de

Concentração Bactericida Mínima (CBM). A bactéria *B. cereus* mostrou-se mais sensível aos efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis em relação as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*. A CBM do *B. cereus* variou de 3 a 9 mg/mL para os extratos de própolis vermelha, verdes e marrom. As propriedades biológicas da própolis estão ligadas à sua composição, que varia de acordo com a flora visitada pelas abelhas e o período de coleta das resinas. Apesar de a CBM variar bastante entre os diferentes extratos de própolis, pode-se constatar que as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans* apresentam-se sensíveis a própolis, que tem efeito bactericida sobre essas bactérias.

**Palavras-chave:** própolis verde, própolis marrom, própolis vermelha, atividade antioxidante, compostos fenólicos, Concentração Bactericida Mínima.

## ABSTRACT

In the present study the physical-chemical characterization and determination of the antimicrobial activity of six commercial extracts of Brazilian propolis were carried out. The extracts of brown and green propolis presented 12.22-13.36% of dry extract and were within the parameters required by Brazilian legislation (minimum of 11%), indicating that they were made with at least 30% of propolis *in natura*. These extracts of propolis (green and brown) presented higher value of phenolic compounds (1.54-1.86%) in comparison to the extract of red propolis. Red propolis had a lower content of phenolic compounds (0.86%) due to the low content of dry extract (7.90%). And the green propolis extract prepared with 70% of propolis presented a higher content of phenolic compounds (4.48%) due to the high content of dry extract (24.03%). A positive correlation was found between the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of the propolis extracts. The extract prepared with 70% of propolis presented the highest antioxidant capacity (DPPH 349.70 mM trolox and ABTS 449.46 mM trolox) while the red propolis extract showed the lowest antioxidant activity (DPPH 53.96 mM trolox and ABTS 186, 83 mM trolox). In the disc diffusion assay all the propolis extracts tested showed antimicrobial activity for the Gram-positive bacteria tested (*S. aureus*, *B. cereus* and *S. mutans*). However, there was no antimicrobial activity for the Gram-negative microorganisms tested. The red propolis that presented the lowest value of dry extract and total phenolics, showed the best results for the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test. The bacterium *B. cereus* showed to be more sensitive to the antimicrobial effects of the extracts of propolis in relation to the bacteria *S. aureus* and *S. mutans*. The MBC of *B. cereus* ranged from 3 to 9 mg/mL for extracts of red, green and brown propolis. The biological properties of propolis are related to its composition, which varies according to the flora visited by the bees and the period of collection of the resins. Although the MBC varies widely among the different propolis extracts, it can be observed that the bacteria *S. aureus*, *B. cereus* and *S. mutans* are susceptible to propolis, which has a bactericidal effect on these bacteria

**Keywords:** green propolis, brown propolis, red propolis, antioxidant activity, phenolic compounds, Minimum Bactericidal Concentration

## INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância natural, resinosa, coletada de tecidos vegetais, que misturados à cera, pólen e a saliva das abelhas torna-se um produto compacto, maleável e com a função reparadora e antisséptica na colmeia (SUN et al., 2015). A composição química da própolis pode girar em torno de 300 compostos, dentre eles terpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e minerais, e é influenciada por fatores como localização geográfica e as origens florais (CORNARA et al., 2017; SUN et al., 2015).

Desde os tempos antigos a própolis já era utilizada no tratamento de feridas e úlceras, entretanto o estudo dos componentes e das atividades biológicas da própolis vem sendo exploradas mais recentemente. Dentre efeitos biológicos mais descritos estão a sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante e alguns estudos estão explorando também a atividade antiparasitária (SILVA et al., 2017).

Quanto a sua atividade antimicrobiana, estudos demonstraram que alguns compostos da própolis têm atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (TIVERON et al., 2016). Outros estudos sugeriram que alguns tipos de própolis também demonstraram atividade antimicrobiana contra patógenos anaeróbios (SHABBIR et al., 2016).

A própolis brasileira mais produzida é conhecida internacionalmente como própolis verde e tem como principal fonte vegetal a espécie *Baccharis dracunculifolia* D.C., conhecida popularmente como alecrim do campo. A própolis verde é um produto tipicamente brasileiro e ganhou a preferência no mercado mundial de própolis (LÓPEZ et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

No Brasil, recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro. Foi observado que as abelhas coletam o exsudato vermelho do marmeleiro da praia (*Dalbergia ecastophyllum*), sugerindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha. Então se analisou comparativamente as amostras de exsudatos das plantas e da própolis vermelha, mostrando que o perfil cromatográfico da própolis é exatamente o mesmo da *D. ecastophyllum* (LÓPEZ et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

E no trabalho de Fernandes et al. (2014) foi reportado um estudo com uma própolis marrom coletada na região do Cerrado brasileiro (Mato Grosso do Sul) e foi reportado pelos autores a ausência de trabalhos na literatura mostrando a atividade biológica das própolis produzidas na região do Cerrado brasileiro.

No Brasil, o MAPA (BRASIL, 2001) estabelece os limites para fixação de identidade e qualidade de própolis e seus produtos derivados. Algumas dessas especificações são para determinar as características físico-químicas do extrato alcoólico de própolis como teor mínimo de extrato seco (11% m/v), teor mínimo de compostos fenólicos (0,50% m/m) e propriedades antioxidantes.

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e realizar a caracterização físico-química de diferentes extratos de própolis brasileiras.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Amostras**

Foram utilizados seis extratos comerciais de própolis: 1- extrato alcoólico de própolis verde marca A com 30% de própolis in natura, 2- extrato alcoólico de própolis marrom marca A com 30% de própolis in natura, 3- extrato alcoólico de própolis verde marca B com 30% de própolis in natura, 4- extrato alcoólico de própolis vermelha da marca C, 5- extrato alcoólico de própolis verde marca A com 70% de própolis in natura, 6- extrato aquoso de própolis marca A.

### **5.2 Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco**

O método de ensaio de difusão em disco foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação

equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08–0,10 de densidade óptica (D.O) a 625 nm em espectrofotômetro.

Para realizar o ensaio de difusão em disco, com o auxílio de *swab* estéril, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 20  $\mu$ L dos extratos de própolis. Os testes foram realizados em triplicata e as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

### **5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo**

O método de macrodiluição em caldo foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). De acordo com a CLSI (1999) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%.

Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Os extratos de própolis foram diluídos em caldo LB. Para os cálculos de concentrações foi considerado o peso seco de cada extrato de própolis. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de bactérias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do

crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 1,0 mL de extrato de própolis. Os testes foram realizados em duplicata.

Os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 37°C por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração dos extratos de própolis onde não foram observadas colônias nas placas.

#### **5.4 Análises físico-químicas dos extratos de própolis**

Para a determinação do teor de extrato seco, as amostras foram colocadas em cadinhos (previamente secos e pesados) e mantidas em estufa a 105°C até se obter peso constante (IAL, 2008). Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (KIM et al., 2002) e ABTS (RE et al., 1999).

### **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Análises físico-químicas dos extratos de própolis**

A quantificação do extrato seco consiste na porcentagem seca de sólidos dissolvidos nos extratos de própolis, sendo um dos parâmetros de qualidade estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis, com um valor mínimo de 11% (m/v) (BRASIL, 2001). A concentração de extrato seco de 11% indica que o extrato foi elaborado com no mínimo 30% (p/v) de própolis *in natura*.

Os resultados das seis amostras deste estudo estão apresentados na tabela 1 e a porcentagem de extrato seco das amostras variou de 7,90% a 38,84%. Os extratos de própolis marrom e verde (marcas A e B) apresentaram de 12,22-13,36% de extrato seco e se enquadraram nos parâmetros da legislação.

**Tabela 1 - Análises físico-químicas dos extratos de própolis**

Extratos de própolis	Extrato Seco (%)	Compostos Fenólicos (%)	DPPH (mM Trolox)	ABTS (mM Trolox)
<b>1 (Verde A)</b>	12,22±0,04 <sup>a</sup>	1,85±0,07 <sup>a</sup>	116,65±2,88 <sup>a</sup>	295,21±12,88 <sup>a</sup>
<b>2 (Marrom)</b>	12,61±0,21 <sup>a</sup>	1,86±0,07 <sup>a</sup>	111,92±2,56 <sup>a</sup>	274,78±21,42 <sup>a</sup>
<b>3 (Verde B)</b>	13,36±0,00 <sup>b</sup>	1,54±0,02 <sup>b</sup>	94,11±1,75 <sup>b</sup>	275,91±7,45 <sup>a</sup>
<b>4 (Vermelha)</b>	<b>7,90±0,10<sup>c</sup></b>	0,86±0,02 <sup>c</sup>	53,96±1,00 <sup>c</sup>	186,83±22,76 <sup>b</sup>
<b>5 (Verde 70%)</b>	24,03±0,05 <sup>d</sup>	4,48±0,10 <sup>d</sup>	349,70±16,70 <sup>d</sup>	449,46±30,34 <sup>c</sup>
<b>6 (Aquoso)</b>	38,84±0,14 <sup>e</sup>	1,31±0,02 <sup>e</sup>	40,49±0,60 <sup>e</sup>	189,73±13,52 <sup>b</sup>
<b>Legislação</b>	Min 11% (p/v)	Min 0,50% (p/p)		

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey. 1- extrato alcoólico de própolis da verde marca A com 30% de própolis *in natura*, 2- extrato alcoólico de própolis marrom da marca A com 30% de própolis *in natura*, 3- extrato alcoólico de própolis verde da marca B com 30% de própolis *in natura*, 4- extrato alcoólico de própolis vermelha da marca C elaborado com 30% de própolis *in natura*, 5- extrato alcoólico de própolis verde da marca A com 70% de própolis *in natura*, 6- extrato aquoso de própolis da marca A com 30% de própolis *in natura*.

Porém o extrato de própolis vermelha apresentou somente 7,90% de extrato seco, indicando que foi elaborado com menos de 30% de própolis *in natura* e ficou em desacordo com a legislação. Baptista (2016) obteve resultado similar, com 9,72% de extrato seco para a própolis vermelha. O trabalho de Nascimento et al. (2018) apresentou resultados diferentes, onde os quatro extratos comerciais de própolis estudados mostraram resultados de extrato seco de 4,32%, 6,22%, 12,57% (extratos de própolis marrom) e 13,69% (extrato de própolis vermelha). No estudo de Soares et al. (2017) de oito amostras de extratos comerciais de própolis brasileiras analisadas, 3 amostras apresentaram teor de extrato seco abaixo do mínimo permitido pela legislação de 11%.

Já o extrato de própolis elaborado com 70% de própolis *in natura* apresentou o dobro de extrato seco (24%) em relação aos demais extratos alcoólicos



elaborados com 30% de própolis *in natura*, o que é um resultado coerente com sua maior concentração.

O maior teor de extrato seco foi obtido para o extrato aquoso (38,8%), pois este tem metodologia de extração diferente dos demais extratos. O solvente aquoso possui polaridade distinta do solvente alcoólico, com capacidade de carrear aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos complexos da própolis o que resulta em um teor maior de sólidos dissolvidos, por consequência um extrato seco elevado, não necessariamente este sendo composto por abundância em substâncias biologicamente ativas, como os compostos fenólicos, que são melhor dissolvidos em etanol do que em água (KUBILIENE et al., 2015; PONTES et al., 2018). Segundo Sforcin e Bankova (2011), a água dissolve uma pequena parte dos constituintes da própolis (cerca de 10%), enquanto que o etanol dissolve cerca de 50-70%.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram maior quantidade de compostos fenólicos para os extratos de própolis verdes marcas A e B e marrom (1,54-1,86%) em comparação com o extrato de própolis vermelha. A própolis vermelha apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos (0,86%), provavelmente devido ao baixo teor de extrato seco (7,90%). E o extrato de própolis elaborado com 70% de própolis *in natura* apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos (4,48%), provavelmente devido ao elevado teor de extrato seco em sua composição.

Andrade et al. (2017) determinaram os compostos fenólicos de extratos de própolis verde, vermelha e marrom, ambos elaborados com própolis *in natura*. Os resultados mostraram que a própolis verde exibiu maior quantidade de compostos fenólicos totais, comparado com a vermelha e marrom. A própolis vermelha é relatada na literatura com elevado teor de compostos fenólicos (CASTRO e SALGUEIRO, 2016; RUFFATO et al., 2017 ). No estudo de Machado et al. (2016), extratos de própolis vermelhas provenientes do Nordeste do Brasil apresentaram grandes quantidades de compostos fenólicos totais, de 25 a 30%.

O extrato aquoso obteve um teor de compostos fenólicos (1,31%) menor em comparação com os extratos alcoólicos verdes e marrom. Siripatrawan et al. (2012), determinaram o teor de compostos fenólicos totais de extratos de própolis elaborados com etanol a 30%, 40%, 50% e 70% e verificaram um aumento significativo do teor de compostos fenólicos totais nos extratos com maior

concentração do etanol, concluindo que a água usada como solvente não contribui eficientemente para extrair os compostos fenólicos da própolis.

Nos extratos de própolis o mínimo exigido pela legislação brasileira, em relação ao teor de compostos fenólicos, é de 0,50% (m/m) e todos os extratos analisados neste estudo ficaram com valores de compostos fenólicos dentro dos limites exigidos pela legislação (0,86-4,48%). Resultados semelhantes foram encontrados por Soares et al. (2017), que avaliaram a qualidade de oito amostras de extratos de própolis comerciais e os teores de fenólicos totais variaram de 0,52-3,57%.

Sun et al. (2015) reportaram resultados similares, onde o extrato de própolis proveniente de Pequim, China, elaborado com 25% de própolis *in natura* apresentou 1,58% de compostos fenólicos. No estudo de Siripatrawan et al. (2012) os extratos de própolis provenientes da Tailândia apresentaram de 2,28 a 7,75% de compostos fenólicos. E no estudo de Silva et al. (2006) os extratos de própolis provenientes da Paraíba, Brasil, apresentaram de 2,93 a 8,13% de compostos fenólicos. Salgueiro e Castro (2016) obtiveram teor médio de compostos fenólicos de 8,29% para doze extratos de própolis comerciais. Já no estudo de Tiveron et al. (2016) os extratos de própolis provenientes do sul do Brasil mostraram de 1,76% a 7,98% de compostos fenólicos.

No que diz respeito aos testes de atividade antioxidante, os resultados deste estudo para as amostras de extratos de própolis variaram de 40,49 a 349,70 mM Trolox para DPPH e de 186,83 a 449,46 mM Trolox para ABTS. Muitos estudos apresentaram uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de própolis (ANDRADE et al., 2017; BITTENCOURT et al., 2015; CASTRO e SALGUEIRO, 2016; SIRIPATRAWAN et al., 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura. O extrato de própolis elaborado com 70% de própolis *in natura* apresentou o maior teor de compostos fenólicos (4,48%) e a maior capacidade antioxidante (DPPH 349,70 e ABTS 449,46), em comparação com os outros extratos de própolis analisados. Castro e Salgueiro (2016) realizaram testes em doze amostras de extratos de própolis *in natura* e doze amostras de extratos de própolis comerciais. O extratos comerciais obtiveram valores superiores no teor de compostos fenólicos e

capacidade antioxidante, uma vez que os extratos *in natura* foram elaborados com 4% de própolis e os extratos comerciais com 30% de própolis.

Os extratos marrom e verde marca A não apresentaram diferença estatística em relação ao seu conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, revelando elevada capacidade antioxidante. Machado et al. (2016) obtiveram maior atividade antioxidante para a propolis verde e menor para a marrom. Skaba et al. (2013) obtiveram baixos valores de atividade antioxidante para a propolis verde do estado de Minas Gerais (DPPH 1,23 mmol trolox e ABTS 1,22 mmol trolox).

O extrato de própolis vermelha apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos (0,86%) e por consequência a menor atividade antioxidante (DPPH 53,96 e ABTS 186,83), em comparação com os outros extratos de própolis analisados. Esse resultado reforça o fato da composição fenólica do extrato de própolis impactar na sua capacidade antioxidante.

Os estudos da literatura reportam uma elevada capacidade antioxidante da própolis vermelha. No trabalho de Andrade et al. (2017) a própolis vermelha teve elevada atividade antioxidante (com 90,72% de inibição do radical de DPPH) e foi o melhor resultado em comparação com as amostras de própolis verde e marrom. Já no estudo de Nascimento et al. (2018), nas análises da capacidade antioxidante de extratos comerciais de própolis, o extrato de própolis marrom teve melhor resultado com 93,3% de inibição do radical DPPH em comparação com o extrato de própolis vermelha (79,0% de inibição do radical DPPH).

O extrato aquoso apresentou a menor atividade antioxidante por DPPH entre os extratos testados. Sun et al. (2015) investigaram o efeito de diferentes solventes (hidroalcoolicos e aquoso) na elaboração de extratos de própolis e verificaram que o conteúdo fenólico (0,66%) e a atividade antioxidante do extrato aquoso foi menor em comparação com os extratos de própolis hidroalcoolicos.

### **Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis**

A tabela 2 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana (ensaio de difusão em disco) dos extratos comerciais de própolis, onde foram aplicados 20 µL de cada extrato de própolis nos discos de papel.

**Tabela 2 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis**

Extratos de própolis	Microrganismos testados (diâmetro dos halos em milímetros)					
	S.	B.	S.	P.	K.	S.
	<i>aureus</i> ATCC 25923	<i>cereus</i> ATCC 14579	<i>mutans</i> ATCC 25175	<i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>pneumoniae</i> ATCC BAA- 1706	<i>enteritidis</i> ATCC 14028
1	30,3±2,52	22,5±0,70	26,0±1,00	NI	NI	NI
2	27,0±2,65	21,0±0,01	22,0±1,00	NI	NI	NI
3	27,0±2,65	22,5±0,70	25,3±0,58	NI	NI	NI
4	26,5±0,70	29,0±1,41	24,3±0,50	NI	NI	NI
5	29,6±0,58	23,3±1,52	26,0±1,73	NI	NI	NI
6	30,0±2,00	29,0±3,60	21,8±2,30	NI	NI	NI

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições; NI = não houve inibição do crescimento microbiano; 1- extrato alcoólico de própolis verde marca A com 30% de própolis in natura, 2- extrato alcoólico de própolis marrom marca A com 30% de própolis in natura, 3- extrato alcoólico de própolis verde marca B com 30% de própolis in natura; 4- extrato alcoólico de própolis vermelha da marca C elaborado com 30% de própolis in natura; 5- extrato alcoólico de própolis verde marca A com 70% de própolis in natura; 6- extrato aquoso de própolis marca A com 30% de própolis in natura.

Foi observado que todos os extratos de própolis testados apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*. No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos Gram negativos testados.

A própolis apresenta uma maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas (como *S. aureus* e *B. subtilis*) (BITTENCOURT et al., 2015) e uma ação mais limitada contra bactérias Gram-negativas (como *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa*) (GOMES et al., 2016). Resultados similares foram reportados por Siripatrawan et al. (2012), que utilizaram extratos de própolis tailandesa e verificaram que nos ensaios de disco difusão, houve atividade antibacteriana para *S. aureus* TISTR 118 e não houve halos de inibição para os microrganismos gram

negativos testados: *E. coli* TISTR 780, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. enteritidis* DMTS 17368.

Generoso et al. (2013) testaram extratos de própolis brasileiras (verde, vermelha e marrom) para *S. mutans* ATCC 25175 em teste de difusão em disco contendo 20 µL dos extratos e obtiveram zonas de inibição de 21,50 mm (extrato de própolis verde), 27,25 mm (extrato de própolis vermelha) e 21,00 mm (extrato de própolis marrom), resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para *S. mutans*.

Alguns estudos na literatura demonstraram a atividade de extratos de própolis contra bactérias Gram negativas utilizando o método de difusão em disco. Mercan et al. (2006) testaram oito amostras de extrato etanólico de própolis da Turquia e obtiveram resultados de halos de inibição de 8–12 mm para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e de 8 mm para *K. pneumoniae* ATCC 27736. No estudo de Nascimento et al. (2018), a atividade antibacteriana do extrato de própolis comercial, utilizando técnica de disco-difusão, mostrou halos de inibição de 16-25 mm para *S. aureus* ATCC 25923 e 8-12 mm para *P. aeruginosa* ATCC 27853. Shawky e Ibrahim (2018) utilizaram sete amostras de extratos etanólicos de própolis do Egito e obtiveram halos de inibição de 4–14mm para as bactérias Gram positivas e de 4 mm para a bactéria Gram negativa *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Segundo Rocha et al. (2013) os extratos de própolis brasileiros possuem atividade antibacteriana principalmente para bactérias Gram positivas. Algumas bactérias Gram negativas apresentam susceptibilidade as própolis brasileiras enquanto outras não. As bactérias Gram-negativas são menos susceptíveis à ação da própolis devido ao fato de possuírem uma parede celular com um maior teor lipídico, a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de parede celular. Assim o emprego da própolis como antibiótico natural seria possivelmente mais viável para o tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas (GOMES et al., 2016).

### **Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis**

A Tabela 3 apresenta a CBM dos extratos de própolis considerando o peso seco de cada extrato para as bactérias Gram positivas testadas. Para a bactéria *S.*

*aureus* ATCC 25923, o melhor resultado de CBM foi obtido com o uso do extrato de própolis vermelha (8 mg/mL). Os extratos alcoólicos de própolis verde (marcas A e B) e marrom mostraram a mesma CBM de 20 mg/mL.

**Tabela 3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis**

Extratos de própolis	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. mutans</i>
	ATCC 25923	ATCC 14579	ATCC 25175
	CBM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<b>1 (Verde A)</b>	20	9	9
<b>2 (Marrom)</b>	20	9	12
<b>3 (Verde B)</b>	20	6	12
<b>4 (Vermelha)</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	13
<b>5 (Verde 70%)</b>	40	18	18
<b>6 (Aquoso)</b>	95	30	>45

1- extrato alcoólico de própolis da verde marca A com 30% de própolis in natura, 2- extrato alcoólico de própolis marrom da marca A com 30% de própolis in natura, 3- extrato alcoólico de própolis verde da marca B com 30% de própolis in natura, 4- extrato alcoólico de própolis vermelha da marca C elaborado com 30% de própolis in natura, 5- extrato alcoólico de própolis verde da marca A com 70% de própolis in natura, 6- extrato aquoso de própolis da marca A com 30% de própolis in natura.

Vários autores mostraram os efeitos de diferentes extratos de própolis coletados de várias regiões geográficas no mundo para *S. aureus*. No estudo de Ristivojević et al. (2016) foram elaborados 53 extratos de própolis coletados na Sérvia. A CBM para *S. aureus* ATCC 25923 de alguns dos extratos de própolis laranja variou de 12 a 14 mg/mL. No estudo de Gomes et al. (2016), o extrato de própolis marrom coletado no Mato Grosso do Sul apresentou CBM variando de 4,5 a 18,9 mg/mL para as bactérias *S. aureus* testadas.

No estudo de Rahman et al. (2010) a CBM de extratos de própolis de origem canadense para *S. aureus* variou de 2,7 a 3,5 mg/mL. No estudo de Al Ani et al. (2018) a CBM para *S. aureus* ATCC 29213 do extrato de própolis originário da Alemanha foi de 5 mg/mL e o extrato de própolis proveniente da República Tcheca apresentou CBM de 2,5 mg/mL. No estudo de Berretta et al. (2012), o extrato comercial de própolis verde brasileira apresentou CBM de 3,5 mg/mL contra *S. aureus* ATCC 25923. No estudo de Tiveron et al. (2016) foram coletadas 78 amostras de própolis brasileiras nos estados de Paraná e Santa Catarina. A CBM para *S. aureus* ATCC 25923 não foi atingida nas diluições testadas para a maioria dos extratos testados e os autores reportaram que a CBM teve valor maior que 1,6 mg/mL.

Neste estudo, a bactéria *B. cereus* ATCC 14579 mostrou-se mais sensível aos efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis em relação as outras bactérias testadas (*S. aureus* e *S. mutans*). A CBM variou de 3 a 9 mg/mL para os extratos de própolis vermelha, verde (marcas A e B) e marrom. No estudo de Erturk et al. (2016) foram elaborados extratos de própolis coletados na Turquia. A CBM para *B. cereus* ATCC 11778 dos extratos de própolis variou de 1 a 2 mg/mL. E no estudo de Ristivojević et al. (2016) a CBM para *B. subtilis* ATCC 6632 dos extratos de própolis laranja coletados na Sérvia apresentou maior variação de 1,4 a 20 mg/mL.

Neste estudo para a bactéria *S. mutans* ATCC 25175, a CBM variou de 9 a 13 mg/mL para os extratos de própolis vermelha, verde (marcas A e B) e marrom. No estudo de Erturk et al. (2016) a CBM para *S. mutans* RSHE 676 dos extratos de própolis coletados na Turquia variou de 1 a 4 mg/mL. E no estudo de Ristivojević et al. (2016) a CBM para *S. mutans* dos extratos de própolis laranja coletados na Sérvia variou de 0,4 a >1 mg/mL.

É interessante observar que neste trabalho a própolis vermelha que apresentou somente 7,90% de extrato seco (indicando que o extrato foi elaborado com menos de 30% de própolis *in natura*), mostrou os melhores resultados para a atividade antimicrobiana. O baixo teor de extrato seco fez o extrato de própolis vermelha apresentar o menor conteúdo de compostos fenólicos (0,86%) e por consequência a menor atividade antioxidante (DPPH 53,96 e ABTS 186,83) entre os extratos testados. A literatura mostra forte relação da atividade biológica de própolis com o conteúdo fenólico (ANDRADE et al., 2017; MACHADO et al., 2016;

MARCUCCI et al., 2013). Entretanto estudos na literatura reportam a própolis vermelha com elevada atividade biológica devido ao fato de possuir compostos não encontrados nos outros tipos de própolis (LOPEZ et al., 2014).

Baptista (2016) obteve resultados similares ao nosso estudo, com 9,72% de extrato seco para a própolis vermelha e menor conteúdo fenólico (1,49%), entretanto o melhor resultado de atividade antibacteriana dentre os extratos testados. A própolis vermelha apresentou CBM para *S. aureus* de 0,39 mg/mL, CBM para *S. pneumoniae* de 0,19 mg/mL e CBM para *K. pneumoniae* de 0,77 mg/mL e os resultados foram expressos considerando o peso seco dos extratos. Machado et al. (2016) testaram a atividade antibacteriana de extratos de própolis vermelhas, verde e marrom e obtiveram os melhores resultados com os extratos de própolis vermelhas provenientes de Sergipe e Alagoas com CBM de 0,40 mg/mL frente a *S. aureus* e CBM de 1,60 mg/mL frente a *E. coli*.

As propriedades biológicas da própolis estão ligadas à sua composição, que varia de acordo com a flora visitada pelas abelhas e o período de coleta das resinas. Assim, as própolis da América do Sul, da Europa e da Ásia apresentam diferentes composições químicas (BENHANIFIA e MOHAMED, 2015; LÓPEZ et al., 2014; ORYAN et al. 2018). Apesar de a CBM variar bastante entre os diferentes extratos de própolis estudados na literatura, pode-se constatar que as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans* apresentam-se sensíveis a própolis, que tem efeito bactericida sobre essas bactérias.

Já no resultado obtido para o extrato alcoólico elaborado com 70% de própolis verde *in natura*, a concentração elevada de própolis no extrato não refletiu em maior atividade bactericida desse extrato em relação aos extratos elaborados com 30% de própolis. Esse é um resultado importante visto que o custo do extrato alcoólico com 70% de própolis *in natura* é o dobro do custo do extrato alcoólico com 30% de própolis *in natura*. Isso pode estar relacionado com o mecanismo de ação da própolis, que ainda não foi completamente elucidado e as substâncias responsáveis por seu efeito antibacteriano também não foram totalmente estabelecidas, podendo a atividade antimicrobiana variar de uma amostra para outra (BERETTA et al., 2012; FARNESI et al., 2009; KILIC et al., 2005). Não, necessariamente, uma maior concentração de própolis no extrato promove maior atividade antimicrobiana, como constatamos nos resultados da amostra 5.



A legislação brasileira estabelece que o extrato seco é uma das principais análises a serem realizadas para garantir a qualidade do extrato de própolis, uma vez que isso indica que a quantidade de própolis *in natura* é no mínimo 30%. Diante dos resultados deste estudo obtidos para a amostra de própolis a 70% e com base nos resultados reportados na literatura, surge um questionamento importante acerca dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação: se realmente o extrato necessita da concentração mínima de 30% própolis *in natura* para ter suas atividades biológicas efetivas, em especial a atividade antimicrobiana.

Na literatura há muitos trabalhos que elaboraram o extrato de própolis *in natura* abaixo da concentração de 30% de própolis e a CBM foi menor em comparação aos extratos comerciais produzidos com 30% de própolis deste trabalho, inferindo-se que a concentração do extrato não possui correlação linear com a atividade antibacteriana. Cabral et al. (2009) elaboraram um extrato alcoólico de própolis vermelha a 25%, obtendo CBM 0,25 mg/mL para *S. aureus* ATCC 25923. Já no trabalho de Machado et al. (2016) o extrato de própolis vermelha a 13% teve CBM 0,40 mg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923. Alencar et al. (2007) tiveram resultados de CBM de 0,20-040 mg/mL com um extrato a 22% de própolis *in natura* contra *S. aureus* ATCC 25923 e *S. mutans* UA159. Já no estudo de Bastos et al. (2011), os autores testaram 23 extratos de própolis marrom a 50% frente a *E. coli* ATCC 25922 e somente 12 extratos apresentaram atividade antimicrobiana.

Em relação ao extrato aquoso de própolis, é interessante notar que mesmo na ausência de álcool, a própolis mantém uma moderada atividade bactericida para as bactérias testadas mostrando que, embora exista um efeito sinérgico antimicrobiano do álcool associado com a própolis nos extratos hidroalcoólicos, a própolis em um extrato aquoso tem moderado efeito antimicrobiano. Como o extrato aquoso de própolis apresentou o maior peso de extrato seco entre os extratos testados e a CBM foi calculada considerando o peso seco de cada extrato, os valores de CBM ficaram elevados para o extrato aquoso e variaram de 30-95 mg/mL.

O solvente e a metodologia utilizada no processo de extração da própolis têm forte influência na composição química final do produto (CABRAL et al., 2009). Esse fato pode ser uma possível explicação para os resultados de trabalhos na literatura onde o extrato aquoso exibe boa atividade antimicrobiana e em outros trabalhos o

extrato aquoso exibe fraca atividade antimicrobiana, lembrando que o solvente aquoso não possui forte capacidade de extração dos compostos fenólicos da própolis.

No estudo de Erturk et al. (2016) com exceção da bactéria *S. mutans*, o extrato aquoso de própolis não apresentou efeito bactericida para as outras bactérias testadas. Esse resultado provavelmente foi obtido pela forma de extração da própolis que foi moída, colocada em contato com água e dimetilsulfóxido por 1 semana e depois filtrada. No estudo de Rocha et al. (2013) o extrato aquoso de própolis foi preparado através de extração da própolis moída em solução hidroalcoólica de 70% e depois o extrato foi filtrado. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador com temperatura de 40-60°C. Depois da completa evaporação do solvente (80-90% de matéria seca), o extrato mole de própolis foi submetido a hidrólise alcalina e então foi solubilizado em água. O extrato aquoso de própolis mostrou atividade bactericida para as bactérias testadas (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. pneumoniae* ATCC 49619 e *E. coli* ATCC 25922).

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo foram realizadas análises físico-químicas e determinação da atividade antimicrobiana de seis extratos comerciais de própolis brasileiras. No ensaio por disco difusão todos os extratos de própolis testados apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas testadas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*). No entanto não houve atividade antimicrobiana para os microrganismos Gram negativos testados. A bactéria *B. cereus* mostrou-se mais sensível aos efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis em relação as bactérias *S. aureus* e *S. mutans*. A CBM do *B. cereus* variou de 3 a 9 mg/mL para os extratos de própolis vermelha, verdes e marrom. Verificou-se que o teor de extrato seco não mostrou uma correlação linear com a atividade antibacteriana da própolis. O extrato de própolis vermelha apresentou o menor valor de extrato seco e conteúdo fenólico e, no entanto, mostrou os melhores resultados para a atividade antimicrobiana no teste de CBM. Apesar da literatura mostrar uma forte relação da atividade biológica de própolis com o conteúdo fenólico, o mecanismo de ação antibacteriano da própolis ainda não foi completamente elucidado, assim faltam estudos mais detalhados com esse propósito.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

AL-ANI, I. et al. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p.1-17, 2018.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p.278-283, 2007.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, e0702014, 2016.

BAPTISTA, N. U. F. **Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado), Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

BENHANIFIA, M.; MOHAMED, W. Phenolics constituents of different types of propolis and their antimicrobial activities. **Anti-Infective Agents**, v. 13, n. 1, p. 17-27, 2015.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p.512-521, 2012.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, n. 76, p.449-457, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p.1192-1199, 2016.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-20, 2017.

ERTURK, O. et al. An *in vitro* study on antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Rize province of Turkey, **Mellifera**, v.16, n. 1, p. 4–18, 2016.

FARNESI A. P. et al. Effects of stingless bee and honey propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

FERNANDES, F. H. et al. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research Internacional**, v. 62, p. 20–26, 2014.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.

GENEROSO, Wellington Gomes et al. Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 29, p. 2006-2010, 2013.

GOMES, M. F. F. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, 2016.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008. Disponível em: [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)

KILIC A. et. al. In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Annals of Microbiology**, v.55, n.2, p.113-117, 2005.

KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

KUBILIENE, L. et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p.1-7, 2015.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis, **Food Chemistry**, v. 146, n. 1, p. 174-180, 2014.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil, **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2016.

MARCUCCI, M. C. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante da própolis do estado do Ceará. **Revista Fitos**, v. 4, n. 01, p. 81-86, 2013.

MERCAN, N. et al. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 373, 2006.

NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p.246-254, 2018.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 469-483, 2018.

PONTES, M. L. C. et al. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 34-39, 2018.

RAHMAN, M. M.; RICHARDSON, A.; SOFIAN-AZIRUN, M. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 16, p.1872-1878, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical Cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 367–379, 2018.

ROCHA, B. A. et al. Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterisation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-11, 2013.

RUFATTO, L. C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurina as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. v. 42, p. 321–324, 2007.

SHABBIR, A.; RASHID, M.; TIPU, H. N. Propolis, a hope for the future in treating resistant periodontal pathogens. **Cureus**, v. 8, n. 7, p.2-12, 2016.

SHAWKY, E.; IBRAHIM, R. S. Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy. **Journal of Chromatography**, v. 1095, p.75-86, 2018.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SILVA, Cleidiane da et al. Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR–FT-IR Spectroscopy



and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, Pato Branco, v. 11, n. 7, p.2013-2021, 14 fev. 2018. Springer Nature

SILVA, R. P. D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2017.

SILVA, R. A. *et al.* Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil, **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W.; SANGUANDEEKUL, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 1, p.22-27, 2012.

SKABA, Dariusz *et al.* Influence of the Toothpaste with Brazilian Ethanol Extract Propolis on the Oral Cavity Health. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2013, p.1-12, 2013. Hindawi Limited.

SOARES, A. L. F. *et al.* Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Revista Gestão em Foco**, n. 9, p. 255-275, 2017.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2015.

TIVERON, A. P. *et al.* Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 1-11, 2016.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ABUBAKAR, M. B.; ABDULLAH, W. Z.; SULAIMAN, S. A.; ANG, B. S. Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-11, 2014.

AL-DAAMY, A. A-H.; AMEER, H. A-A, ZUHER, H. Antifungal activity of propolis against dermatophytes and *Candida albicans* isolated from human mouth, **Journal of Contemporary Medical Sciences**, v. 1, n. 3, p.4-8, 2015.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.

ARAUJO, M. A. R. et al. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 208-219, 2012.

BAPTISTA, N. U. F. **Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado), Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

BAYRAM, N. E. et al. Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari, Turkey. **Records of Natural Products**, v. 12, n. 6, p. 569 - 581, 2018.

BENHANIFIA, M.; MOHAMED, W. Phenolics constituents of different types of propolis and their antimicrobial activities. **Anti-Infective Agents**, v. 13, n. 1, p. 17-27, 2015.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, n. 76, p. 449–457, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 24/2011** de 14 de junho de 2011. Aprova o regulamento técnico que estabelece os requisitos para o registro e a renovação de registro de medicamentos específicos. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

CASTRO, M. L. et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 25, 2009.

CHUNG, P. Y.; CHUNG, L. Y.; NAVARATNAM, P. Identification, by gene expression profiling analysis, of novel gene targets in *Staphylococcus aureus* treated with betulinaldehyde. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 4, p. 319-326, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; Approved standard – 11<sup>th</sup> Ed.** CLSI, 2012. (CLSI document M07-A9).

COELHO, G. R. et al. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-10, 2015.

CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-20, 2017.

DA SILVA, C. et al. Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FT-IR spectroscopy and chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2013-2021, 2018.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 3, p. 186-199, 2010.

FERNANDES, F. H. et al. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research Internacional**, v. 62, p. 20–26, 2014.

FIGUEIREDO, S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; ALMEIDA, B. D. E. M.; ABREU, S. R. L.; DE ABREU, J. A. S.; FILHO, S. A. V., et al. Immunomodulatory Properties of Green Propolis. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 8, p. 85–94, 2014.

FRANCHI, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, p.1-6, 2012.

FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 2, p.122-132, 2016.

GOMES, M. F. F. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, 2016.

GUIMARÃES, Natalia SS et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 1091-1097, 2012.

JIANG, Y. et al. Chrysin suppressed inflammatory responses and the inducible nitric oxide synthase pathway after spinal cord injury in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12270-12279, 2014.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

KUNRATH, C. A. et al. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p.1-10 ,2017.

KUREK-GÓRECKA, A. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, n 1, p. 78-101, 2014.

LIMA, M. G. (2006). **A produção de própolis no Brasil**. São Paulo: São Sebastião. 120p.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis, **Food Chemistry**, v. 146, n. 1, p. 174-180, 2014.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447, 2008.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil, **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2016.

NAKAJIMA, Y. et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative medicine**, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2009.

NASCIMENTO, A. P. et al. Methodologies for the evaluation of antibacterial activity of propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v 7, n.20, p. 2344-2350, 2013.

NASCIMENTO, C. S. et al. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 30, n. 1, p. 334-339, 2009.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379-86, 2008.

ORSI, R. O. et al. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against Salmonella Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. **Natural product research**, v. 26, n. 5, p. 430-437, 2012.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 469-483, 2018.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PONTES, M. L. C. et al. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 34-39, 2018.

RUFATTO, L. C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 925–936, 2011.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHABBIR, A.; RASHID, M.; TIPU, H. N. Propolis, a hope for the future in treating resistant periodontal pathogens. **Cureus**, v. 8, n. 7, p.2-12, 2016.

SILVA, R. P. D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2017.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex

natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-29, 2015.

SOARES, A. L. F. et al. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Revista gestão em foco**, n. 9, p. 255-275, 2017.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2015.

TAKEMURA, T. et al. 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a major constituent of brazilian propolis, increases trail expression and extends the lifetimes of mice infected with the influenza A virus. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2012.

TAVARES, L. S. et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1-11, 2013.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 1-11, 2016.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p.1-11, 2013.

YILDIRIM, A. et al. Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. **Medical Science Monitor**, v. 22, p.422-430, 2016.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1 – Testes de CMB dos extratos de própolis

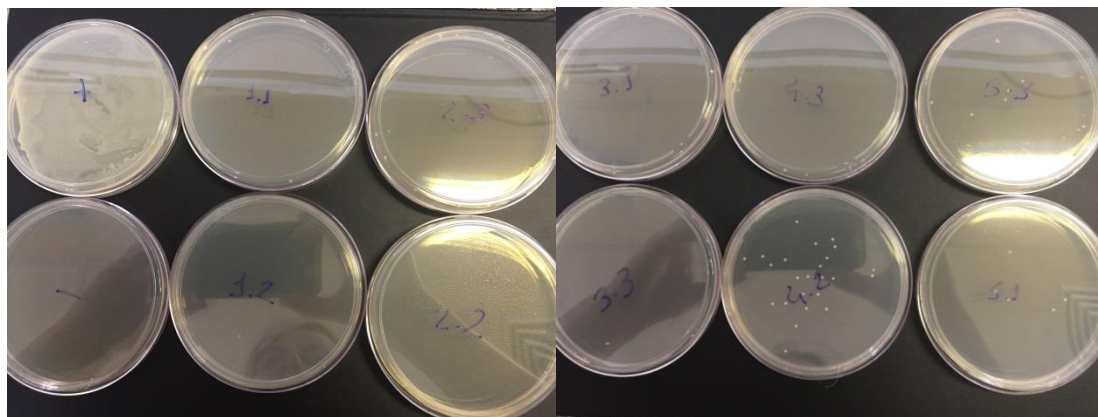


FIGURA 1 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde da marca A: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

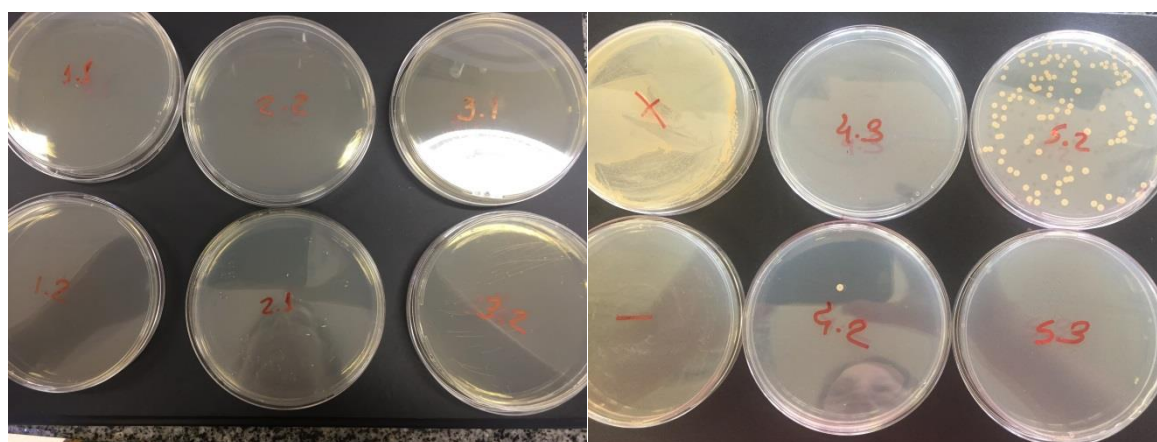
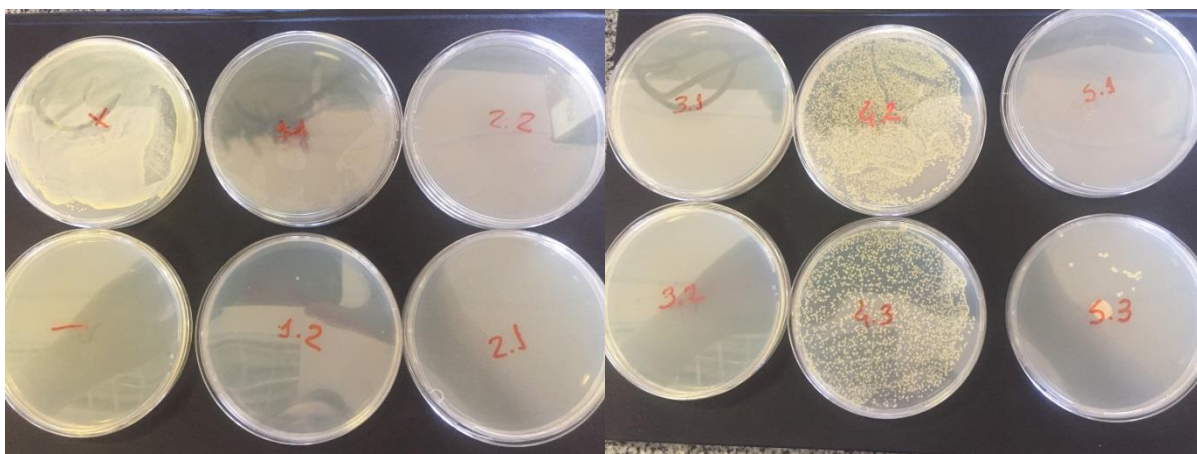
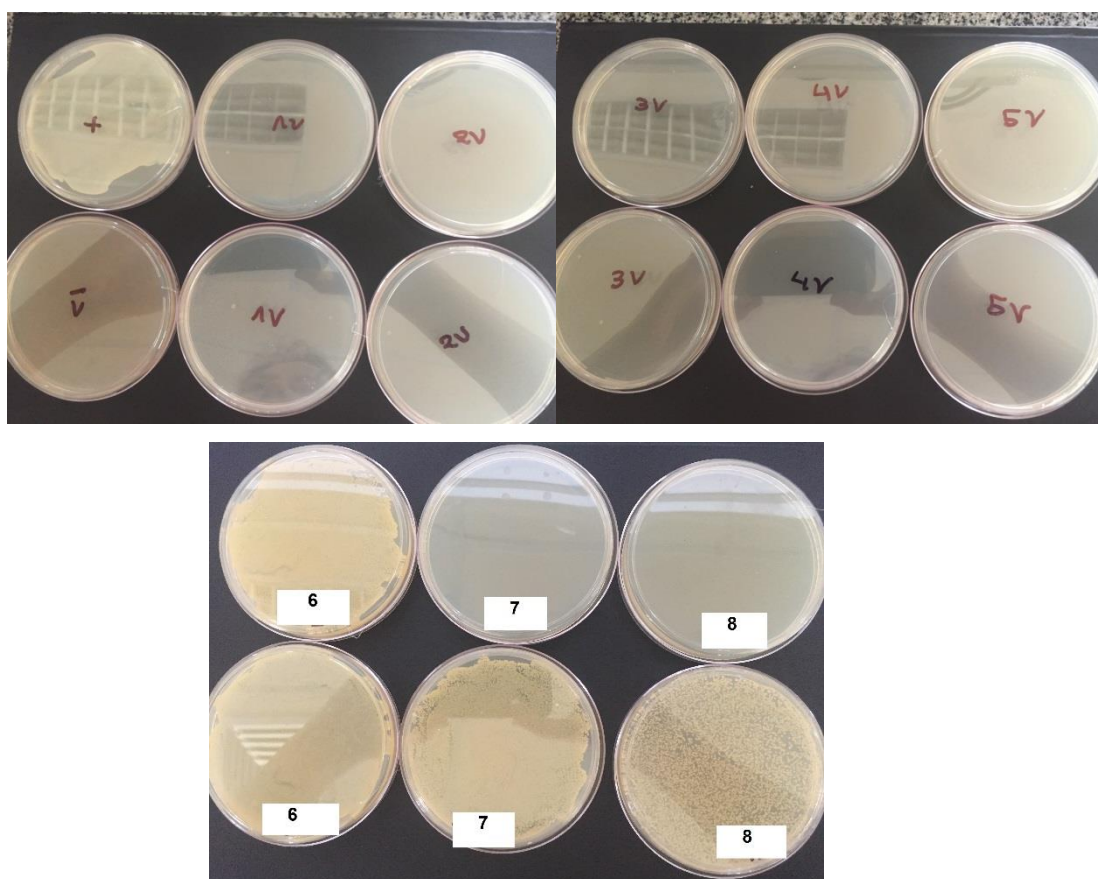


FIGURA 2 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Marrom: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

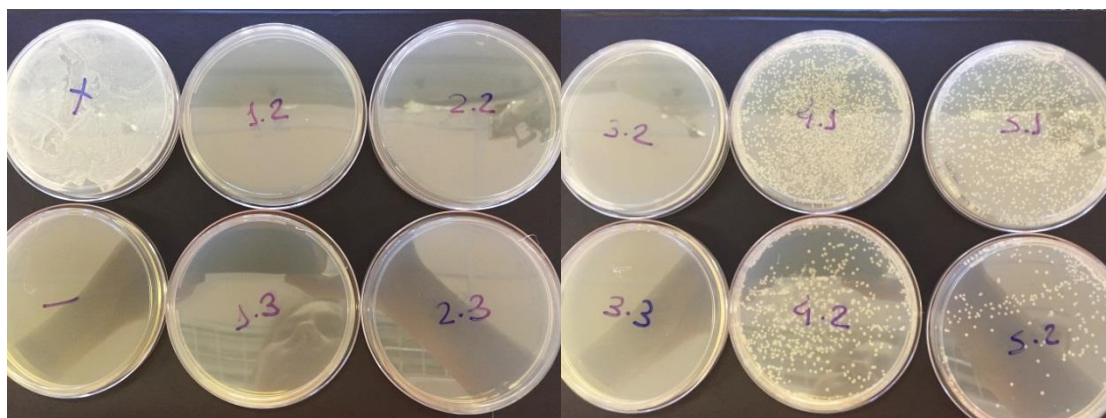




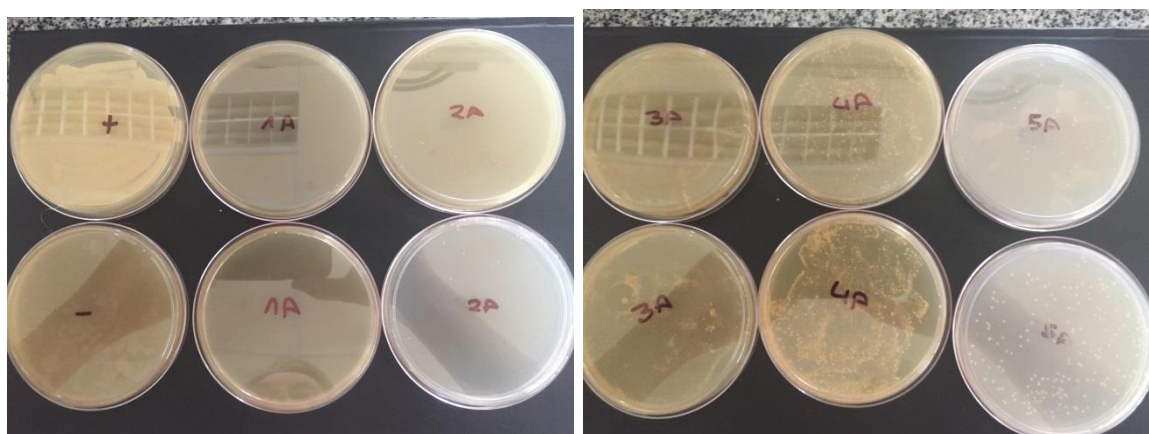
**FIGURA 3 –** Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde da marca B: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



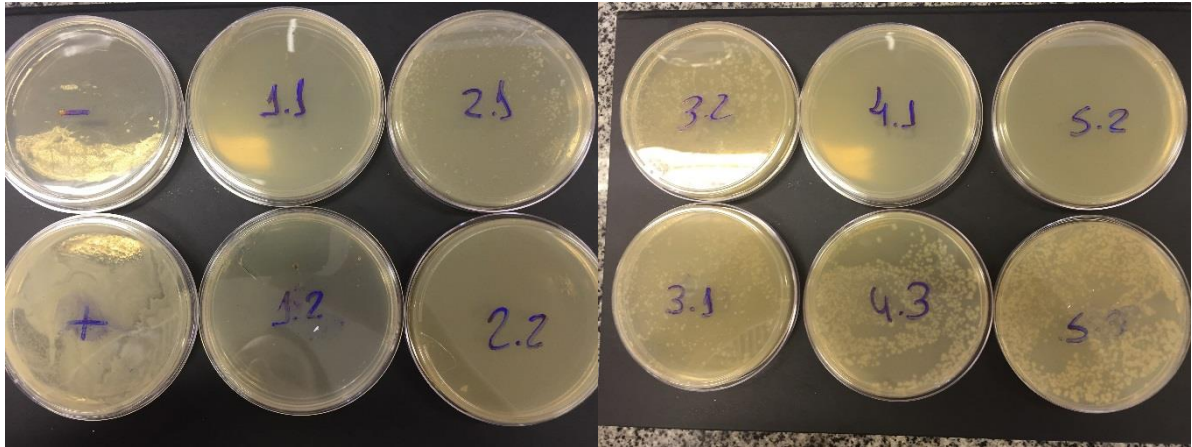
**FIGURA 4 –** Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Vermelha: 1- 40 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL; 4- 10 mg/mL; 5- 8 mg/mL; 6- 6 mg/mL; 7- 4 mg/mL; 8- 3 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



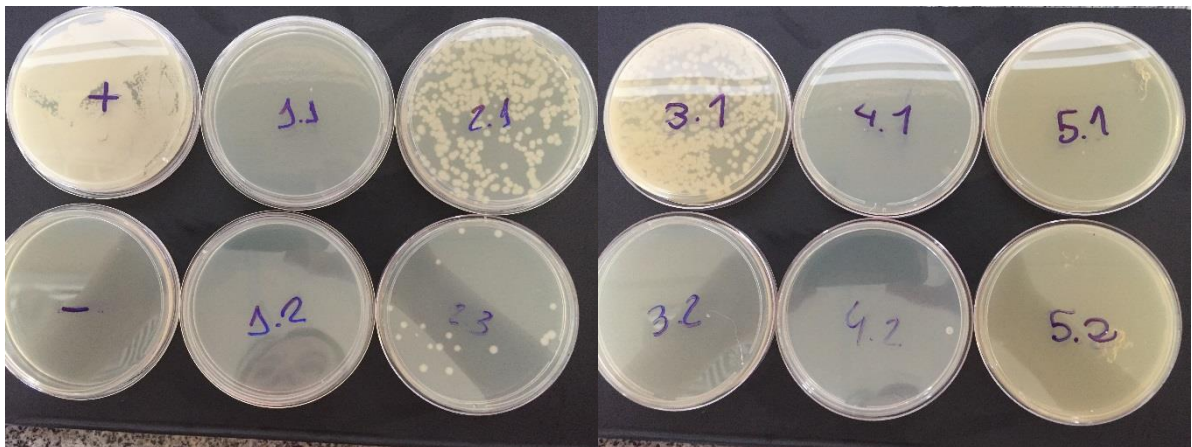
**FIGURA 5 –** Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde com 70% de própolis in natura: 1- 120 mg/mL; 2- 60 mg/mL; 3- 40 mg/mL; 4- 30 mg/mL; 5- 25 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



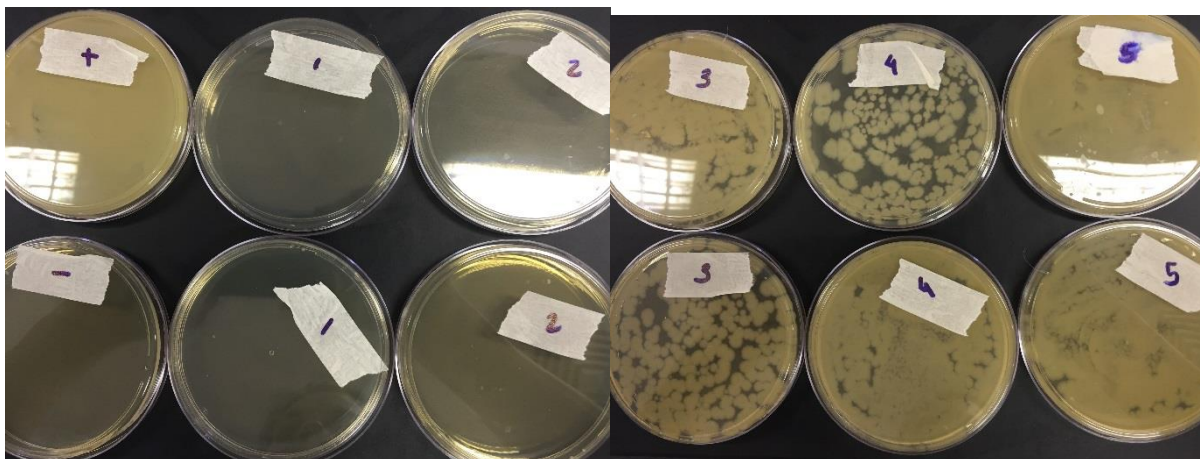
**FIGURA 6 –** Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Aquoso: 1- 190 mg/mL; 2- 95 mg/mL; 3- 65 mg/mL; 4- 45 mg/mL; 5- 40 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



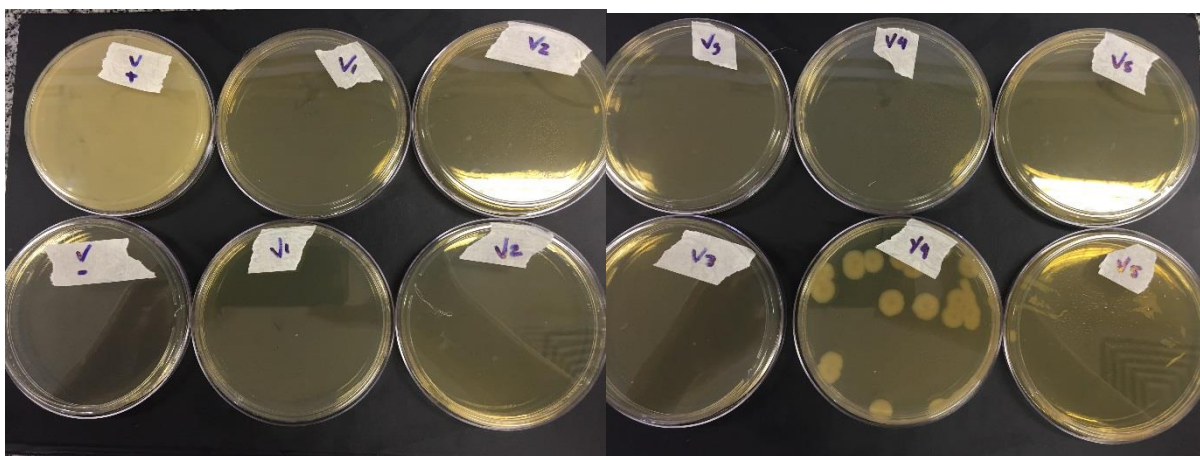
**FIGURA 7 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde marca A: 1- 9 mg/mL; 2- 6 mg/mL; 3- 5 mg/mL; 4- 4 mg/mL; 5- 3 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



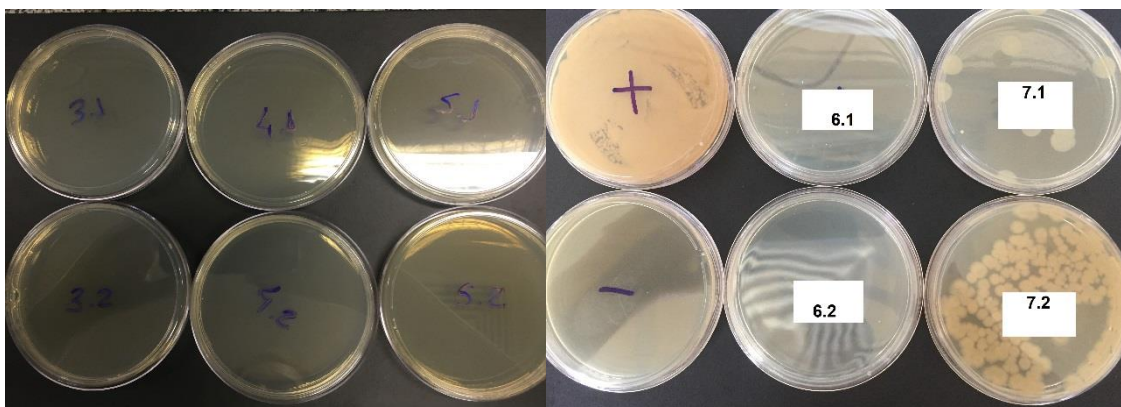
**FIGURA 8 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Marrom: 1- 9 mg/mL; 2- 6 mg/mL; 3- 5 mg/mL; 4- 4 mg/mL; 5- 3 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



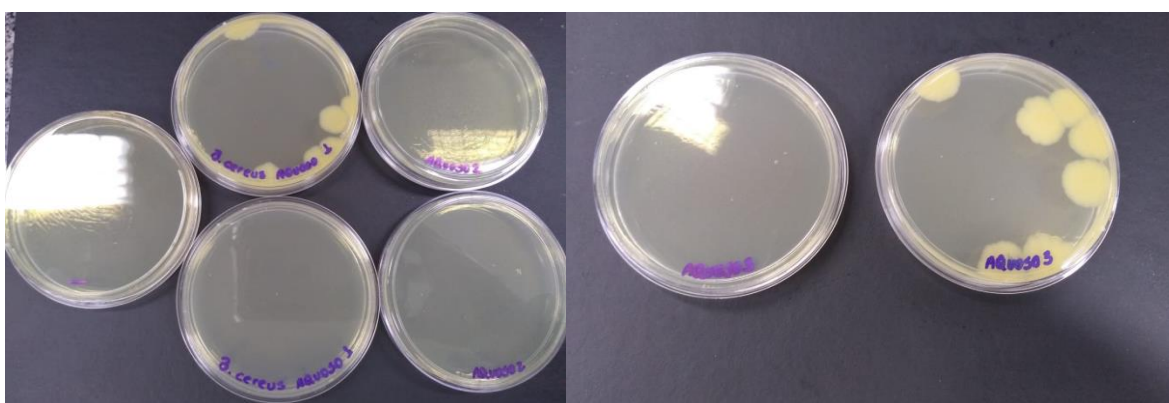
**FIGURA 9 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde marca B: 1- 9 mg/mL; 2- 6 mg/mL; 3- 5 mg/mL; 4- 4 mg/mL; 5- 3 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



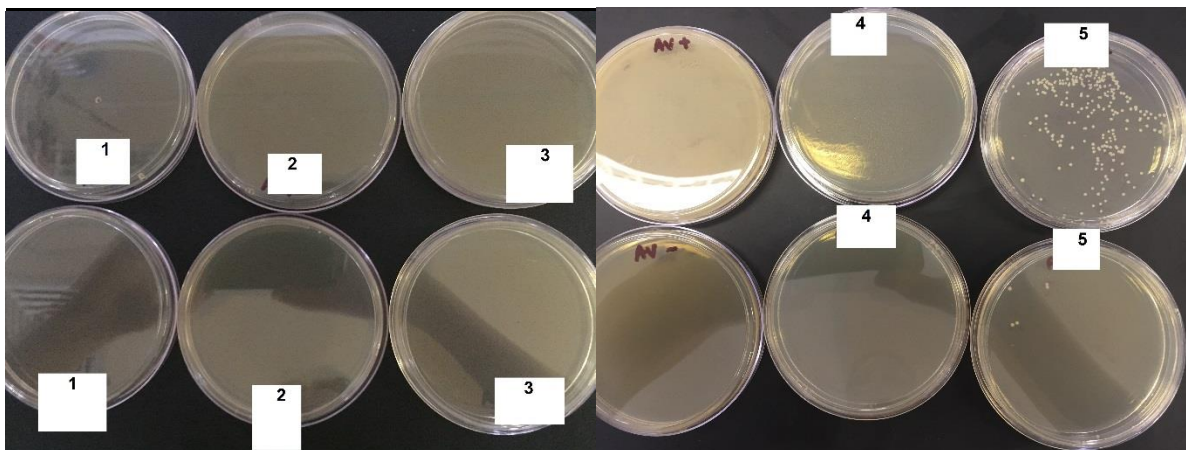
**FIGURA 10 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Vermelha: 1- 6 mg/mL; 2- 4 mg/mL; 3- 3 mg/mL; 4- 2,5 mg/mL; 5- 2 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



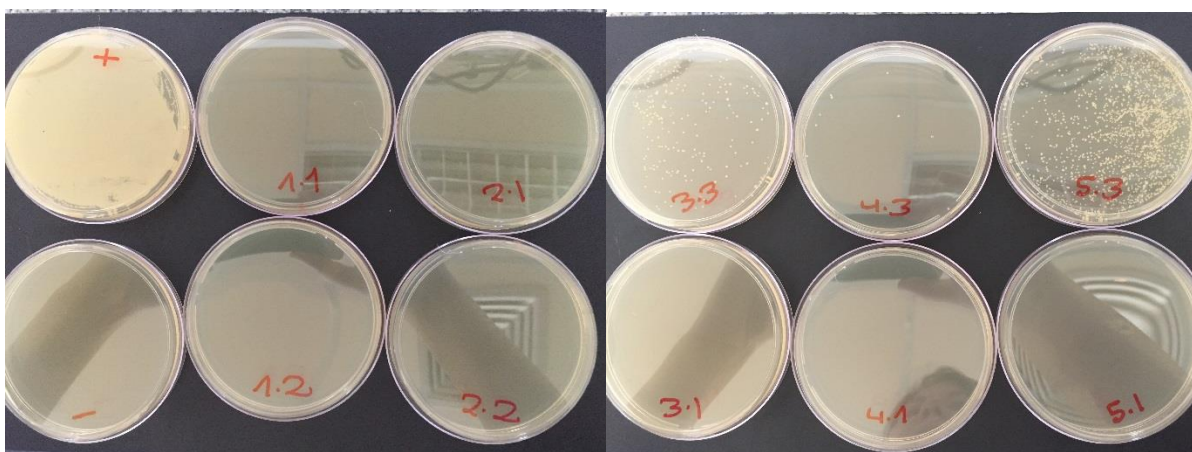
**FIGURA 11 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde com 70% de própolis in natura: 3- 40 mg/mL; 4- 30 mg/mL; 5- 25 mg/mL; 6-18 mg/mL; 7- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



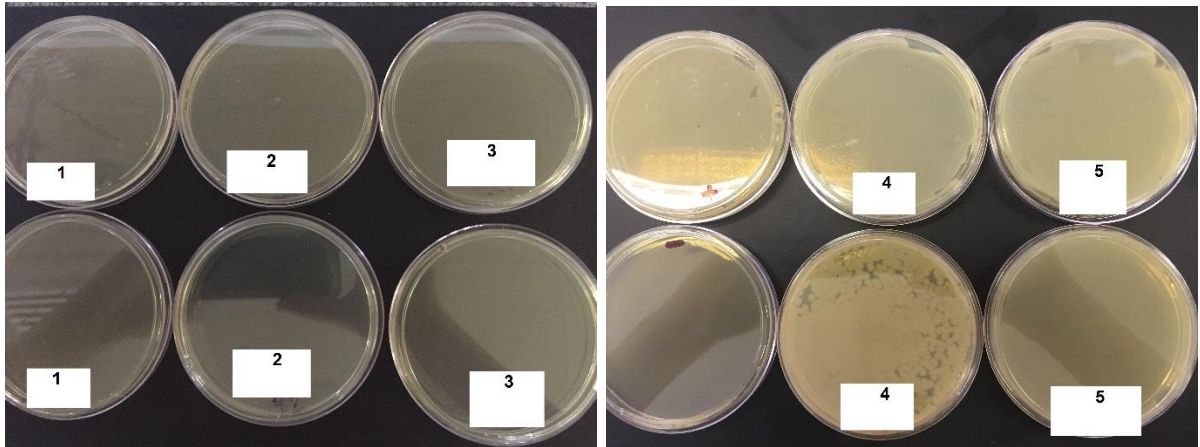
**FIGURA 12 –** Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Aquoso: 1- 30 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL e (-) = controle negativo.



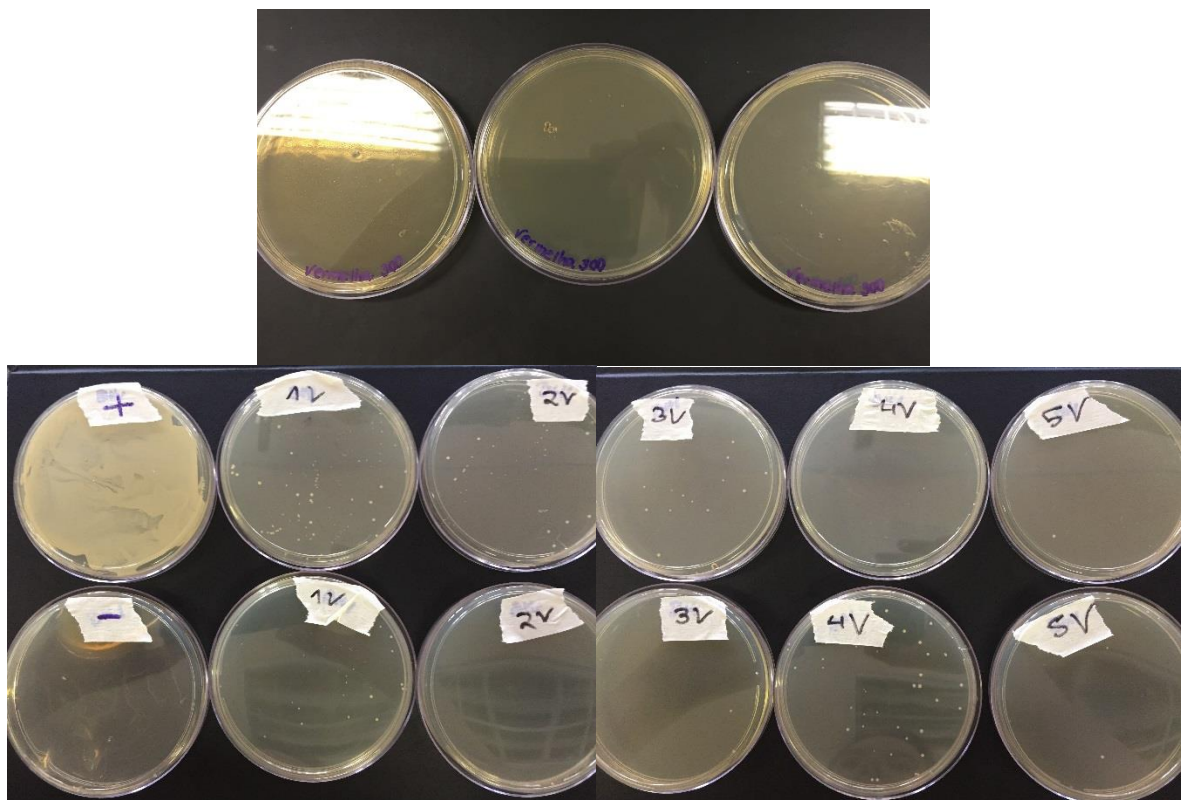
**FIGURA 13 –** Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde marca A: 1- 20 mg/mL; 2- 15 mg/mL; 3- 12 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



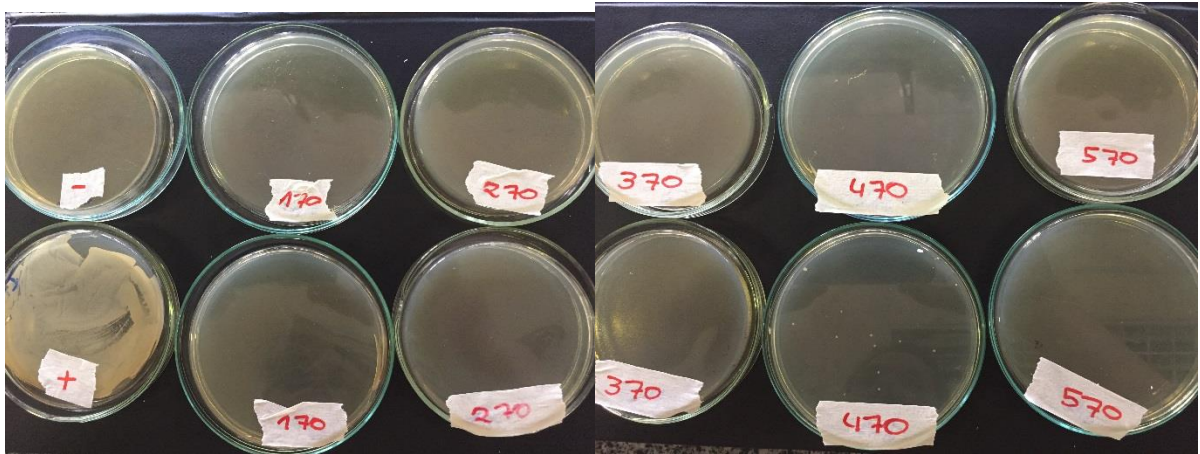
**FIGURA 14 –** Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Marrom: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 5 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



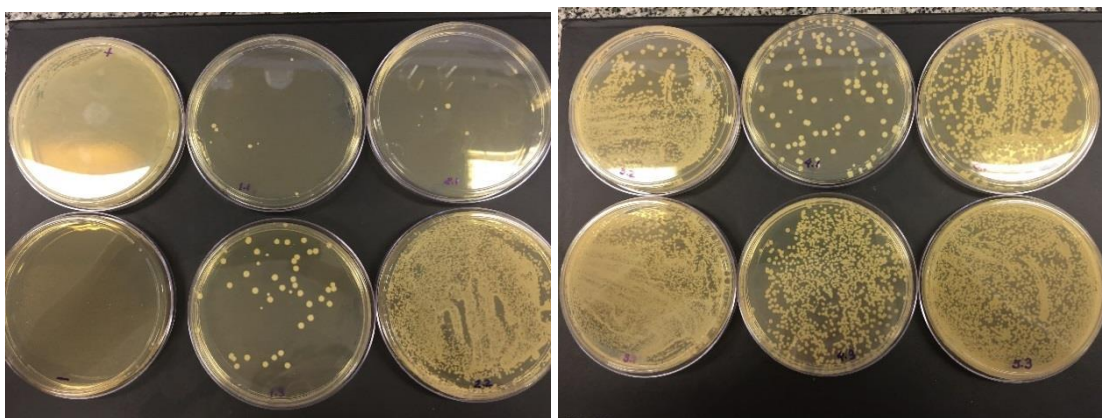
**FIGURA 15 –** Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde marca B: 1- 20 mg/mL; 2- 15 mg/mL; 3- 12 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



**FIGURA 16 –** Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Vermelha: 13 mg/mL; 1- 10 mg/mL; 2- 8 mg/mL; 3- 6 mg/mL; 4- 4 mg/mL; 5- 3 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



**FIGURA 17** – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Verde com 70% de própolis in natura: 1- 30 mg/mL; 2- 24 mg/mL; 3- 18 mg/mL; 4- 12 mg/mL; 5- 8 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



**FIGURA 18** – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis Aquosa: 1- 45 mg/mL; 2- 40 mg/mL; 3- 30 mg/mL; 4- 20 mg/mL; 5- 10 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



## ANEXO 2- NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

**Arquivos do Instituto Biológico** aims to publish original high quality scientific articles, which contribute significantly to the development of the Agricultural Sciences, in the field of animal and vegetal sanity, related to agribusiness and its implication in the agri-environment, including quality and food safety. It is also accepted papers on urban pests. The journal supports and follows the principles and standards recommended by COPE (Committee on Publication Ethics), an international organization reference on integrity and ethics in scientific publishing. Thus, the entire process, selection criteria and journal publication follow the conduct rules and ethics in accordance with [http://publicationethics.org/files/u2/New\\_Code.pdf](http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf).

It is mandatory to include the ORCID of the corresponding author at the time of submission of the manuscript. After acceptance, the inclusion of ORCID of all authors will be required.

A cover letter should come along with the manuscript describing the importance of the work in the field, qualifying it for publication in **Arquivos do Instituto Biológico**. In addition, a statement signed by the corresponding author on behalf of all authors, must be attached as a supplementary document in the designated area in the online system where the authors state that:

a) the data contained in the manuscript is original and authentic, so there is no fraud and/or plagiarism derivations (all received manuscripts are subjected to a software to detect plagiarism); b) the manuscript was not submitted for publication in any other printed or electronic vehicle; c) the manuscript content is authors' responsibility, who assume they have contributed significantly to research and must provide retractions or correct mistakes if necessary. In case of doubt, see the [Singapore Statement](#); d) in case of conflicts of interest, they will be manifesting, which will subsequently be examined by the Editorial Committee.

Additional information:  
Studies involving: 1- animal experimentation and/or genetically modified organisms

must be approved by the Ethics and Biosafety Committee, mentioning the process number in the paper and a copy of the approval provided by the correspondent responsible Committee of the author's home institution must be forwarded; 2- plants must have the prior registration and deposit of this material (vouchers) in registered collections and accessible to the public, with the inclusion of its identification number on the manuscript. 3- DNA sequences must have the accession number in enabled databases informed in the manuscript.

The manuscripts submitted to ***Arquivos do Instituto Biológico*** are preliminarily analysed by the Editorial Committee. During the pre-analysis, the Committee checks if it fits in the scope and merit for publication. The manuscripts that do not match the editorial requirements or that need to be redrafted will be rejected without a review. The preselected manuscripts will be submitted to critical analysis of at least 2 Scientific Consultants (ad hoc) chosen by specialists in the field of the submitted article. The Scientific Consultant also fills an evaluation form. The acceptance of the article is in agreement with the Editor-in-chief of the Editorial Committee. In case the article is rejected by part of the Scientific Consultants, the Associate-Editor will issue his conclusive technical opinion. The reviews and the conclusive technical opinion will be forwarded to the authors for corrections, justifications and presentation of the new version of the draft, which is compared to the original version by the Editor-in-chief of the Editorial Committee. Once it is accepted, the article is forwarded to reference, abstract and vernacular review. After the layout change, the text is submitted to final corrections by the authors and by the Editorial Committee. All articles are published following the approval order.

The fare for publication in the journal ***Arquivos do Instituto Biológico*** is R\$ 80,00 (eighty Brazilian reais) per diagrammed page.

After the work is accepted, as communicated by the editor-in-chief, the authors must deposit the total amount of this fee to the account Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) [Banco do Brasil (001), bank branch 4328-1, bank account 30.200-7 or Banco Santander (033), bank branch 0637, bank account 13-001316-

9]. A copy of the proof of deposit must be sent by e-mail, mentioning the paper's publication ID number: [arquivos@biologico.sp.gov.br](mailto:arquivos@biologico.sp.gov.br)

### **Form and preparation of manuscripts**

To be considered for publication, the work must be either a scientific article or scientific communication, although the Editorial Committee will also accept review articles, at its discretion.

**Scientific article:** consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments and references.

**Scientific communication:** consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, acknowledgments and references. Scientific publication is a brief report, its publication is immediate as this is an relevant original fact but its content is insufficient for a scientific article.

**Review article:** consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, and references.

**Presentation:** the works must be submitted in Microsoft WORD format (.doc or .docx), page-size A4, margins 2.5 cm, size 12 Times New Roman font, double spaced, with continuous page numbering using the Layout tool in the Page Setup or Page Layout menu item. The maximum number of pages is 25 for review articles, 20 for scientific articles and 10 for scientific communications, including tables and figures.

**Language:** the paper can be written and submitted in Portuguese or English. After the acceptance, the article submitted in Portuguese should be translated into English, with an abstract in Portuguese.

**Title:** although brief, the title should tell precisely what the article is about, focusing on its main purpose.

**Name (s) and Address (es) of the author(s):** should not be included in the manuscript body because *Arquivos do Instituto Biológico* uses double blind peer review. This information should be inserted in the specific field of the online submission system.

**Abstract:** should concisely present the aim of the work, the materials and methods and conclusions, in a single paragraph. The length must not exceed 250 words.

**Keywords:** under the abstract and separated by a space, provide at most five keywords separated by commas. Avoid terms that appear in the title.

**Translation of title, abstract and keywords:** Manuscript in English must provide a translation of the title, abstract and keywords in Portuguese. The length of the abstract must not exceed 250 words.

**Introduction:** describe the nature and the purpose of the work, its relation with other research studies in the context of existing knowledge, along with the reason why the present study was carried out.

**Material and methods:** present a description that is brief yet sufficient to allow for the repetition of the work. Previously published techniques and processes, except when modified, should be merely cited. Scientific names of species and of drugs should be cited in accordance with international standards.

**Results:** accompanied by tables and/or figures when necessary. The tables and figures should be inserted after the references.

**Discussion:** discuss the results obtained, comparing them with those of other published works (results and discussion may be combined within a single section).

**Tables and figures:** include a clear and concise title that allows the table or figure to be understood without consulting the text. The tables should not contain vertical lines. In the text, use the abbreviated word (e.g.: Fig. 3). The figures must be in the format jpg (photos) or gif (graphics and diagrams), of a size less than 500 Kb. The original or higher-definition figures will be requested after the submission is approved for publication. These should be sent in individual files and named according to the number of the figure, for example Fig1.gif, Fig2.jpg.

**Conclusions:** presented in their order of importance. They can be given in a separate section or as part of the discussion.

**Acknowledgments:** these may refer to people and/or institutions. In case of funding agency, the financing process number must be included.

**References and citations in the text:** the citations in the text and references are directly linked. It is recommended around 25 references to articles and scientific communications. All of the authors cited should be included in the references. The citation of authors should be presented in the format of author's last name and the year of the publication, and should be in uppercase, for example: one author ALLAN (1979) or (ALLAN, 1979); two authors – LOPES; MACEDO (1982) or (LOPES; MACEDO, 1982); more than two authors – BESSE et al. (1990) or (BESSE et al., 1990); coincidences of authors or year of publication – (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) or (CURI, 1998a, 1998b). The references should be formatted according to NBR 6023/2018, of the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), and be in alphabetical order by first author, as in the examples in the following link:

The following examples will serve as a guideline for the formatting and presentation of references:

**a) Periodical article**

ANDRÉA, M.M. ; PETTINELLII JÚNIOR, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

**b) Article in periodical published on Internet**

FELÍCIO, J.D.; SANTOS, R. da S.; GONÇALES, E. Componentes químicos de *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.47-50, 2001. Available from:[http://www.biologico.br/arquivos/v68\\_1/9](http://www.biologico.br/arquivos/v68_1/9). Access on: 5 mar. 2002.

**c) Entire books, brochures, etc.**

BECKMANN, N. (ed.). *Carbon-13 NMR spectroscopy of biological systems*. San Diego: Academic Press, 1995. 334p.

**d) Part of a book (chapter, passage, fragment, etc.)**

**Chapter or part without specific authorship – author of the part is the same author as the overall work**

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: \_\_\_\_\_. *Molecular biology of the cell*. 3th.ed. New York: Garland Publications, 1994. 1294p. Chap. 19.

**Part with specific authorship**

BANIJAMALI, A. Thyroid function and thyroid drugs. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. (ed). *Principles of medicinal chemistry*. 4th. Ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1995. chap.30, p.688-704.

**Send of the manuscripts**

The original should be submitted only in electronic form at the address <https://mc04.manuscriptcentral.com/aib-scielo>.

**Submission fee**

The submission fee is R\$60.00 (sixty Brazilian reals), and a copy of the

proof of deposit must be attached in the system as a Supplemental File NOT for Review. Only articles with a paid submission fee will be evaluated. The deposit of the submission fee must be made on behalf of the Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) [Banco do Brasil (001), bank branch 4328-1, bank account 30.200-7 or Banco Santander (033), bank branch 0637, bank account 13-001316-9].