

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

MESTRADO EM NUTRIÇÃO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROENCAPSULADOS DE
PRÓPOLIS VERMELHA**

AMALIA LUISA IVO ALBUQUERQUE

MACEIÓ-2015

AMALIA LUISA IVO ALBUQUERQUE

***ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
MICROENCAPSULADOS DE PRÓPOLIS VERMELHA***

Dissertação apresentada à
Faculdade de Nutrição da
Universidade Federal de Alagoas
como requisito à obtenção do título
de Mestre em Nutrição.

Orientador(a): **Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior**
Escola de Enfermagem e Farmácia/ Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientador(a): **Prof(a). Dr(a) Maria Cristina Delgado da Silva**
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ-2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

A345a Albuquerque, Amalia Luisa Ivo.
 Atividade antimicrobiana de microencapsulados de própolis vermelha /
 Amalia Luisa Ivo Albuquerque. – 2016.
 71 f. : il.

Orientador: Irinaldo Diniz Basílio Júnior.
Coorientadora: Maria Cristina Delgado da Silva.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió,
2015.

Inclui Bibliografia.

1. Própolis vermelha. 2. Microencapsulados. 3. Flavonoides. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDU: 612.39: 543.645.9



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160


**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROENCAPSULADOS DE
PRÓPOLIS VERMELHA**

por

Amalia Luisa Ivo Albuquerque

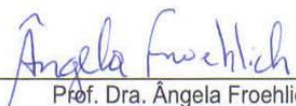
A Banca Examinadora, reunida aos 17 dias do mês de Junho do ano de 2015, considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.



Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Escola de Enfermagem e Farmácia/ Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Ticiano Gomes do Nascimento.

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Escola de Enfermagem e Farmácia/ Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)



Prof. Dra. Ângela Froehlich
Tecnologia em Laticínios
Instituto Federal de Alagoas
(Examinador)

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho aos meus pais, Eli e Junia, por terem permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilharem as angústias e dúvidas, e por estarem sempre presentes em momentos difíceis. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu Deus, pelo dom da vida, e pela fé para encarar com serenidade as dificuldades do cotidiano. Obrigada, Senhor!

Aos meus pais, Eli e Junia, pelo amor e apoio em minha aventura pela ciência. Obrigada por serem sempre uma luz no fim do túnel e por serem os maiores exemplos que tive na vida.

Ao meu esposo, Victor, por sempre oferecer palavras de incentivo e conforto nos dias mais difíceis. E ao Fidel, nosso filho de quatro patas, que sempre se mostrou fiel.

À minha família pelo amor e compreensão e por serem para mim exemplos de honestidade e respeito, aos quais seguirei por toda minha vida. Em especial, aos meus irmãos queridos, Felipe e Rebecca, e aos meus sobrinhos, Guilherme, Marília, Isabel e Heitor, pelo carinho e pelas alegrias que me proporcionaram. Também agradeço a minha vovó Amalia, pela ternura e pelos ensinamentos.

À minha orientadora, Maria Cristina Delgado, que desde a graduação com paciência e dedicação me passou seus conhecimentos para a pesquisa e para a vida, e sempre me incentivou a buscar o meu melhor. Obrigada por ter me aceitado como sua aluna por todos esses anos.

Ao meu orientador, Irinaldo Diniz, que confiou no meu trabalho e aceitou me orientar, fazendo isto sempre com toda paciência.

Aos Estagiários do Laboratório de Controle da Qualidade de Alimentos e ao Cantídio, nosso técnico, pelo companheirismo e ajuda nas análises.

À Érika Nataly, bolsista de iniciação científica, que foi mais do que uma parceira nas pesquisas e se tornou grande amiga para a vida. Meu muito obrigado!

A todos meus amigos, que tornaram o caminho mais fácil, sempre trazendo alegrias ao meu cotidiano. Agradeço também pela compreensão da minha ausência, em vários momentos.

Agradeço também a todos os amigos de mestrado que compartilharam comigo conhecimento, e angústias, me fazendo entender que não estava sozinha, em especial aos amigos Victor Carnaúba, Wanessa Pereira e Juliana Moraes, que tornaram essa caminhada mais leve.

Aos professores da Faculdade de Nutrição (FANUT) e Faculdade de Farmácia (ESENFAR), em especial, ao professor Ticiano, com seus ensinamentos que foram fundamentais para execução desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGNUT), em especial à Amanda, por ser sempre prestativa e solícita.

À CAPES, pela concessão da bolsa que me viabilizou a participação como discente desse programa.

Agradeço aos professores Ângela Froehlich e Ticiano Gomes por terem aceitado participar de minha banca e por todas as contribuições ao trabalho.

À todos que, de alguma forma, colaboraram para este trabalho ser realizado.

Finalizando, essa conquista não é só minha; ela também é de cada um vocês.

Com amor,
à todos, agradeço!

RESUMO GERAL

A comercialização de produtos obtidos da abelha (*Apis mellifera*) como o mel e a própolis vem se tornando frequente no Brasil, visivelmente perceptível com a crescente implantação de microindústrias de produtos à base de mel e própolis. O uso popular cada vez mais crescente de própolis e seus derivados com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogênica e imunomodulatória vêm demonstrando o grande poder terapêutico. Em decorrência disso, novos produtos contendo própolis estão sendo desenvolvidos, tais como, os microencapsulados. A depender do método empregado, tais microencapsulados podem resultar em um produto final com características negativas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil microbiológico de microencapsulados da própolis vermelha obtidas pela técnicas de secagem *spray-drying* e liofilização. A própolis vermelha foi obtida de apiários localizados na região de mangue do município de Marechal Deodoro / AL. A amostra foi coletada no período de fevereiro a março do ano 2012. A partir do extrato, foram preparadas 4 formulações que variaram na quantidade de extrato etanólico de própolis vermelha, bem como em proporções diferentes de excipientes. Duas técnicas de secagem (*spray-drying* e liofilização) foram empregadas, resultando em 8 amostras de microencapsulados, porém, destas, foram escolhidas 4 formulações (duas de cada técnica de secagem) para realizar os testes. Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram realizadas as determinações do teor de Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM) através da técnica de microdiluição em caldo frente à cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). Os biomarcadores da própolis vermelha foram identificados usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detector de Ultra-Violeta. Os microencapsulados apresentaram atividade antimicrobiana para todos os microrganismos estudados, porém com diferenças na CIM. Bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis que bactérias Gram negativas. Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto e das formulações a base de própolis vermelha demonstraram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção. Os microencapsulados testados podem ser considerados candidatos a otimização de amostras a base de própolis vermelha. Tais resultados permitirão um controle de qualidade e, até uma futura padronização de produtos naturais e nutracêuticos, a fim de obter produtos com constância de composição e propriedades alimentícias adequadas.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis vermelha, microencapsulados, flavonoides, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The marketing of products obtained from the bee (*Apis mellifera*) as honey and propolis has become common in Brazil, visibly noticeable with the increasing deployment of microindustries of products based on honey and propolis. The popular use of ever-increasing propolis and their derivatives with antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, immunomodulatory and anticarcinogenic have demonstrated the great therapeutic power. As a result, new products containing propolis are being developed, such as the microencapsulated. Depending on the method used, such microencapsulated may result in a final product with negative characteristics. Given the above, this study aimed to evaluate the microbiological profile of the microencapsulated propolis obtained by drying techniques spray-drying and freeze drying. The propolis was obtained from apiaries located in the mangrove area of the municipality of Marechal Deodoro / AL. The sample was collected from February to March 2012. From the extract were prepared 4 formulations varying the amount of ethanol extract of propolis, as well as different proportions of excipients. Two techniques drying (spray drying and freeze drying) were used, resulting in 8 samples of microencapsulated. However, these, 4 were selected formulations (each two drying technique) to perform the tests. To evaluate the antimicrobial activity, the determination was made of the content of Inhibitory Concentrations and Minimum Bactericidal (MIC and MBC) through the microdilution technique in broth front of the standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). Biomarkers of propolis were identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to Ultra-Violet detector. The microencapsulated presented antimicrobial activity for all microorganisms studied, but with differences in the CIM. Gram positive bacteria were more susceptible than Gram negative bacteria. The chromatograms obtained by liquid chromatography of high efficiency in crude extracts and formulations propolis base showed a complex chemical composition, with several peaks at different retention times. The microencapsulated tested can be considered candidates for optimization samples propolis base. These results will allow a quality control and, until a future standardization of natural products and nutraceuticals, in order to obtain products with composition of consistency and appropriate nutritional properties.

KEYWORDS: Red propolis, microencapsulated, flavonoids, antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Artigo II: Artigo de Resultados

Figura 1	Preparo das formulações.	41
Figura 2	Atomização (<i>spray-drying</i>) das formulações a base de própolis vermelha.	42
Figura 3	Liofilização das formulações a base de própolis vermelha.	43
Figura 4	(F1 _{SP}), (F2 _{SP}), (F3 _{SP}) e (F4 _{SP}): Pós Atomizados (<i>Spray Dryer</i>)	47
Figura 5	(F1 _L), (F2 _L), (F3 _L) e (F4 _L): Pós Liofilizados.	48
Figura 6	Padrões autênticos identificados de isoflavonas utilizados no estudo.	49
Figura 7	Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes no extrato bruto da própolis vermelha. (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.	49
Figura 8	Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na Formulação 1 (<i>Spray-Dryer</i>). (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.	50
Figura9	Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na Formulação 2 (liofilizada). (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.	51
Figura10	Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na Formulação 4 (Liofilizada). (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.	51
Figura11	Halos de inibição das formulações. (A) F1 _{SP} frente à <i>S. aureus</i> ; (B) F1 _L frente à <i>E. coli</i> ; (C) F2 _{SP} frente à <i>L. monocytogenes</i> ; (D) F2 _L frente à <i>S. aureus</i> .	57
Figura12	Resultados após adição de revelador resazurina para determinação da CIM.	59

LISTA DE TABELAS

Página

Artigo II: Artigo de Resultados

Tabela 1	Percentual em massa dos excipientes nas formulações.	40
Tabela 2	Parâmetros do método cromatográfico.	44
Tabela 3	Proporção do solvente utilizado no sistema gradiente de eluição da fase móvel.	44
Tabela 4	Concentração de flavonoides ($\mu\text{g/mL}$) nos microencapsulados e extrato da própolis vermelha.	52
Tabela 5	Formulações liofilizada ($F1_L$) e atomizada ($F1_{SP}$) em comparação com a tintura de própolis vermelha frente à <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	53
Tabela 6	Formulações liofilizada ($F1_L$) e atomizada ($F1_{SP}$) em comparação com a tintura de própolis vermelha frente à <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	54
Tabela 7	Concentração Inibitória Mínima dos microencapsulados obtidos pelo liofilizador e <i>spray-dryer</i> .	58
Tabela 8	Concentração Bactericida Mínima dos microencapsulados obtidos pelo liofilizador e <i>spray-dryer</i> .	60

NOMENCLATURA

AL- Alagoas

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusion

CBM- Concentração Bactericida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EC- *Escherichia coli*

HPLC- High Performance/Pressure Liquid Chromatography

µL- Microlitro

MRS- Man, Rogosa e Sharpe

pH- Potencial de Hidrogênio

ID- Indicação Geográfica

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

TSB- *Tryptic Soy Broth*

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. COLETÂNEA DE ARTIGOS	18
ARTIGO I: Artigo de Revisão	19
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. DESENVOLVIMENTO	23
2.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	23
2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	24
2.3 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.....	25
2.4 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	26
2.5 ATIVIDADE OFTALMOLÓGICA.....	26
2.6 ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA.....	27
2.7 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA.....	27
3. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO II: Artigo de Resultados	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS.....	39

2,2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS.....	40
2.3	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROENCAPSULADOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS.....	40
2.3.1	Atomização das formulações – Spray Dryer.....	41
2.3.2	Liofilização das formulações.....	42
2.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS (CLAE-UV).....	43
2.4.1	Preparo das amostras.....	43
2.4.2	Condições do HPLC.....	43
2.5	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	45
2.5.1	Manutenção e estoque das cepas.....	45
2.5.2	Inóculo.....	45
2.5.3	Avaliação Preliminar da atividade antimicrobiana.....	45
2.5.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos microencapsulados.....	46
2.5.5	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos microencapsulados de própolis vermelha.....	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS (CLAE-UV).....	48
3.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	52
4	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	68

A resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um importante problema global. Dos dois milhões de pessoas que contraíram alguma doença de origem bacteriana nos hospitais dos Estados Unidos da América a cada ano, cerca de 70% dos casos envolvem cepas bacterianas que são resistentes a pelo menos uma droga (CUSHINE; LAMB, 2005).

Em resposta a resistência bacteriana, as principais indústrias farmacêuticas, juntamente com as universidades, têm concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com atividades antibacterianas (TAYLOR; STAPLETON; PAUL, 2002). Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiências e outras (CLARDY, WALSH, 2004).

Entre os produtos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; NAGAOKA et al., 2003; DUARTE et al., 2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; KUMASAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; HAYACIBARA et al., 2005; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (MATSUDA, 1994).

A própolis é produzida pelas abelhas a partir de substâncias vegetais coletadas das fontes botânicas presentes na proximidade do apiário. Existem estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que pode influenciar o seu potencial de ação (SFORCIN et al., 2000; CASTRO et al., 2007). A composição da própolis é reflexo da flora utilizada pelas abelhas (BURDOCK, 1998; RUSSO et al., 2002), podendo ser encontrada em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro (INOUE et al., 2007).

No Brasil, alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados pela coloração. Após o processamento e análise das amostras quanto à

aparência e coloração dos extratos, Park et al. (2000) classificaram as amostras de própolis brasileira em doze tipos, analisando as características físico-químicas e propriedades biológicas de material coletado em diferentes regiões brasileiras. Recentemente, um novo grupo da Mata Atlântica de Alagoas foi identificado e classificado como grupo 13, este apresenta uma potente ação biológica (ALENCAR et al., 2007).

No entanto, apesar de suas propriedades terapêuticas importantes, apresentam características organolépticas que dificultam a sua utilização e uma das soluções alternativas para atenuar o sabor amargo e o odor forte, e ainda desenvolver um produto intermediário que facilite a produção de produtos acabados é a microencapsulação, que podem ser obtidos por *spray-drying* e liofilização (Diário da Saúde- RS, 2010).

O desenvolvimento de produtos requer um controle de qualidade desde as matérias-primas até a obtenção de um produto acabado. Ainda mais, quando envolve produtos inovadores, como a obtenção de formulações à base de própolis vermelha de Alagoas. E por se tratar de um produto inovador, os ensaios iniciais devem ser extremamente rigorosos, para que as etapas complementares dos estudos pré-clínicos microbiológicos sejam condizentes e, portanto sirvam de estrutura base para outros ensaios decisivos para a liberação do produto para sua comercialização (BRASIL, 2004a). Estes estudos serão importantes para introduzir no mercado bioprodutos a base de própolis vermelha de Alagoas com qualidade assegurada, pois será possível, por exemplo, monitorar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das formulações, etapa esta significativa para a realização de futuros ensaios pré-clínicos *in vivo*.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de desenvolver formulações à base de própolis vermelha de Alagoas, e destas obter microencapsulados através das técnicas de secagem por atomização e liofilização. Além disso, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana destes produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a qualidade da matéria-prima própolis vermelha, seus produtos intermediários e/ou o(s) bioprodutos;
- Obter microencapsulados através das técnicas de secagem por atomização e liofilização;
- Caracterizar, através de ensaios microbiológicos (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima), a atividade antimicrobiana dos microencapsulados, bem como das tinturas;
- Identificar a presença dos isoflavonóides nas formulações com própolis vermelha através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV);
- Determinar o perfil químico e microbiológico da melhor formulação de microencapsulados de própolis vermelha.

ARTIGO 1: Artigo de Revisão

ALBUQUERQUE, ALI; JUNIOR, IDB; SILVA, MCD. Propriedades terapêuticas da Própolis: uma revisão de literatura narrativa.
Revista a que será submetido: A definir.

RESUMO

A utilização e abordagem de produtos naturais pela população sejam eles alimentos funcionais ou nutracêuticos, como fonte de produtos saudáveis/terapêuticos, vem se tornando crescente em detrimento aos produtos sintéticos. Própolis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) é um produto da colméia, elaborado a partir de exsudatos de resinas que as abelhas recolhem de determinadas plantas. Ultimamente, a própolis vem sendo um dos principais enfoques mundiais em pesquisas. Considerada um alimento funcional, a própolis apresenta diversas substâncias que são responsáveis por muitas atividades terapêuticas. A composição química da própolis é complexa e relacionada à diversidade vegetal encontrada em torno da colméia. Embora a própolis seja utilizada em medicina popular por milhares de anos, a falta de padrões que avaliem de maneira precisa suas atividades farmacológicas, dificulta a padronização de produtos comerciais que garanta sua eficácia e segurança terapêutica para humanos e outros animais. Nesta revisão de literatura estão expostos alguns desenvolvimentos recentes da pesquisa farmacológica da própolis, enfocando-se as atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antineoplásica, antiparasitária, antihiperlipidêmica e antihipertensiva.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis; *Apis mellifera*; propriedades terapêuticas.

ABSTRACT

The use and approach of natural products the population they are functional foods or nutraceuticals, as a source of health / medical products, is becoming increasingly over the synthetic products. Propolis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) is a product of the hive, drawn from exudates resin that bees collect from certain plants. Lately, propolis has been one of the world approaches research. Considered a functional food, propolis has several substances that are responsible for many therapeutic activities. The chemical composition of propolis is complex and related to plant diversity found around the hive. Although propolis is used in folk medicine for thousands of years, the lack of standards to assess accurately their pharmacological activities, the standardization complicates commercial products to ensure their efficacy and safety for humans and other animals. In this review we are exposed some recent developments in pharmacological research of propolis, focusing on up the anti-inflammatory activity, antimicrobial, anticancer, antiparasitic, antihyperglycemic and antihypertensive.

KEYWORDS: Propolis; *Apis mellifera*; therapeutic properties.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa de material resinoso e balsâmico, que é coletado de exsudados de árvores, flores, ramos, pólen e outras partes do tecido vegetal, que estejam próximos do local onde está situada a colmeia, que é misturado e processado com secreções salivares (MARCUCCI, 1995; SOUZA et al., 2007).

É produzida pelas abelhas para as mais variadas funções na colmeia (preenchimento de frestas, diminuição de aberturas de entrada e saída da colmeia, mumificação de cadáveres de insetos, para impedimento de sua decomposição e putrefação). Também é utilizada para cobrir as paredes internas da colmeia e interior das células para defendê-las dos microrganismos, além de reparar os favos estragados e consolidar os favos móveis (GHISALBERTI, 1979).

A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (KUMAZAWA et al., 2004). Entretanto, a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN et al., 2000). Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *Apis mellifera* (SILICI; KUTLUCA, 2005).

A própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas características físico-químicas, até o momento, existem 13 grupos diferentes de própolis, porém, acredita-se que, ainda há uma subestimação das variedades de própolis, visto que a flora brasileira apresenta uma imensa diversidade, das quais as abelhas podem coletar (PARK et al., 2000).

Geralmente, a própolis é composta por 50% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de essência e óleos aromáticos, 5% de pólen, e 5% de outras substâncias (contidas principalmente na resina), como ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, aldeídos, aminoácidos, cetonas, chalconas, diidrochalconas, terpenóides, vitaminas e minerais (ALMEIDA; MENEZES, 2002).

Ultimamente, a própolis vem sendo um dos principais enfoques mundiais em pesquisas. Considerada um alimento funcional, utilizado na medicina popular

desde os tempos remotos (AGUIAR et al., 2003), a cola das abelhas, como também é conhecida, apresenta diversas substâncias que são responsáveis por muitas atividades terapêuticas (KHAYYAL et al., 1993; VYNOGRAD et al., 2000; SFORCIN et al., 2000, 2002; BAZO et al., 2002; CUNHA et al., 2004; MATSUI et al., 2004; INOCUCHI et al., 2006; MARUYAMA et al., 2009; FONSECA et al., 2010).

Os flavonoides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (BEECHER, 2003; MANACH et al., 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kanferol etc. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis (LU et al., 2004). A presença de vários flavonoides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas de própolis mostram que estas substâncias agem sinergicamente em ação citostática/citotóxica, anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antioxidante (AMOROS et al., 1992).

Apesar de os flavonoides serem os componentes da própolis mais extensivamente estudados, eles não são os únicos responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas. Diversos outros compostos têm sido relacionados com as propriedades medicinais da própolis (AWALE et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar artigos científicos que apresentam informações pertinentes acerca das atividades terapêuticas da própolis brasileira, através de uma revisão.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação é um mecanismo de defesa, desenvolvido pelo próprio organismo, a fim de combater infecções (bactérias, vírus e outros patógenos) e agressões (cortes, queimaduras e feridas). Uma infecção, ou danos aos tecidos, promove uma indução de uma cascata complexa de eventos, conjuntamente, conhecida como resposta inflamatória, que é caracterizada por rubor, calor, inchaço, dor e, em último caso, perda da função. E estes sintomas ocorrem em

virtude do aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular através dos capilares, aos quais permitem que moléculas maiores (fatores do complemento, anticorpos e citocina) deixem a corrente sanguínea e atravessem a parede endotelial. Bem como há um movimento de leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos circundantes. Assim sendo, a elevação da temperatura e a vermelhidão do tecido (eritema) é explicado pelo aumento do volume de sangue. Enquanto que, o influxo de líquido nos capilares para os tecidos e sua acumulação (exsudado) contribui para o inchaço do tecido (edema) (CALDER, 2006; KINDT et al., 2008).

Alguns pesquisadores isolaram determinados compostos da própolis que apresentam conhecida atividade anti-inflamatória. MIRZOEVA et al. (1996) atribuíram esta propriedade à presença na própolis de compostos tais como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE). Esta atividade anti-inflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis, na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por BORRELLI et al. (2002). Além destes compostos, KRO et al. (1996) caracterizaram na própolis mais outros 15 compostos que, conhecidamente apresentam esta atividade anti-inflamatória, entre eles o ácido salicílico, a apigenina, o ácido felúrico e a galangina.

A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos é também apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória da própolis (NAGAOKA et al., 2003). Entretanto, outros estudos indicam um aumento na produção de H_2O_2 e NO por estas células (ORSI et al., 2000).

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Certamente a capacidade da própolis em inibir o crescimento de microrganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente. Apesar de suas distintas composições, amostras de própolis da Europa são muito similares em relação à atividade antimicrobiana quando comparadas com as amostras de própolis provenientes do Brasil (POPOVA et al., 2004).

Várias pesquisas demonstram a atividade antimicrobiana, Castro et al., 2009, em ensaios in vitro, concluíram que tanto o extrato etanólico quanto a fração hexânica da própolis inibiam o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e sugeriram que a ação da atividade antimicrobiana ocorre em virtude da presença da classe de benzofenonas e não aos ácidos graxos, como alguns autores defendiam.

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana também em culturas de *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritides* etc, entre eles BANKOVA et al. (1995), SERRA et al., (1995), MAZZUCO et al. (1996) e PARK et al. (1998). Ensaios de antibiose com a própolis, frente a 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as Gram-positivas (ANTUNES et al., 1996).

Daugusch et al., 2008, corroboram em estudo in vitro sobre a atividade antimicrobiana e, ainda ressaltaram que essa atividade é dependente da composição química da planta utilizada pelas abelhas para a produção da própolis.

Os possíveis mecanismos de atividade antimicrobiana dos compostos da própolis são: inibição da motilidade bacteriana, atuar no potencial de membrana, inibição da RNA-polimerase, desorganização da membrana citoplasmática, citoplasma e parede celular e inibição da síntese proteica (MIRZOEVA et al., 1997; TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994).

3.1 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

A procura de novas drogas para o controle dos diversos tipos de neoplasias tem levado diversos pesquisadores a isolar compostos contidos em amostras de própolis de diversas procedências.

Diversos compostos isolados da própolis apresentaram atividade inibitória no crescimento de diversos tumores. MATSUNO (1995) constatou a atividade inibitória de um diterpeno (PMS-1) sobre hepatocarcinoma humano. MITAMURA et al. (1996), estudando o efeito do PMS-1 sobre tumor de pele sugeriu que esta

atividade esteja relacionada com a inibição na síntese de DNA destas células. O CAPE isolado de própolis, apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B, mas mostrou-se inócuo quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo (JIN et al., 2005).

Diversos outros compostos com atividade inibitória sobre crescimento de tumores foram isolados em outros estudos, como de TAKAI et al. (1996), MATSUNO et al. (1997), BANSKOTA et al. (1998), KIMOTO et al. (1998), WEYANT et al. (2000), entre outros. Suzuki et al. (1996) e Orsolich et al. (2005) isolaram compostos hidrossolúveis da própolis que, atuando sinergisticamente, potencializaram a atividade de drogas tumorocidas, inibindo assim o desenvolvimento de tumores acíticos de Ehrlich.

3.2 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Define-se parasitismo como associação entre seres vivos com unilateralidade de benefícios, sendo o hospedeiro um dos associados e o prejudicado na associação, pois fornece todo o aporte ao parasita, enquanto que, a parasitose é o estado de infecção que agride o hospedeiro (NEVES, 1997).

Além dos medicamentos convencionais alopáticos (NEVES, 1997), os produtos naturais são alternativos contra parasitas (BARBOSA et al., 2007). Estudos mostram a utilização da própolis como possível fitomedicamento na erradicação do agente causador.

Ayres et al., 2007, em estudo *in vitro*, pioneiro de investigação do efeito de extratos etanólicos de própolis brasileira sobre formas promastigotas, amastigotas extracelulares e macrófagos peritoneais infectados de *Leishmania amazonenses* observaram que, esses extratos foram capazes de reduzir a carga parasitária e, ainda, destacaram a importância da própolis vermelha de Alagoas, como o extrato mais ativo contra *L. amazonenses*, em virtude da alta concentração de benzofenonas prenilados.

3.3 ATIVIDADE OFTALMOLÓGICA

A promoção da saúde ocular e a prevenção de doenças visuais consistem na forma mais fácil de reduzir o índice de cegueira evitável (TEMPORINI; KARA-

JOSÉ, 1995), porém, sabe-se que essa questão não é bem desenvolvida e incentivada, e o tratamento com medicamentos é uma das alternativas não invasivas que podem amenizar sintomas, e até curar (TEMPORINI; KARA-JOSÉ, 1995).

A própolis verde, em ensaios *in vivo*, foi capaz de inibir danos na retina, após indução intravítrea por injeção de NMDA (Ácido N-Metílico-D-Aspártico) em camundongos, já em estudos *in vitro*, este tipo de própolis conseguiu proteger células ganglionares da retina (RGC-5) contra H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) e estaurosporina induzida, ambas responsáveis por ocasionar danos na retina (como apoptose e necrose), e assim sendo, Inocuchi et al., 2006, indicaram que a própolis inibe a lesão neuronal *in vitro* e *in vivo*.

3.4 ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA

Nem sempre mudanças no estilo de vida são eficazes no tratamento da diabetes, havendo, portanto, a necessidade de tratamento convencional, ou seja, medicamentoso sintético e natural. Em estudos *in vivo*, realizados em ratos, demonstraram um potente efeito antihiperpicêmico. Sendo o composto ativo ácido 3,4,5-tri-cafeoilquínico como candidato de destaque que exerce o efeito e mostra uma inibição específica na maltase (MATSUI et al., 2004). A maltase é uma enzima responsável pela hidrólise de maltose em duas moléculas de glicose, quando inibida retarda a digestão de carboidratos e, assim, controla os níveis de glicose no sangue após as refeições (MELO et al., 2006).

3.5 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Define-se Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como condição clínica provocada por diversos fatores de risco e caracteriza-se por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Recomendações não medicamentosas, ou melhor, mudanças na qualidade de vida são, sem dúvida, a melhor estratégia na prevenção e, até, tratamento de hipertensão, porém, na maioria dos casos, faz-se necessária implantação de medidas medicamentosas de caráter sintético (SBC, 2010) e, também, natural (BRASIL et al., 2008).

A própolis verde apresentou efeitos anti-hipertensivos em ratos espontaneamente hipertensos, por ação vasodilatadora, e foi verificado que os componentes ativos são quatro flavonoides: dihidrocanferida, isoacuranetina, betuletol e canferida (MARUYAMA et al., 2009).

3. CONCLUSÕES

Os vários resultados comprovados por trabalhos científicos mostram o potencial da própolis para diversos usos e aplicações farmacológicas e confirmam a sua eficácia, principalmente como anti-inflamatório e antimicrobiano. Atualmente, com o avanço das técnicas analíticas, têm sido realizado estudos mais detalhados da constituição química da própolis e da atividade de seus componentes.

Porém, o Brasil, como um dos maiores produtores de própolis do mundo, ainda necessita de mais pesquisas que explorem e elucidem possíveis aplicações dessa substância, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que relacionem sua composição química com a atividade biológica. Dessa maneira seria possível correlacionar o tipo de própolis com a sua aplicação terapêutica e na área alimentícia. Esta tarefa é indispensável para um mercado cada vez maior e mais exigente em todo o mundo.

Portanto, ainda serão necessários muitos estudos envolvendo ensaios clínicos *in vivo* capazes de determinar as doses corretas a serem administradas e o real efeito da própolis em humanos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; KOO, M. H.; PARK, Y. K. Caracterização físico-química das própolis originárias da região Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 27, p. 15-21, 2003.
- ALMEIDA, E.C. e MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex vírus type 1 in cell culture- comparison with the antiviral activity of própolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.
- ANTUNES, R.M.P.; CATAO, R.M.R.; CEVALLOS, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.15-18, 1996.
- AWALE, S.; SHRESTHA, S.P.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.Y.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.6, p.858-864, 2005.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIA, S. Effects of Brazilian propolis on *leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 215-220, 2007.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.50c, p.167-172, 1995.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1998.
- BARBOSA, A. S.; SOUSA, E. G.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, H. S. M. C.; MEDEIROS, M. B. Plantas medicinais: aspectos do uso de fitoterápicos na melhoria de qualidade de vida humana. **X Encontro de Iniciação à Docência. Universidade Federal da Paraíba**, 2007.
- BAZO, A. P.; RODRIGUES, M.A.M.; SFORCIN, J.M.; CAMARGO, J.L.V.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F. Protective action of própolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogen Carcinogen Mutagen**, v. 22, p. 183-194, 2002.

BEECHER , G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, p.S53-S63, 2002.

BRASIL, E.C.L.; GOMES, A.L.; BEZERRA, M.L.S.; FÉRRER, J. A.C.; BATISTA, M. C.; OLIVEIRA, R.R.C.; FIGUEIREDO, C.A.; KLUPPEL, B.L.P. Nutracêuticos, alimentos funcionais e fitoterápicos: O uso das plantas na promoção, prevenção e restauração da saúde. **XI Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids inflammation. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 197-202, 2006.

CASTRO, M. L.; VILELA, W. R.; ZAULI, R. C.; IKEGAKI, M.; REHDER, V. L.; FOGLIO, M. A. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian própolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2009.

CUNHA, I. B.S.; SALOMÃO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V.S.; CUSTÓDIO, A.R; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis form *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 602-604, 2004.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2008.

FONSECA, Y.M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; VICENTINI, F.T.M.C.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUSA, J.P.B.; LUCISANO-VALIM, Y.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the potential of brazilian própolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

GHISALBERTI, E. Propolis: a review. **Bee World**, Cardiff, v. 60, p. 59-84, 1979.

INOCUCHI, Y.; SHIMAZAWA, M. NAKAJIMA, Y.; SUEMORI, S.; MISHIMA, S.; HARA, H. Brazilian green própolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n.1, p. 71-77, 2006.

JIN, U.H.; CHUNG, T.W.; KANG, S.K.; SUH, S.J.; KIM, J.K.; CHUNG , K.H.; G U, Y.H.; SUZUKI, I.; K IM, C.H. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, v.360, n.1/2, p.132-140, 2005.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A; EL-KHATIB, A.S. Mechanism involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 19, p. 197-203, 1993.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v.22, p.506-515, 1998.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**, 6 ed.. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. 704 p.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETZS, G.; C ZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforschung**, v.43, n.5, p.607-609, 1993.

KUMASAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LU, Y.; WU, C.; YUAN, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, v.75, n.3/4, p.267-276, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; M ORAND, C.; REMESY, C.; J IMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727- 747, 2004.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologic**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARUYAMA, H.; SUMITOU, Y.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; HARA, H; Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n.7, p. 1244-1250, 2009.

MATSUI, T.; BUCHI, S.; UJISE, T.; BESUNDARA, K.J.M.; OI, S.; YAMADA, H. MATSUMOTO, K. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1797-1803, 2004.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.50c, p.93-97, 1995.

MAZZUCO, H.; DE ME SILVA , R.D.; B ERCHIERI, A.; DE MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I.T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *Journal of Traditional Medicines*, v.12, p.0liveira, E. Use of propolis

and ethyl alcohol in the control of Salmonella in poultry rations. **Scientia Agricola**, v.53, p.1-5, 1996.

MELO, E.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice. **Anticancer Research**, v.16, p.2669-2672, 1996.

NAGAOKA, T.; BANSKOTA, A.H.; T EZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.4, p.487-491, 2003.

NEVES, David Pereira et al. *Parasitologia Humana*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, p.205-219, 2000.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.4, p.694-700, 2005.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of brazillian própolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Science**, Tokyo, v.21, n.2, p. 85-90, 2000.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; OSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v.36, p.24-28, 1998.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; NIKOLOVADAMYANOVA, B.; SABATINI, A.G.; MARCAZZAN, G.L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, v.15, n.4, p.235-240, 2004.

SERRA, J. & ESCOLA, R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.91, p.242-246, 1995.

SFORCIN, J.L.; FERNANDES, J.R.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p.243-249, 2000.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different race of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005. PMID:15848022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010.

SOUZA, J. P et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SUZUKI, I.; TAKAI, H.; KOIDE, M.; YSMAMOTO, H. Anti tumor effect of immunologically active fractions obtained from Brazilian propolis, given in combination with anticancer drug in Ehrlich carcinoma bearing mice. **Mitsubachi Kagaku**, v.17, p.1-6, 1996.

TAKAI, H.; YAMAMOTO, H.; SUZUKI, I. The effect against antitumor and recovery of leukopenia by combined use of water soluble propolis and antitumor drug (5-FU). **Igaku to Seibutsugaku**, v.132, p.311-316, 1996.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 222-227, 1994.

TEMPORINI, E.R.; KARA-JOSÉ, N. Níveis de prevenção de problemas oftalmológicos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 58, n. 3, p. 189-192, 1995.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, p.1-6, 2000.

WEYANT, M.J.; CAROTHERS, A.M.; BERTAGNOLLI, M.E.; BERTAGNOLLI, M.M. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v.6, p.949-956, 2000.

ARTIGO II: Artigo de Resultados

ALBUQUERQUE, ALI; JUNIOR, IDB; SILVA, MCD. Atividade antimicrobiana de microencapsulados de própolis vermelha.

Revista a que será submetido: Boletim do Centro De Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)

RESUMO

A comercialização de produtos obtidos da abelha (*Apis mellifera*) como o mel e a própolis vem se tornando frequente no Brasil, visivelmente perceptível com a crescente implantação de microindústrias de produtos à base de mel e própolis. O uso popular cada vez mais crescente de própolis e seus derivados com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogênica e imunomodulatória vêm demonstrando o grande poder terapêutico. Em decorrência disso, novos produtos contendo própolis estão sendo desenvolvidos, tais como, os microencapsulados. A depender do método empregado, tais microencapsulados podem resultar em um produto final com características negativas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil microbiológico de microencapsulados da própolis vermelha obtidas pela técnicas de secagem *spray-drying* e liofilização. A própolis vermelha foi obtida de apiários localizados na região de mangue do município de Marechal Deodoro / AL. A amostra foi coletada no período de fevereiro a março do ano 2012. A partir do extrato, foram preparadas 4 formulações que variaram na quantidade de extrato etanólico de própolis vermelha, bem como em proporções diferentes de excipientes. Duas técnicas de secagem (*spray-drying* e liofilização) foram empregadas, resultando em 8 amostras de microencapsulados, porém, destas, foram escolhidas 4 formulações (duas de cada técnica de secagem) para realizar os testes. Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram realizadas as determinações do teor de Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM) através da técnica de microdiluição em caldo frente à cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). Os biomarcadores da própolis vermelha foram identificados usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detector de Ultra-Violeta. Os microencapsulados apresentaram atividade antimicrobiana para todos os microrganismos estudados, porém com diferenças na CIM. Bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis que bactérias Gram negativas. Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto e das formulações a base de própolis vermelha demonstraram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção. Os microencapsulados testados podem ser considerados candidatos a otimização de amostras a base de própolis vermelha. Tais resultados permitirão um controle de qualidade e, até uma futura padronização de produtos naturais e nutracêuticos, a fim de obter produtos com constância de composição e propriedades alimentícias adequadas.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis vermelha, microencapsulados, flavonoides, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The marketing of products obtained by bee (*Apis mellifera*) as honey and propolis has become common in Brazil, visibly noticeable with the increasing deployment of microindustries of products based on honey and propolis. The popular use ever-increasing propolis and their derivatives with antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, immunomodulatory and anticarcinogenic have demonstrated the great therapeutic power. As a result, new products containing propolis are being developed, such as the microencapsulated. Depending on the method used, such microencapsulated may result in a final product with negative characteristics. Given the above, this study aimed to evaluate the microbiological profile of the microencapsulated propolis obtained by drying techniques spray-drying and freeze drying. The propolis was obtained from apiaries located in the mangrove area of the municipality of Marechal Deodoro / AL. The sample was collected from February to March 2012. From the extract were prepared 4 formulations varying the amount of ethanol extract of propolis, as well as different proportions of excipients. Two techniques drying (spray drying and freeze drying) were used, resulting in 8 samples of microencapsulated. However, these, 4 were selected formulations (each two drying technique) to perform the tests. To evaluate the antimicrobial activity, the determination was made of the content of Inhibitory Concentrations and Minimum Bactericidal (MIC and MBC) through the microdilution technique in broth front of the standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). Biomarkers of propolis were identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to Ultra-Violet detector. The microencapsulated presented antimicrobial activity for all microorganisms studied, but with differences in the CIM. Gram positive bacteria were more susceptible than Gram negative bacteria. The chromatograms obtained by liquid chromatography of high efficiency in crude extracts and formulations propolis base showed a complex chemical composition, with several peaks at different retention times. The microencapsulated tested can be considered candidates for optimization samples propolis base. These results will allow a quality control and, until a future standardization of natural products and nutraceuticals, in order to obtain products with composition of consistency and appropriate nutritional properties.

KEYWORDS: Red propolis, microencapsulated, flavonoids, antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN et al., 1995).

Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiências e outras (CLARDY, WALSH, 2004).

A história do desenvolvimento das civilizações é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa (VIEGAS JR.; BOLZANI, 2006). O uso de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. Nos anos 90, foi divulgado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), que grande parte da população dos países em desenvolvimento dependia das plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Entre os produtos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; NAGAOKA et al., 2003; DUARTE et al., 2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; KUMASAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; HAYACIBARA et al., 2005; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (MATSUDA, 1994).

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera*. Esta substância é coletada de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudatos resinosos (PARK et al., 2002). Uma vez coletada, essa substância é enriquecida com secreções enzimáticas e salivares (CASTALDO; CAPASSO, 2002). A própolis é utilizada para cobrir paredes da colmeia, preencher rachaduras e brechas, embalsamar insetos invasores mortos, reparar

favos e manter o interior da colmeia asséptico, principalmente o local de postura da rainha (BANKOVA et al.,2000).

A própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas características físico-químicas, que é diretamente influenciada com a planta utilizada pelas abelhas para coleta das resinas e exsudatos e, que, conseqüentemente, influencia nas suas propriedades terapêuticas. Até a pouco tempo atrás, existiam 12 grupos, recentemente foi descoberta uma nova variedade de própolis, a própolis vermelha (grupo 13), que é encontrada em áreas do manguezal do litoral e de margens de rios do nordeste, sendo esta provinda do caule de *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSCH et al., 2008).

Particularmente, a própolis vermelha de Alagoas é considerada diferenciada, pois além de conter flavonoides em quantidade superior, contém substâncias exclusivas, tais como metil-o-arselinato, metil abietato, 2,4,6-trimetilfenol, 7,4'-driidroxiflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol, conferindo um maior poder terapêutico em relação às demais variedades (ALENCAR et al., 2007).

A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus* (FERNANDES JUNIOR et al., 1995, 1997, 2001 e 2003; PINTO et al., 2001); *Streptococcus pyogenes* (BOSIO et al., 2000); *Candida sp* (SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIC et al., 2003) e sobre inúmeros outros microrganismos (BANSKOTA et al.,2001).

Apesar de amplo poder terapêutico e nutricional, em seu estado *in natura* seu consumo é inaceitável, principalmente por apresentar sabor amargo. Por isso, a própolis é processada e utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica (PARK et al., 2002), por exemplo, como ingrediente na produção de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Dentre os mais variados processamentos aplicados à matéria-prima natural nas indústrias, a microencapsulação merece destaque, não apenas por proteger o ingrediente ativo, mas também por separar os componentes incompatíveis e reativos, reduzir a evaporação dos compostos voláteis, melhorar a solubilidade do

material encapsulado, auxiliar na incorporação de sistemas secos e atenuar características organolépticas indesejadas (BORGOGNONI, 2005).

O processo de secagem por “spray”, também conhecido como secagem por atomização ou pulverização, consiste em pulverizar uma solução líquida exposta a uma corrente de ar quente não saturada que deverá remover sua umidade, permitindo que o soluto que se encontrava diluído na solução seja obtido em forma de pó. Este tipo de secagem é largamente utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e metalúrgicas (OLIVEIRA, 2007). Já a liofilização é bastante empregada na secagem de substâncias termolábeis. Assim sendo, permite secar sem provocar danos aos produtos (AULTON, 2005). É também comumente empregada como método de encapsulação de material ativo (ARAÚJO, 2011).

O controle de qualidade dos produtos intermediários e finais é importantíssimo, pois após processamentos de secagens distintos é possível comparar e compreender as consequências que um determinado processo implica e ainda entender, por exemplo, a influência que certos excipientes adicionados a formulações tem na produção de microencapsulados.

Ainda são escassos estudos que realizem monitoramento microbiológico de microencapsulados à base de própolis vermelha de Alagoas, tornando imprescindível um controle de qualidade destes produtos, tendo em vista a perspectiva de padronização de produtos de origem natural e nutracêuticos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil microbiológico de microencapsulados da própolis vermelha obtidas pela técnicas de secagem *spray-drying* e liofilização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e armazenamento da própolis vermelha de Alagoas

A própolis vermelha foi obtida dos apiários localizados na região de mangue do município de Marechal Deodoro / AL. A amostra foi coletada no período de fevereiro a março do ano 2012, acondicionada em sacos plásticos

opaco, hermeticamente fechado e conservado sob refrigeração (entre -10 e -5°C) até o momento das análises, visando evitar perdas dos constituintes voláteis.

2.2 Obtenção do extrato etanólico de própolis

A própolis bruta foi limpa, retirada todo e qualquer resíduo existente, cortada em pequenos pedaços e pesada 300g do material. Essa amostra foi submetida ao processo de maceração, com álcool etílico comercial 99°GL (5L) a temperatura ambiente, com troca do solvente de 24 em 24 horas e em seguida foi realizada filtração para obter o extrato etanólico de própolis (EEP). Após a filtração o extrato obtido foi acondicionado em recipientes de vidro cobertos com papel alumínio e devidamente identificados para conservação.

2.3 Preparo das formulações

As formulações foram preparadas e realizados os cálculos dos excipientes levando em conta o percentual que cada um deveria apresentar no pó final (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual em massa dos excipientes nas formulações.

Excipientes	Formulações			
	F1 e F1 _L	F2 e F2 _L	F3 e F3 _L	F4 e F4 _L
EXP A	20%	40%	20%	40%
EXP B	5%	5%	—	—
EXP C	5%	5%	5%	5%
EXP D	5%	5%	5%	5%

F= Formulações spray dryer. F_L= Formulações liofilizadas.

Os excipientes foram pesados em balança analítica e adicionados ao extrato etanólico de própolis (EEP). O EXP A e o EXP C foram dissolvidos em água a 37°C com o auxílio de um agitador mecânico modelo RW 20 Digital IKA®

durante 5 minutos, em seguida adicionou-se o EEP, agitando-se por mais 5 minutos. O EXP B foi dissolvido em água a 70°C, adicionado ao EEP com os excipientes contidos e agitados por 5 minutos. Por último dissolveu-se o EXP D em água a 37°C sendo adicionado aos demais excipientes da formulação, agitando-se por mais 5 minutos.



Figura 1. Preparo das formulações.

2.3.1 Atomização das formulações por Spray Dryer

Para obtenção dos microencapsulados, as formulações preparadas acima foram atomizadas e secas em um mini *Spray Dryer* B-290 fabricado pela Büchi®, (Suíça). As condições utilizadas para obtenção dos microencapsulados foram obtidas de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante do equipamento e através de relatos na literatura sobre secagem do EEP em *Spray Dryer* sendo, portanto, selecionada as condições de 180°C para temperatura de entrada, 91°C de temperatura de saída (não controlável), a aspiração ficou em 85% a 75% e a alimentação em 5 mL/min.



Figura 2. Atomização (*spray-drying*) das formulações a base de própolis vermelha.

2.3.2 Liofilização das formulações

As formulações também foram secas pelo método de liofilização realizado no liofilizador modelo LD 1500 (Terroni ® equipments), o qual compreende três prateleiras dentro de uma câmara, um condensador a $-43 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e uma bomba de vácuo. A pressão do sistema ficou abaixo de $300 \mu\text{Hg}$. O equipamento utilizado na liofilização apresentou estabilidade de temperatura no condensador e pressão baixa adequadas, sendo requisitos importantes durante o processo (Hatley e Franks, 1991). As amostras foram acondicionadas em frascos protegidos da luz e 200mL foram adicionados nos frascos e previamente congelados por 72 horas a temperatura de -20°C .



Figura 3. Liofilização das formulações a base de própolis vermelha.

2.4 Análises Cromatográficas (CLAE-UV)

Os biomarcadores da própolis vermelha foram identificados usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detector de Ultra-Violeta (Shimadzu).

2.4.1 Preparo das amostras

As amostras das formulações bem como a tintura de própolis vermelha foram pesadas em balança analítica. A solubilização das amostras foi realizada em álcool e tampão fosfato (pH 7,4), em razão de 1:1. As amostras foram homogeneizadas em ultrassom até a completa solubilização das amostras. Após solubilização alíquotas do sobrenadante aquoso foram filtradas em unidades filtrantes de 0,20 μm e transferidas para os vials de autoinjeter onde foram injetados 20 μL . Todas as amostras foram injetadas contendo a mesma concentração: 350mg/mL.

2.4.2 Condições do HPLC

Os cromatogramas foram obtidos num sistema cromatográfico da Shimadzu contendo bomba de alta pressão (modelo LC-20AT), autoinjeter (modelo SIL 20A), forno para condicionamento da coluna (modelo CTO- 20A), detector de arranjo de diodo (modelo SPD-M20A) e uma controladora (CBM-20A)

com interfaceamento para o computador controlado por um software LC-solution da Shimadzu.

As condições estão estabelecidas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros do método cromatográfico.

Características	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila
Fluxo da fase móvel	0,8mL/min
Coluna	C18 Kinetex (150 x 4,6mm; 5µm XB)
Temperatura	33°C
Detector de UV	280nm
Volume de Injeção	20µL

A coluna cromatográfica recebeu um sistema gradiente de eluição da fase móvel e a proporção do solvente utilizado encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Proporção do solvente utilizado no sistema gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (minutos)	Concentração acetonitrila (%)
0	30
2	30
5	36
8	42
11	48
14	52
17	52
20	56
24	62
28	68
32	50
36	30
40	30

2.5 Ensaios microbiológicos

Para os ensaios microbiológicos de determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922). Estas cepas foram adquiridas comercialmente.

2.5.1 Manutenção e estoque das cepas

As cepas foram reconstituídas e ativadas segundo instruções do fabricante. As mesmas foram estocadas em *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo glicerol à 20%, e mantidas sob temperatura de congelamento até o momento das análises. Foram realizadas 20 cópias de cada estirpe.

2.5.2 Inóculo

Os tubos contendo as cepas de microrganismos congelados permaneceram em temperatura ambiente até a total fusão da mistura. Os tubos foram homogeneizados em vortex e o inóculo semeado, com alça de platina, por esgotamento em placas contendo Agar Nutriente. Posteriormente, as placas foram incubadas à 36°C por 24 horas.

As padronizações das suspensões bacterianas foram preparadas transferindo colônias das cepas isoladas em Agar Nutriente para tubos de ensaio contendo solução salina a 0,85% e analisadas em aparelho fotométrico com comprimento de onda ajustado em 625nm ao qual foram consideradas aceitas as absorbâncias que estiverem entre 0,08 a 0,1. Esta faixa de absorbância corresponde a uma turbidez que coincide com a solução padrão de 0,5 da escala de *MacFarland*, que por sua vez, corresponde a uma concentração bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

2.5.3 Avaliação Preliminar da atividade antimicrobiana

Para a avaliação preliminar, a ação antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em Agar. Para isso, com auxílio de um *swab* estéril, foi semeado o inóculo, por superfície, em placas de Petri contendo Agar Mueller

Hinton. Sobre a superfície semeada e após a absorção pelo meio de cultura, foram confeccionados discos de papel filme de 8mm de diâmetro. Em cada poço, foram adicionados volumes diferentes das soluções-estoque da própolis vermelha previamente preparadas.

Após a incubação das placas a 36°C por 16-18 horas, foi realizada a leitura dos resultados, medindo-se os halos, em milímetro, formados ao redor dos poços contendo as amostras e, incluindo o próprio diâmetro dos poços.

2.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos microencapsulados

A atividade antimicrobiana foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) de crescimento bacteriano, segundo a metodologia da microdiluição em caldo, proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCL, 2003), utilizando para tal finalidade microplacas de 96 poços, com fundo em “U”.

Cada placa foi destinada a uma única formulação e testada frente a três bactérias diferentes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*), sendo três colunas direcionadas a determinação de CIM, em triplicata.

Previamente foram adicionados 100µL de caldo *Muller Hinton* em todos os poços das microplacas. As concentrações das formulações que foram utilizadas foram baseadas em ensaio preliminar de atividade antimicrobiana, ou seja, baseadas nas zonas de inibição que conseguiram produzir, sendo adicionados nos poços 100µL das diluições. Vale salientar que, inicialmente, foi preparada uma solução estoque de todas as formulações e, em seguida, diluída em caldo BHI para obtenção de tais concentrações. Em seguida, foram adicionados 30µL do inóculo padronizado.

2.5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos microencapsulados de própolis vermelha

A Concentração Bactericida Mínima foi determinada após o semeio por esgotamento em Agar *Muller Hinton* de todas as amostras contidas nos poços

onde, porventura, não ocorreram crescimento bacteriano visível nas microplacas após revelação com resazurina, bem como de amostras de poços que resultaram em coloração intermediária (roxo), e posterior incubação à temperatura de 36°C durante 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração das formulações na qual não foi visualizado crescimento de colônias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microencapsulados de própolis vermelha apresentaram características organolépticas de um pó com coloração alaranjado, vermelho intenso e marrom, com cheiro característico de própolis. O extrato etanólico de própolis contido nos microencapsulados apresentaram boa solubilidade em etanol e tampão fosfato (pH 7,4), apesar de não solubilizar bem os excipientes.

Os pós obtidos pelo processo de liofilização das F1_L, F2_L, F3_L e F4_L apresentaram-se macroscopicamente distintos, na umidade e aspecto cor, apesar de possuírem a mesma concentração e os mesmos agentes encapsulantes das formulações do *spray dryer* (Figura 4 e 5).

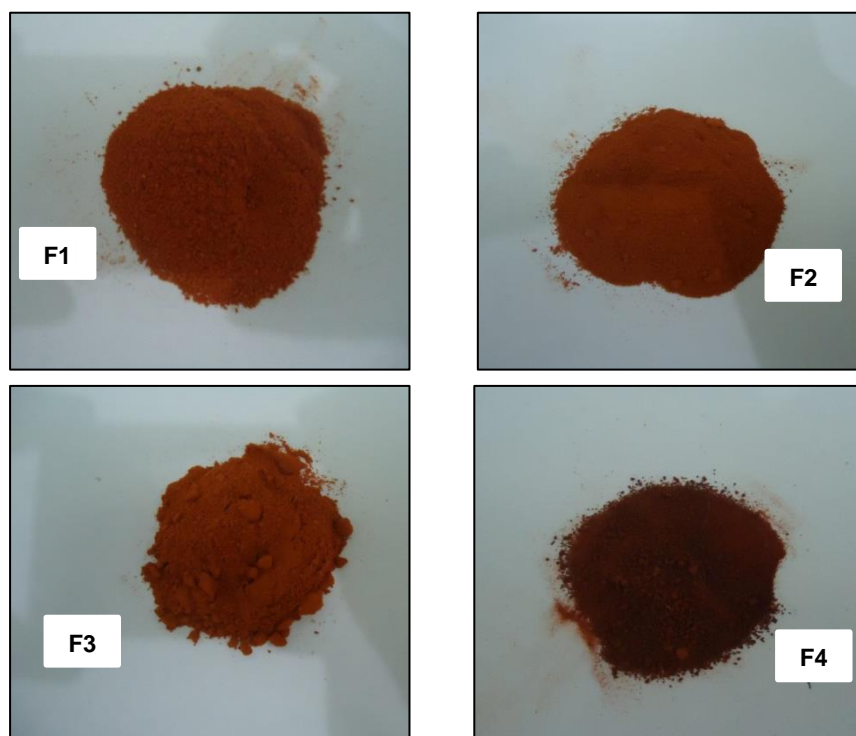


Figura 4. (F1_{SP}), (F2_{SP}), (F3_{SP}) e (F4_{SP}): Pós Atomizados (*Spray Dryer*).

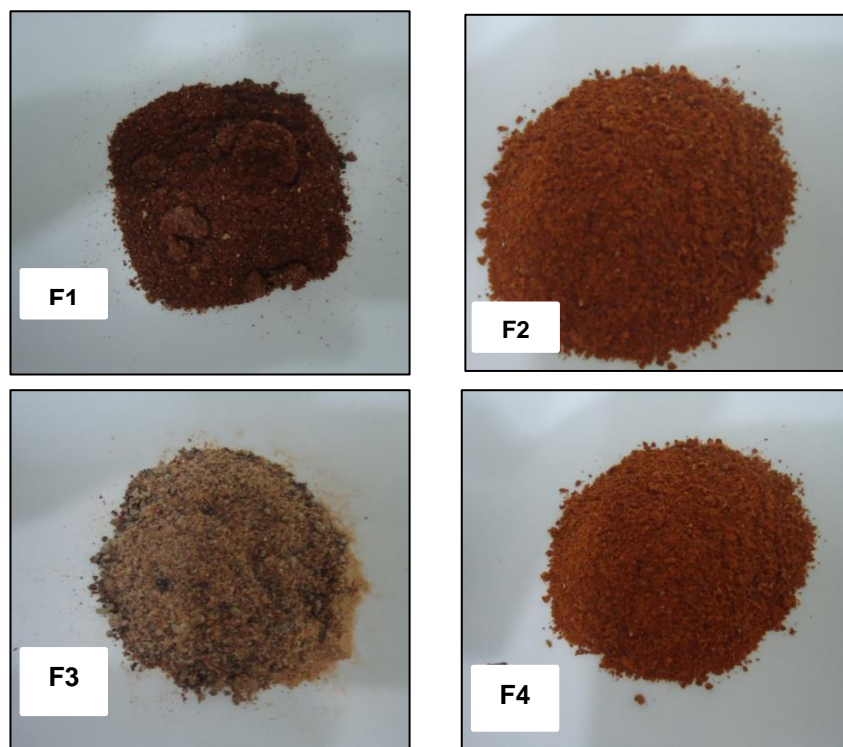


Figura 5. (F1_L), (F2_L), (F3_L) e (F4_L): Pós Liofilizados.

Das 8 formulações que foram preparadas, foram escolhidas 4 formulações, sendo duas provenientes de secagem por liofilização e duas por atomização para realizar os testes subsequentes. As formulações foram escolhidas com base nas características físico-químicas que apresentaram. As utilizadas para os testes seguintes foram: F1_L, F2_L, F1_{SP} e F2_{SP}.

3.1 Análises Cromatográficas (CLAE-UV)

Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto e das formulações a base de própolis vermelha demonstraram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção. Os resultados estão de acordo com os trabalhos de Silva et al. (2007) e Alencar et al. (2007), demonstrando que a própolis vermelha se trata de um tipo diferenciado de própolis brasileira.

Neste trabalho, foram investigados os seguintes padrões autênticos de flavonóides: daidzeína, pinocembrina, liquiritigenina, pinobanksina,

isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A (Figura 6).

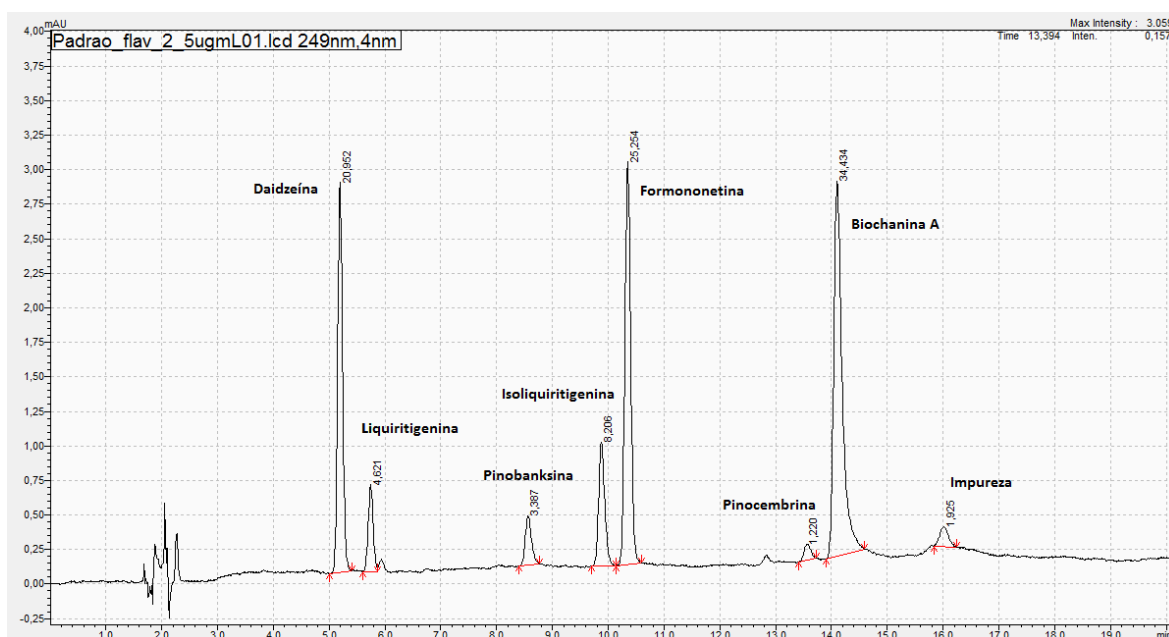


Figura 6. Padrões autênticos identificados de isoflavonas utilizados no estudo.

É possível observar, na figura 7, o perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na própolis vermelha. Observa-se a presença de 19 compostos químicos. Esses isoflavonoides foram identificados no estudo de Silva et al. (2007) que comprovou sua origem a partir de uma espécie da família Leguminosae, *Dalbergia ecastophyllum*, podendo classificá-la como o 13º tipo de própolis brasileira.

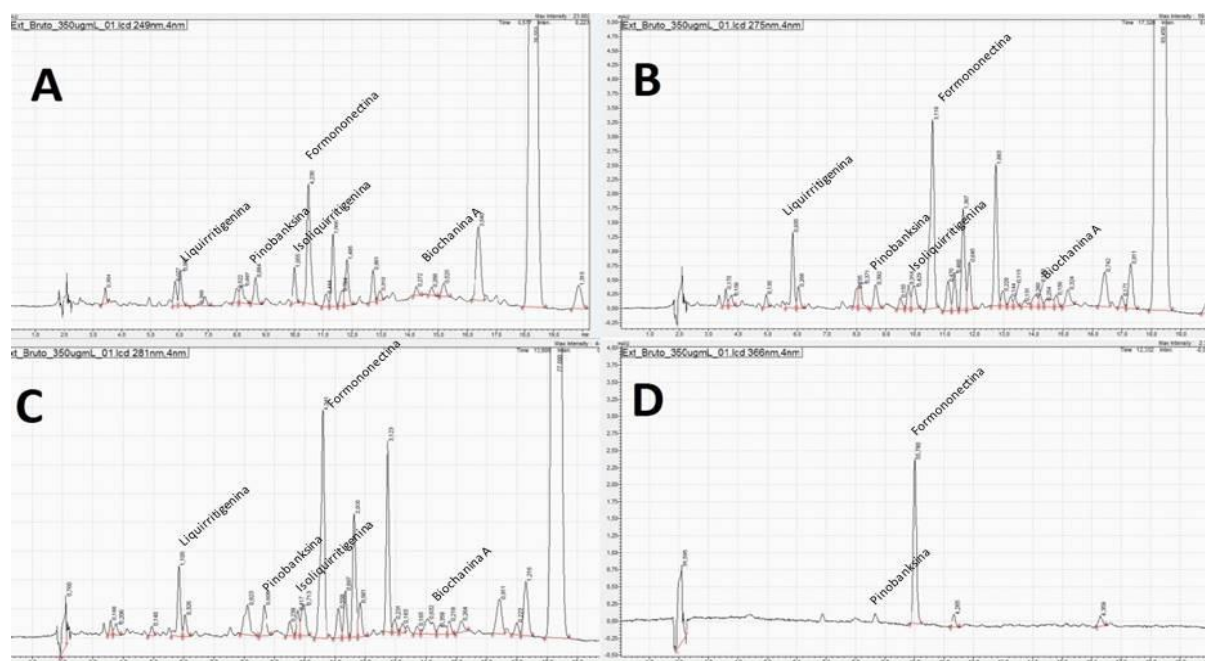


Figura 7. Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes no extrato bruto da própolis vermelha. (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.

Pode-se observar nos cromatogramas da figura 7 que, nos comprimentos de onda de 249, 260, 275, 291 e 366nm foi possível separar alguns compostos fenólicos presentes na própolis vermelha, em especial a liquiritigenina (5,85 minutos), a pinobanksina (8,65 minutos), isoliquiritigenina (10,0 minutos) e formononectina (10,47 minutos).

O perfil cromatográfico da F1_{SP} encontra-se exposto na figura 8. Os compostos fenólicos estão presentes na faixa de 5,81 minutos a 23,01 minutos. Na formulação 1, foram identificados os compostos: liquiritigenina (5,8 minutos), pinobanksina (8,5 minutos), isoliquiritigenina (9,96 minutos), formononectina (10,43 minutos) e biochanina A (23,07 minutos).

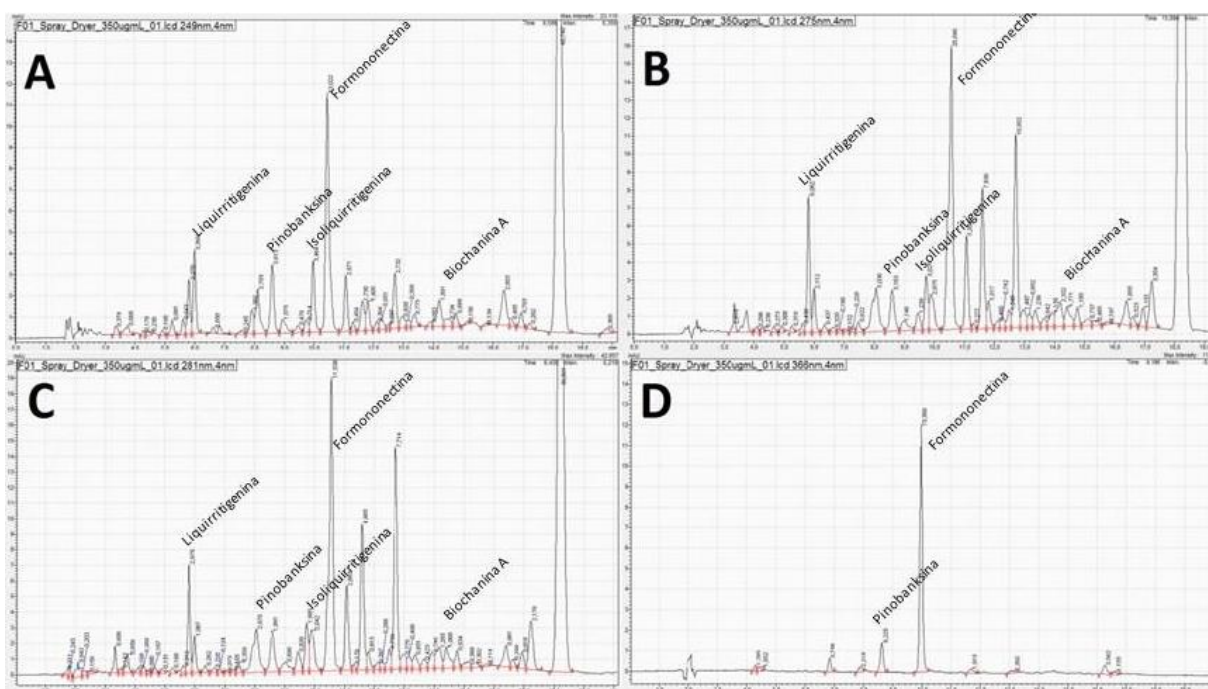


Figura 8. Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na F1_{SP}. (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.

O perfil cromatográfico da F1_L encontra-se exposto na figura 9. Os compostos fenólicos estão presentes na faixa de 5,81 minutos a 23,01 minutos. Na formulação 4, foram identificados os compostos: liquiritigenina (5,81 minutos), pinobanksina (8,59 minutos), isoliquiritigenina (9,97 minutos), formononectina (10,44 minutos) e biochanina A (23,01 minutos).

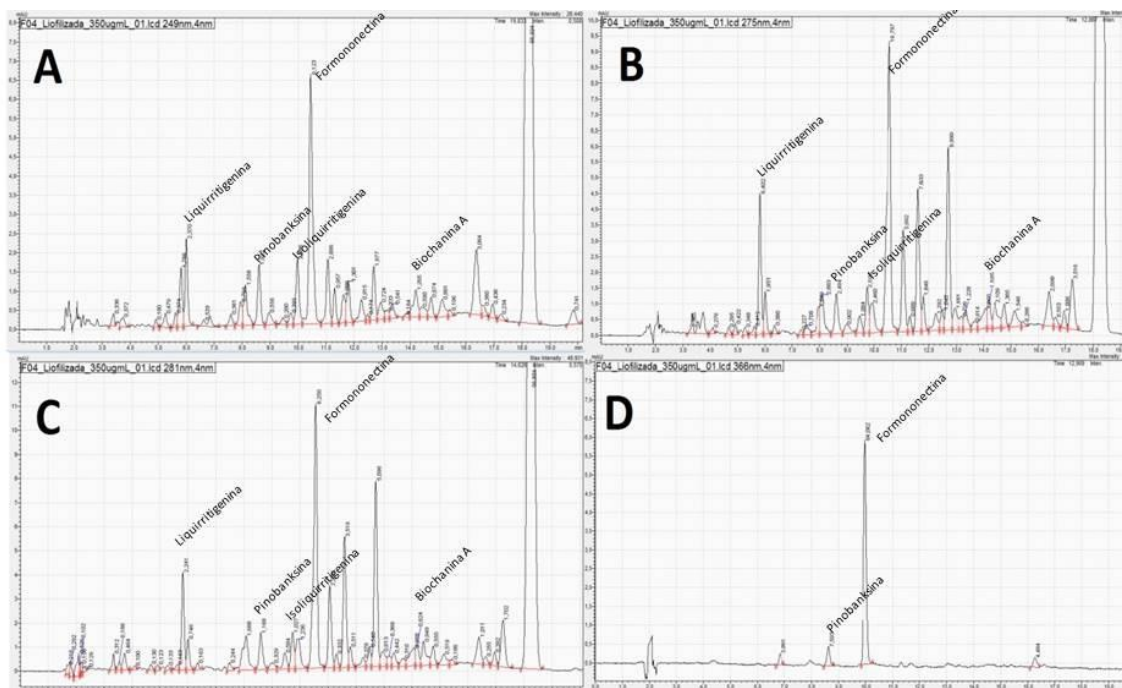


Figura 9. Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na F1_L. (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.

O perfil cromatográfico da F2_{SP} encontra-se exposto na figura 10. Os compostos fenólicos estão presentes na faixa de 5,80 minutos a 23,01 minutos. Foram identificados os seguintes compostos: liquiritigenina (5,80 minutos), pinobanksina (8,58 minutos), isoliquiritigenina (9,95 minutos), formononectina (10,44 minutos) e biochanina A (23,01 minutos).

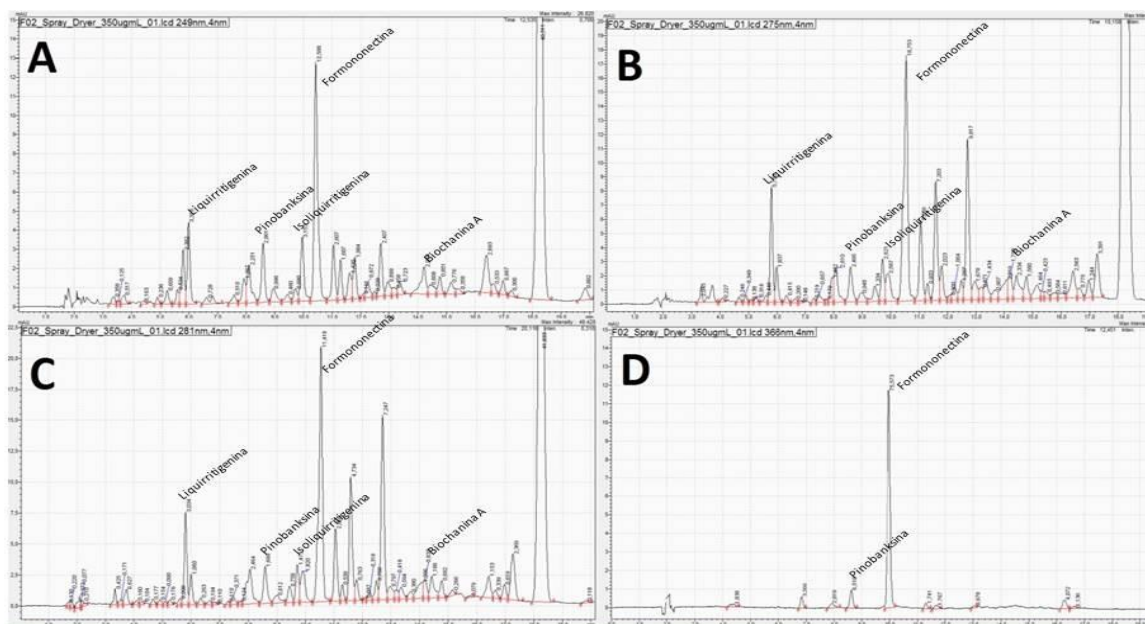


Figura 10. Perfil cromatográfico dos flavonoides presentes na F2_L. (A) 249nm, (B) 275nm, (C) 281nm e (D) 366nm.

Foi observado que os compostos fenólicos pinocembrina e daidzeína não foram identificados em nenhuma das formulações avaliadas. O perfil cromatográfico do extrato bruto da própolis vermelha mostrou-se semelhante às formulações avaliadas, o que comprova a incorporação da própolis vermelha nas formulações avaliadas. A tabela 4 demonstra a concentração de compostos fenólicos tanto nos microencapsulados como no extrato da própolis vermelha.

Tabela 4. Concentração de flavonoides ($\mu\text{g/mL}$) nos microencapsulados e extrato da própolis vermelha.

Composição	Liquiritigenina	Pinobanksina	Isoliquiritigenina	Formononetina	Biochanina A
Extrato	1,82	0,43	1,62	1,98	0,3936
F1 _{SP}	8,61	1,93	7,52	10,33	0,384
F1 _L	5,38	0,95	3,84	6,22	0,340
F2 _L	9,68	1,70	7,53	11,61	0,422

Devido a amostra F2_{SP} ter absorvido umidade em excesso e ter ficado higroscópica, não foi possível obter os resultados dos biomarcadores desta amostra. Os processos de secagem mostraram que, durante o processo, ocorre perda de excipientes por volatilização, sucção e/ou aderência nas paredes do equipamento, resultando em teor maior de flavonoides em relação à concentração de flavonoides do extrato.

Observou-se que, na F2_L, todos os compostos fenólicos, com exceção da pinobanksina, tiveram concentrações superiores das demais formulações avaliadas (F1_{SP} e F1_L). Foram observados também altas concentrações de formononetina em todas as amostras. De acordo com Moraes (2009), a formononetina, um isoflavonoide com atividade estrogênica, antiradical e antifúngica é encontrado em maior quantidade em amostras de própolis vermelha. Essa isoflavona, quando consumida por mamíferos, é metabolizada em daidzeína que é um isoflavonoide presente na soja usado no tratamento de câncer de mama e próstata.

3.2 Ensaio microbiológicos

A atividade antimicrobiana da própolis é muito importante para a vida na colmeia e independente da origem, todos os tipos de própolis apresentam essa propriedade (BANKOVA et al., 1995). Tem sido reportado que a atividade

antibacteriana da própolis deve-se a efeitos sinérgicos entre flavonoides, ácidos fenólicos e seus derivados que estão presentes majoritariamente na própolis.

Por meio do teste de difusão em agar foi possível avaliar, de forma qualitativa, a atividade antimicrobiana da tintura e das formulações da própolis vermelha. Nos ensaios realizados de teste de susceptibilidade para a confirmação da atividade antimicrobiana das formulações a base de própolis vermelha de Alagoas, observou-se que todas as formulações avaliadas apresentaram atividade inibitória frente às bactérias testadas. Porém, a bactéria *Escherichia coli* apresentou maior resistência à própolis vermelha, fato observado pela formação de halos translúcidos inferiores aos demais microrganismos testados (Tabelas 4 a 7).

A solução utilizada como controle negativo não apresentou atividade contra as bactérias testadas.

Tabela 5. Formulações liofilizada (F1_L) e atomizada (F1_{SP}) em comparação com a tintura de própolis vermelha frente à *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Formulações	Concentrações	Halos de inibição		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Formulação 1 _L	75 µg/mL	10mm	-	10mm
	100 µg/mL	10mm	-	10mm
	125 µg/mL	11mm	-	10mm
	150 µg/mL	11mm	-	11mm
	200 µg/mL	11mm	-	11mm
	225 µg/mL	12mm	-	11mm
	250 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	312 µg/mL	12mm	8mm	12mm
	375 µg/mL	14mm	8mm	13mm
	437 µg/mL	14mm	10mm	14mm
	500 µg/mL	15mm	10mm	15mm
Formulação 1 _{SP}	75 µg/mL	10mm	-	10mm
	100 µg/mL	10mm	-	10mm
	125 µg/mL	11mm	-	10mm
	150 µg/mL	11mm	-	11mm
	200 µg/mL	11mm	-	11mm
	225 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	250 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	312 µg/mL	12mm	8mm	12mm
	375 µg/mL	14mm	8mm	13mm
	437 µg/mL	14mm	10mm	13mm
	500 µg/mL	14mm	10mm	14mm

	625 µg/mL	16mm	12mm	15mm
Tintura	75 µg/mL	8mm	-	8mm
	100 µg/mL	8mm	-	8mm
	125 µg/mL	8mm	-	8mm
	150 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	200 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	225 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	250 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	312 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	375 µg/mL	11mm	10mm	11mm
	437 µg/mL	12mm	10mm	12mm
	500 µg/mL	12mm	10mm	12mm
	625 µg/mL	12mm	10mm	12mm

Tabela 6. Formulações liofilizada (F1_L) e atomizada (F1_{SP}) em comparação com a tintura de própolis vermelha frente à *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Formulações	Concentrações	Halos de inibição		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Formulação 2 _L	75 µg/mL	10mm	-	10mm
	100 µg/mL	10mm	-	10mm
	125 µg/mL	11mm	-	10mm
	150 µg/mL	11mm	-	11mm
	200 µg/mL	11mm	-	11mm
	225 µg/mL	12mm	-	11mm
	250 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	312 µg/mL	12mm	8mm	12mm
	375 µg/mL	14mm	8mm	13mm
	437 µg/mL	14mm	10mm	14mm
	500 µg/mL	15mm	10mm	15mm
	625 µg/mL	15mm	12mm	15mm
Formulação 2 _{SP}	75 µg/mL	10mm	-	10mm
	100 µg/mL	10mm	-	10mm
	125 µg/mL	11mm	-	10mm
	150 µg/mL	11mm	-	11mm
	200 µg/mL	11mm	-	11mm
	225 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	250 µg/mL	12mm	8mm	11mm
	312 µg/mL	12mm	8mm	12mm
	375 µg/mL	14mm	8mm	13mm
	437 µg/mL	14mm	10mm	13mm
	500 µg/mL	14mm	10mm	14mm
	625 µg/mL	16mm	12mm	15mm
Tintura	75 µg/mL	8mm	-	8mm
	100 µg/mL	8mm	-	8mm
	125 µg/mL	8mm	-	8mm
	150 µg/mL	10mm	8mm	10mm

	200 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	225 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	250 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	312 µg/mL	10mm	8mm	10mm
	375 µg/mL	11mm	10mm	11mm
	437 µg/mL	12mm	10mm	12mm
	500 µg/mL	12mm	10mm	12mm
	625 µg/mL	12mm	10mm	12mm

Independente do processo de secagem, todas as formulações foram mais susceptíveis à *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, respectivamente. Esses resultados reforçam dados encontrados na literatura onde as amostras de própolis, na forma de extratos etanólicos, possuem maior atividade inibitória para as bactérias Gram-positivas, porém, alguns extratos podem apresentar inibição moderada contra as bactérias Gram-negativas (MENEZES, 2005; UZEL et al., 2005).

As F1 e F2 (liofilizadas e atomizadas) apresentaram uma atividade superior quando comparada com a tintura de própolis, utilizada com o mesmo extrato bruto para obtenção dos microencapsulados, o que já era esperado, visto que as formulações submetidas aos processos de secagem apresentaram quantidades superiores de compostos fenólicos, sendo estes indicados como os principais responsáveis pelo poder antimicrobiano da própolis, juntamente com os flavonoides e outros compostos orgânicos (BURDOCK et al., 1998).

Em um estudo de desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação controlada de própolis intrabolsa periodontal, Bruschi (2006) avaliou a atividade antibacteriana dos microencapsulados de gelatina contendo própolis de Maringá- Paraná, obtidas por *spray-drying*, sendo constatado que, tintura à 30% de própolis apresentaram halos de inibição frente a *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, porém os microencapsulados não apresentaram nenhuma atividade inibitória.

Silva et al. (2006) também encontraram resultados diferentes do presente estudo. Os autores observaram que os extratos de própolis não inibiram o

crescimento de *C. albicans* e *S. aureus*, fato que indica que os compostos bioativos das amostras analisadas no estudo não têm ação antimicrobiana.

O método de difusão em agar é influenciada pela difusão da substância através de uma camada de agar solidificado contida em uma extensão tal que o crescimento do microrganismo seja totalmente inibido em uma área ou zona ao redor do reservatório contendo a substância bioativa (ESMERINO et al., 2004).

Portanto, foi observada a correlação entre o tamanho da zona de inibição e a dose da substância em questão, ou seja, o halo formado é dose-dependente, isto é, o tamanho do halo foi diretamente proporcional à concentração antimicrobiana. À medida que se aumentou a concentração da própolis, halos maiores foram gerados até que se esgotou sua capacidade de difusão. Ao analisar a atividade antibacteriana de extratos de própolis sobre *S. aureus*, Park et al. (1998) observaram que apenas concentrações acima de 30% de própolis começaram a apresentar uma ligeira atividade (zona de inibição de 5 mm), e quando utilizados extratos de 60 e 80%, a inibição do crescimento microbiano aumentou consideravelmente (zona de inibição de 15 mm).

Ainda são escassos os estudos disponíveis na literatura sobre atividade inibitória de microencapsulados a base de própolis. Além disso, há outro problema que torna difícil correlacionar os resultados obtidos: por ser um produto natural, fatores associados à técnica de extração, ao local de origem da própolis (flora), estações do ano em que foi produzida, contaminantes presentes e até a metodologia empregada podem ter influência sobre o teor de flavonoides, compostos responsáveis pela maior ou menor atividade biológica (BIANCHINI & BEBENDO, 1998).

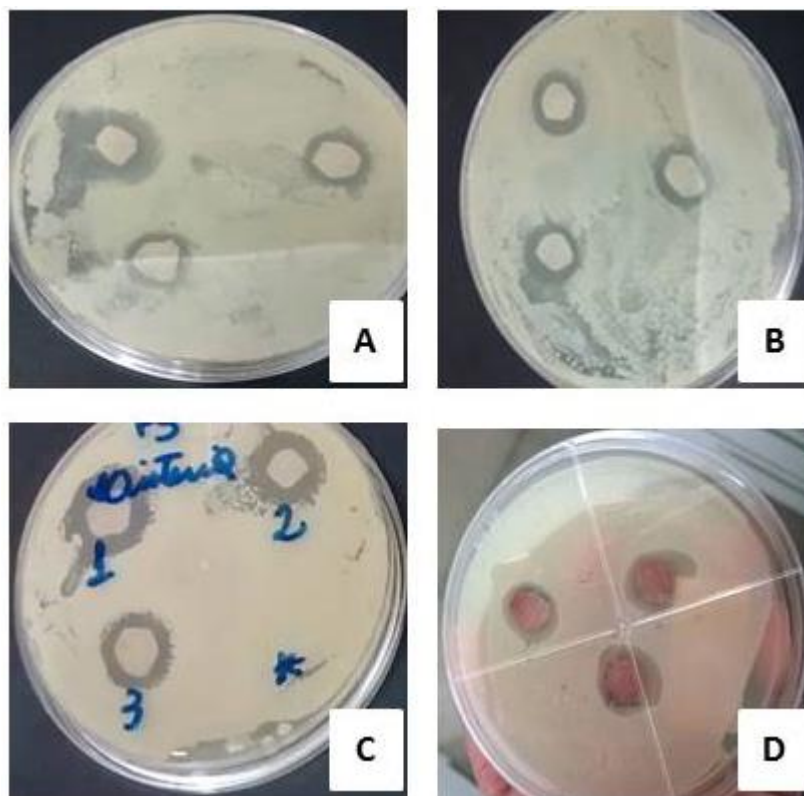


Figura 11. Halos de inibição das formulações. (A) F1_{SP} frente à *S. aureus*; (B) F1_L frente à *E. coli*; (C) F2_{SP} frente à *L. monocytogenes*; (D) F2_L frente à *S. aureus*.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade, sendo esse um parâmetro para avaliar a potência *in vitro* da amostra testada (MENDES, 1997; CLSI, 2012).

A atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de produtos naturais é considerada muito importante em concentrações inferiores à 100µg/mL (RIOS & RECIO, 2005).

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das formulações estão inseridos na tabela 7.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima dos microencapsulados obtidos pelo liofilizador e *spray-dryer*.

Formulações	CIM		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F1 _{SP}	85 µg/mL	500 µg/mL	167,5 µg/mL
F2 _{SP}	70 µg/mL	500 µg/mL	122 µg/mL
F1 _L	85 µg/mL	625 µg/mL	167,5 µg/mL
F2 _L	70 µg/mL	625 µg/mL	167,5 µg/mL
Tintura	135, 8 µg/mL	625 µg/mL	167,5 µg/mL

Foi observado que não houve diferença da CIM entre as técnicas de secagem, exceto com a bactéria *Escherichia coli* na qual percebeu-se que as F1_{SP} e F2_{SP} apresentaram menores concentrações que foram capazes de inibir o crescimento desta bactéria (500µg/mL), em comparação com as F1_L e F2_L (625µg/mL). Com *L. monocytogenes* também observou-se uma menor CIM na F2_{SP}. Portanto, apesar das diferentes concentrações de compostos fenólicos, sendo a F2_L a formulação que obteve as concentrações superiores, não foi observado reflexo na atividade antimicrobiana em comparação com as demais amostras.

Foi possível perceber, no presente estudo, que a susceptibilidade das formulações frente às cepas apresentou a ordem: *Staphylococcus aureus* > *Listeria monocytogenes* > *Escherichia coli*. Outros estudos já relataram esse fato (VARGAS et al., 2004; STEPANOVIC et al., 2003), e algumas explicações foram sugeridas pelos autores.

Suas ações são relacionadas, principalmente, ao efeito sinérgico entre ácidos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, especialmente, pinocembrina, pinobanksina e galangina (BURDOCK et al., 1998), bem como, é provável que os compostos fenólicos atuem ou aumentem a atividade de uma enzima (lisozima), responsável pela desestabilização da parede celular bacteriana, porém tais ações podem sofrer variações a depender da sensibilidade de cada grupo de bactéria (ANDRADE, 2010). Essa sensibilidade está ligada, provavelmente, as diferenças estruturais existentes entre as bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas, em que, as Gram-positivas, no caso deste estudo por *S. aureus* e *L. monocytogenes* são consideradas mais sensíveis à exposição de produtos antibacterianos, até porque, estas apresentam apenas uma parede celular composta, basicamente, de peptidoglicanos, enquanto que, de maneira geral, as bactérias negativas são mais resistentes, pois, além de peptidoglicanos, apresentam ainda uma camada adicional conhecida como membrana externa, rica em lipopolissacarídeos, dificultando assim a lise destas bactérias (MIZOERVA et al., 1997).

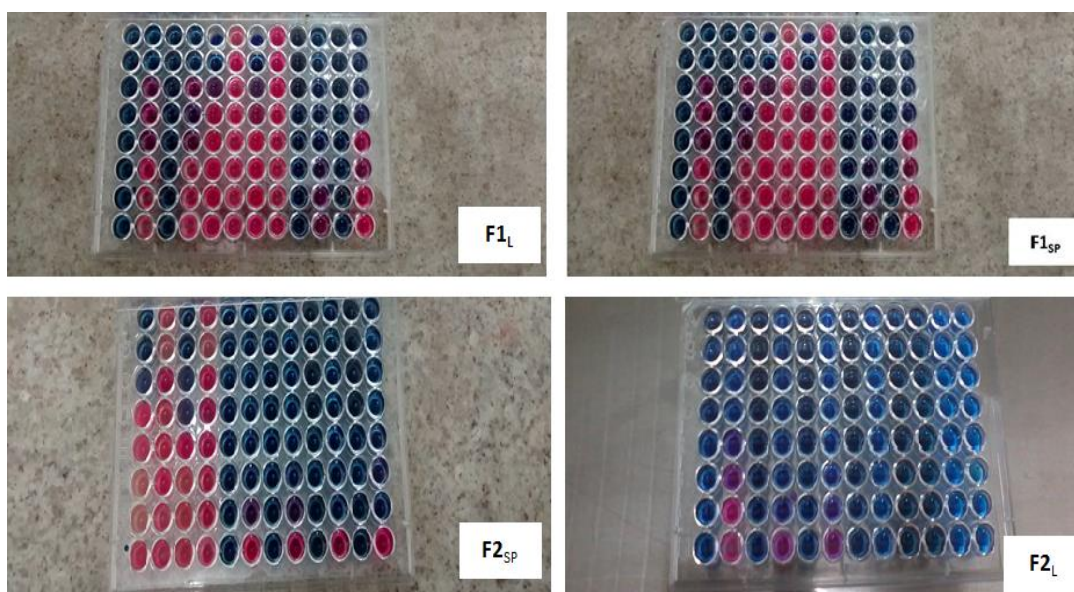


Figura 12. Resultados após adição de revelador resazurina para determinação da CIM.

Os três microrganismos utilizados no estudo foram sensíveis às formulações a base de própolis vermelha. As Concentrações Bactericidas Mínimas das amostras encontram-se descritas na Tabela 8. A F2_{SP} foi a que apresentou maior atividade com uma CBM de 67,93µg/mL, e as demais formulações apresentaram as mesmas concentrações. Novamente, a bactéria *E. coli* mostrou-se como o microrganismo mais resistente à ação da própolis, seguida por *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente.

Tabela 8. Concentração Bactericida Mínima dos microencapsulados obtidos pelo liofilizador e *spray-dryer*.

Formulações	CBM		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F1 _{SP}	135,87 µg/mL	1086,96 µg/mL	434 µg/mL
F2 _{SP}	67,93 µg/mL	1086,96 µg/mL	434 µg/mL
F1 _L	135,87 µg/mL	1086,96 µg/mL	434 µg/mL
F2 _L	135,87 µg/mL	1086,96 µg/mL	434 µg/mL

4 CONCLUSÃO

A liofilização e o *spray-drying* mostraram ser alternativas viáveis para o encapsulamento da própolis sem reduzir a atividade antimicrobiana após o processo, podendo contribuir para o mascaramento do sabor forte e amargo da própolis.

Os resultados microbiológicos mostraram-se satisfatórios e promissores, confirmando o fato de que a própolis é um potente inibidor de bactérias patogênicas, sendo as gram-positivas mais sensíveis à ação da própolis. A F2_{SP} apresentou menores CIM, com inibição de *S. aureus* (70µg/mL), *L. monocytogenes* (122µg/mL) e *E. coli* (500µg/mL).

Os resultados da CLAE-UV mostraram que as formulações apresentaram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção. Foram identificados os compostos: liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononectina e biochanina A. A cromatografia confirmou que houve incorporação da própolis vermelha nas amostras avaliadas. A F2_L apresentou as maiores concentrações de isoflavonas.

Os microencapsulados testados podem ser considerados candidatos a otimização de amostras a base de própolis vermelha. Tais resultados permitirão um controle de qualidade e, até uma futura padronização de produtos naturais e nutracêuticos, a fim de obter produtos com constância de composição e manutenção das propriedades alimentícias.

REFERÊNCIAS

- 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**, Lausanne, v, 113, n. 2, p.278-283, 2007.
- ANDRADE, U.V.C. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 85p. 2010
- ARAÚJO, A.L. **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa.** 2011. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química)- Escola em Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ASO, K.; KANNO, S.I.;TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.27, n.5, p.727-730, 2004.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch.** n. 50, p. 167–172, 1995.
- BANKOVA, V., CASTRO, S.L.D. e MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A.H. et al. Review article – Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p.561-571, 2001.
- BORGOGNONI, C.M. **Microencapsulação por liofilização de d-limoneno em maltodextrina e quitosana modificada.** São Paulo, 123 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against ***Streptococcus pyogenes***. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.3, p.174-177, 2000.
- BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal.** Ribeirão Preto, 320 p. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee própolis. **Food and Chemical Toxicology**. V. 36, p. 347-363, 1998.

CASTALDO, S.; CAPASSO, S. Propolis, na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 73, Suppl. 1, 2002.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.7, 2007.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; SHY, H.S.; LIN, J.K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 66, n. 4, p.503-506, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829-837, 2004.

CRISAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal Virology**, Bucareste, v.46, n.3-4, p.115-33, 1995.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P. & PARK, Y.K. 2008. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435–441.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans streptococci*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p. 527-531, 2003.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCHELESKY, M. E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciências Biológicas e Saúde**, n. 10, p. 53-60. 2004

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.1, n.2, p.63-69, 1995.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.3, n.2, p.287-294, 1997.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.2, p.173-182, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v.24, n.2, p.147–152, 2003.

HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n.3, p. 371-376, 2005.

KUMASAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 3, p.329-339, 2004.

MATSUDA, S.H. Propolis- health care food. **Foods and foods ingredients**, Tokyo, v.1, n. 160, p. 64-73, 1994.

MORAES, C.S. **Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas.** Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, SP, Brasil, 2009.

MIRZOEVA, O.K., GRISHANIN, R.N., CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, Barking, v.80, n.1, p. 29-33, 2003.

NAGAOKA, T.; BANKSOTA, A.H.; TEKUZA, Y.; MIRIDORIKAWA, K.; KADOTA, S. Caffeic acid phenylester analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p.487-491, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, Cambridge, v.17, n.1, p.215-232, 2000.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*.** 2007, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, U. C. F. **Desenvolvimento de um secador "spray" para obtenção de pós finos de precursor de Nióbio.** Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2007.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Science**, Tokyo, v.21, n.2, p. 85-90, 2002.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas

isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2005.

RIOS, J.L.; RECIO, M. Medicinal plants and antimicrobial plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-4,2005.

SFORCIN, J.L.; FERNANDES, J.R.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazillian própolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p.243-249, 2000.

STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiology Research**, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, n. 160, p. 189-195, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um alimento em pó, produzido a partir de própolis vermelha de Alagoas pode ser utilizado tanto como fármaco ou como alimento, pois a própolis apresenta várias funções biológicas, através de propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígenos e anticariogênico.

Um bom conhecimento sobre tudo que envolve o produto final, desde a composição química do produto *in natura*, passando pelos processos de transformações empregados, até às metodologias analíticas e microbiológicas utilizadas para se controlar a qualidade, é bastante significativo.

Os microencapsulados avaliados no estudo passaram nos testes químicos e microbiológicos, podendo ser considerados candidatos a otimização de microencapsulados de própolis vermelha, com aplicação na área farmacêutica e alimentícia.

REFERÊNCIAS

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**, Lausanne, v, 113, n. 2, p.278-283, 2007.

ASO, K.; KANNO, S.I.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.27, n.5, p.727-730, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução nº48, de 16 de março de 2004^a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CASTRO, M. S. A **Comunidade de abelhas (*Hymenoptera, Apoidea*) de uma área de caatinga arbórea entre os inselbergs de Milagres (12°53'S; 39°51'W), Bahia**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 191p. 2001.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.7, 2007.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; SHY, H.S.; LIN, J.K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 66, n. 4, p.503-506, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829-837, 2004.

CUSHINE, T.P.T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.26, n.1, p. 343-356, 2005.

DIÁRIO DA SAÚDE- SIS SAÚDE. Boletim: **Dicas e notícias e informações apícolas**, Porto Alegre, ano IV, n. 51, 2010.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and

adherence of *mutans streptococci*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p. 527-531, 2003.

HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. *In vitro* and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n.3, p. 371-376, 2005.

INOUE, H.T.; SOUSA, E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v.15, n.2, p. 65-69. 2007.

KUMASAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 3, p.329-339, 2004.

MATSUDA, S.H. Propolis- health care food. **Foods and foods ingredients**, Tokyo, v.1, n. 160, p. 64-73, 1994.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, Barking, v.80, n.1, p. 29-33, 2003.

NAGAOKA, T.; BANKSOTA, A.H.; TEKUZA, Y.; MIRIDORIKAWA, K.; KADOTA, S. Caffeic acid phenethylester analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p.487-491,2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, Cambridge, v.17, n.1, p.215-232, 2000.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of brazillian própolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Science**, Tokyo, v.21, n.2, p. 85-90, 2000.

RUSSO, A.; LONGO, R. E.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p.21-29. 2002.

SFORCIN, J.L.; FERNANDES, J.R.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p.243-249, 2000.

TAYLOR, P.W.; STAPLETON, P.T.; PAUL, L. J. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, New York, v.7, n.1, p. 1086-1091, 2002.