

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JESSICA VALÉRIA DE CAMPOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANÁLISE
MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA
(AFM) DA AÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE
SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JESSICA VALÉRIA DE CAMPOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANÁLISE
MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA
(AFM) DA AÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE
SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Dr. Rubens Bernardes Filho

Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis

São Carlos
2017



Folha da Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidato Jossica Valeria de Campos, realizada em 26/05/2017:

Prof. Dr. Jans Bernardes Filho
UFSCar

Prof. Dra. Cristina Parva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Denise Osim
ICSC/USP

DEDICATÓRIA

Dedico às pessoas que sempre serão o meu exemplo de vida e de quem sempre me orgulharei, meu pai Carlos Alberto de Campos e minha mãe Vilma Luchesi de Campos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me trouxe força, fé e a perseverança nos momentos mais difíceis.

À minha família, pelo amor incondicional, pelo apoio em todos os momentos. Por serem meu modelo e meu alicerce na vida.

Ao meu namorado, Raphael, pela paciência e amor, pelos conselhos valorosos e por ter estado ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus Orientadores Odílio Benedito Garrido de Assis e Rubens Bernardes Filho, pela grande atenção e contribuição para a realização deste trabalho. Pelos seus ensinamentos e conselhos que nunca serão esquecidos, e sempre me guiarão nos próximos desafios que enfrentarei.

Às técnicas de laboratório Joana Dias Bresolin e Silviane Zanni Hubinger pela imensa atenção e paciência, pelos ensinamentos e colaboração para desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dispensado na leitura deste trabalho, contribuindo com melhorias para finalização do mesmo.

Agradeço à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Instrumentação pela infraestrutura disponibilizada.

À empresa Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas LTDA, pela doação da amostra de própolis para produção dos extratos.

E a todos que contribuíram com meu trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Nos últimos anos a preocupação com a resistência de micro-organismos patogênicos tem aumentado devido ao uso intensivo de antibióticos e produtos agrícolas. Pesquisas sobre novas alternativas de agentes antimicrobianos naturais possibilitam a substituição, ainda que de forma parcial, dessas drogas sintéticas. O interesse no estudo das atividades biológicas da própolis tem ganhado importância devido ao seu grande potencial antimicrobiano, atribuído aos compostos fenólicos, em especial, aos flavonoides. Dessa forma, a própolis é uma importante alternativa terapêutica. A ação antimicrobiana dessa resina está comprovada em diversos estudos, entretanto, a análise do mecanismo de sua ação antimicrobiana ainda é escasso. Assim, identificar a presença dos constituintes responsáveis pela atividade antibacteriana, em conjunto com análises em microscópio de força atômica (AFM), que permite avaliar modificações das estruturas bacterianas tratadas com o extrato de própolis foi o principal objetivo deste trabalho. Extratos com diferentes proporções de água e etanol foram preparados e processados de forma padronizada. Os extratos foram caracterizados quanto à sua composição e propriedade antibacteriana, contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*. Foi observado que o uso de maiores concentrações de etanol na produção dos extratos proporcionou maiores extrações de flavonoides e melhores efeitos antibacterianos. Assim, os melhores resultados foram obtidos para o extrato etanólico de própolis composto por 100% etanol (EEP), e em contrapartida, o extrato menos eficaz, e composto por menores concentrações de flavonoides, foi o extrato aquoso (EAP). Os resultados obtidos nas análises em FTIR e CLAE confirmaram a maior presença de flavonoides nos extratos com maiores teores de etanol. Com relação às análises de microscopia, foi selecionado o extrato EEP pela sua maior capacidade antibacteriana. Os componentes presentes no extrato causaram interações com a *S. aureus*, levando a um aumento do volume celular, e provável ocorrência de bacteriólise. Para a inibição da *E. coli* foi necessário uma maior concentração do EEP, com claras alterações celulares quando tratada com o extrato etanólico, gerando um aumento do volume e presença de defeitos na parede celular. De uma forma geral, a própolis demonstrou ter ação sob a parede celular das bactérias, levando-as à sua inibição de crescimento.

Palavras-chave: compostos fenólicos, flavonoides, MIC, produto apícola, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

In the last years the concerns about the resistance acquired by pathogenic microorganisms has increased due to large misuse of antibiotics and agricultural products. Research about new alternatives and natural antimicrobial agents allows, at least, a partial replacement of synthetic drugs. The interest in studying the biological activities of propolis has gained importance due to its great antimicrobial potential, which is attributed to phenolic compounds, especially to the flavonoids. In this sense, the propolis appears as an important therapeutic alternative. The antimicrobial action of this resin has been confirmed in several studies; however, an analysis of the mechanism of action is still scarce. Thus, to identify the presence of antibacterial constituents along with the analyzes by atomic force microscope (AFM), that allows evaluating modifications of the bacterial structures treated with propolis extract, were the main aims of this work. Extracts with different proportions of water and ethanol were prepared and simultaneously processed following standards. The extracts were characterized related to their composition and antibacterial property against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* bacteria. It was observed that the use of higher concentrations of ethanol in the extract production provided higher extractions of flavonoids and better antibacterial effects. Thus, the best results were attained by the ethanolic extract of propolis, composed of 100% ethanol (EEP), and conversely, the less efficient extract, composed of lower concentrations of flavonoids, was the aqueous one (EAP). The results obtained in the analyzes in FTIR and HPLC confirm a greater presence of flavonoids in the extracts with higher levels of ethanol. Regarding the microscopic analysis, the EEP was selected for analysis considering its better antibacterial capacity. For a satisfactory inhibition of the *E. coli* growth a more concentrated extract was necessary, leading to an increase in cell volume, and a probable occurrence of bacteriolysis and the occurrence of cellular damages. In general, the propolis showed to have action on the cellular structure of both bacteria, leading to inhibition of microbial growth.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, MIC, bee product, antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas típicas de uma célula bacteriana	17
Figura 2 – Parede celular de bactérias Gram-positivas	18
Figura 3 – Parede celular de bactérias Gram-negativas.....	19
Figura 4 - Reação de óxido-redução do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.	26
Figura 5 - Estrutura básica dos flavonoides	28
Figura 6 - Algumas estruturas de flavonoides.	29
Figura 7 – Amostra de própolis utilizada no estudo.	38
Figura 8 – Aparência de cada extrato de própolis obtido, identificados segundo nomenclatura adotada.....	39
Figura 9 - Formação do complexo do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl ₃), formando o complexo estável flavonoide-Al ³⁺	40
Figura 10 – Conteúdo adicionado no tubo de cada grupo	44
Figura 11 – Diferenciação visual entre os diferentes extratos de própolis	46
Figura 12 – Curva padrão do ácido gálico.....	47
Figura 13 - Valores do teor de compostos fenólicos totais em cada extrato com base no ajuste obtido para o ácido gálico.....	48
Figura 14 – Curva padrão da quercetina.	50
Figura 15 – Valores do teor de flavonoides presentes em cada extrato de própolis, com base no ajuste obtido para a quercetina.....	50
Figura 16 – Cromatogramas em CLAE dos extratos de própolis (realizados em 290nm).	53
Figura 17 - Cromatogramas em CLAE dos extratos de própolis (realizados em 380nm).	54
Figura 18 – Espectroscopia na região do infravermelho de própolis bruta, com principais bandas de absorvâncias identificadas.....	56
Figura 19 – Comparação dos espectros dos extratos de própolis na região do infravermelho.	58
Figura 20 – Imagens topográficas das células de <i>S. aureus</i> no período de 4 horas.	65
Figura 21 – Imagens topográficas e perfil de alturas e diâmetros de <i>S. aureus</i> do grupo controle no período de 4 horas..	66
Figura 22 - Imagens topográficas e perfis da altura e diâmetro de <i>S. aureus</i> tratadas com extrato EEP.....	67
Figura 23 – Imagens topográficas das células de <i>S. aureus</i> no período de 12 horas	70
Figura 24 – Imagens topográficas das células de <i>E. coli</i> no período de 4 horas	73
Figura 25 – Imagens topográficas e perfil de alturas e diâmetros de <i>E. coli</i> do grupo controle no período de 4 horas..	74

Figura 26 - Imagens topográficas e perfis da altura e diâmetro de E. coli tratadas com extrato EEP durante 4 horas.	75
Figura 27 – Imagens topográficas das células de E. coli no período de 12 horas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos químicos encontrados na própolis.....	24
Tabela 2 - Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA necessários à comercialização da própolis	25
Tabela 3 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico e seus radicais.	27
Tabela 4 – Valores das principais bandas de absorção referentes à própolis bruta e à cada extrato de própolis.	59
Tabela 5 – Números dos poços de inibição do teste em microplaca de cada extrato de própolis e do etanol e valores das concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos extratos para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	61
Tabela 6 – Média das dimensões morfológicas de <i>S. aureus</i> expostas e não ao EEP durante 4 horas	68
Tabela 7 – Média das dimensões morfológicas de <i>S. aureus</i> expostas e não ao EEP durante 12 horas.....	71
Tabela 8 – Média das dimensões morfológicas de <i>S. aureus</i> expostas e não ao EEP durante 4 horas	76
Tabela 9 – Média das dimensões morfológicas de <i>S. aureus</i> expostas e não ao EEP durante 12 horas.....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Contaminação de alimentos.....	16
2.2 Ecologia bacteriana	16
2.2.1 Morfologia bacteriana.....	17
2.2.2 Possíveis danos à célula bacteriana por agentes antimicrobianos	19
2.3 Própolis.....	20
2.3.1 História.....	21
2.3.2 Publicações e Patentes.....	22
2.3.3 Composição química.....	23
2.3.3.1 Compostos fenólicos	25
2.3.3.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres.....	27
2.3.3.4 Flavonoides	28
2.3.4 Solventes utilizados na extração	30
2.3.5 Atividades biológicas.....	30
2.3.5.1 Atividade antimicrobiana	31
2.3.6 Possíveis mecanismos de ação antibacteriana da própolis.....	32
2.3.7 Aplicações da própolis	33
2.4 Caracterização bacteriana por Microscopia de força atômica	33
2.4.1 Princípio de funcionamento.....	34
2.4.2 Aplicações em estruturas microbianas	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Produção dos extratos de própolis	38
4.2 Análise do teor de compostos fenólicos totais.....	39
4.3 Análise do teor de flavonoides	40
4.4 Análise estatística.....	41
4.5 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
4.6 Espectroscopia na região do infravermelho	42
4.7 Atividade antibacteriana	42
4.7.1 Concentração inibitória mínima (MIC)	42
4.8 Microscópio de Força Atômica (AFM).....	43
4.8.1 Preparação das amostras bacterianas	43

4.8.2 Análise das amostras no AFM	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Efeito da proporção água/etanol como solvente extrator	46
5.2 Teor de compostos fenólicos totais	47
5.3 Teor de flavonoides	49
5.4 Identificação dos constituintes dos extratos de própolis por CLAE	51
5.5 Análise dos extratos por espectroscopia na região do infravermelho	55
5.6 Atividade antibacteriana	60
5.7 Análises das estruturas bacterianas através do AFM	64
5.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	64
5.7.1.1 Período de 4 horas de exposição	64
5.7.1.2 Período de 12 horas de exposição	68
5.7.2 <i>Escherichia coli</i>	72
5.7.2.1 Período de 4 horas de exposição	72
5.7.2.2 Período de 12 horas de exposição	76
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFM** – “Atomic Force Microscopic”, Microscópio de Força Atômica
- ANOVA** - Análise De Variância
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- ATR** – “Attenuated Total Reflection”, Reflectância Total Atenuada
- CAPE** – Ácido Cafeico Feniletil Éster
- CLAE** - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência
- DTA** – Doenças Transmitidas por Alimentos
- EAP** - Extrato Aquoso de Própolis
- EEP** - Extrato Etanólico De Própolis
- EHP30** - Extrato Hidroetanólico de Própolis 30% etanol
- EHP50** - Extrato Hidroetanólico de Própolis 50% etanol
- EHP70** - Extrato Hidroetanólico de Própolis 70% etanol
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FTIR** – “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, Transformada de Fourier
- LPS** – Lipopolissacarídeos
- MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MIC** – “Minimum Inhibitory Concentration”, Concentração Inibitória Mínima
- PVDF** – “Polyvinylidene Fluoride”, Fluoreto De Polivinilideno
- R²** - Coeficiente de Regressão
- URSS** - União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
- UV** – Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A própolis pode ser definida como uma substância resinosa natural, coletada pelas abelhas em diversas partes das plantas, como brotos e exsudados. Essa resina é utilizada pelas abelhas como material defensivo na colmeia, conferindo proteção contra insetos e micro-organismos invasores (GHISALBERTI, 1979).

A própolis contém substâncias compatíveis ao metabolismo humano, com baixa possibilidade de reações junto aos tecidos biológicos em comparação aos efeitos causados por demais agentes antimicrobianos químicos (SWERTS *et al.*, 2005). Portanto, por apresentar propriedades farmacológicas e por ser de simples obtenção, tem sido considerada uma potencial alternativa para a substituição, ou para o uso associado, a demais agentes antibióticos sintéticos (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2006).

Segundo Cushnie e Lamb (2005a), em função das diversas propriedades biológicas apresentadas pelos flavonoides, incluindo atividade anti-inflamatória, inibição enzimática e ação antibacteriana, estes são considerados como uma das principais classes de compostos que possuem potencial para serem utilizados como agentes terapêuticos e encontram-se presentes em grandes proporções na composição da própolis (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983).

A resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um problema de escala global (CUSHNIE; LAMB, 2005a), decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos sintéticos, seja no setor agropecuário e, principalmente, no de saúde humana, o que tem gerando a ocorrência de patógenos resistentes (CRISAN *et al.*, 1995).

A própolis apresenta composição complexa e com grande variação regional, contudo, como citado, compostos fenólicos como os flavonoides e ácidos fenólicos, aos quais são atribuídas suas atividades farmacológicas (PARK *et al.*, 1998) são seus principais componentes. Assim, a própolis tem sido amplamente utilizada em produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BURDOCK, 1998; CASTRO *et al.*, 2007; GHISALBERTI, 1978; MARCUCCI, 1995), tornando-se alvo de grande interesse mercadológico (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar os principais compostos presentes na própolis verde, colhida na região de Barbacena -

MG, e avaliar a atividade antimicrobiana de seus extratos aquosos e etanólicos contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, assim como investigar sua ação sobre as integridades das paredes microbianas através do uso de microscopia de força atômica (AFM).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação de alimentos

A ingestão de alimentos ou água contaminados por micro-organismos podem causar diversas perturbações fisiológicas, denominadas de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Essas doenças podem refletir em um grande risco à saúde do indivíduo (BRASIL, 2005).

Diversos grupos de micro-organismos, incluindo bactérias, protozoários, vírus e fungos filamentosos, podem ser agentes causadores de doenças de origem alimentar (BRASIL, 2005). As bactérias constituem o grupo microbiano mais associado às doenças transmitidas por alimentos. Dentre essas, as *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são importantes patógenos responsáveis por doenças alimentares (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Segundo Oliveira e Junqueira (2005), a ausência de boas práticas como a manipulação de alimentos em situação precária de higiene ao longo da cadeia (produção, armazenamento e distribuição) até no manuseio doméstico, pode refletir na contaminação desses alimentos. O emprego de antimicrobianos naturais, capazes de evitar ou mesmo eliminar contaminações é altamente desejável neste segmento, sendo a própolis um potencial material para o desenvolvimento de produtos para este fim.

2.2 Ecologia bacteriana

As bactérias são organismos unicelulares e devido à ausência de membrana nuclear, são denominadas de procariotos. A célula bacteriana pode assumir diversas formas, tais como cocos (esféricas ou ovoides), cilíndricas, bacilos (em forma de bastão) e espiral (em forma de saca-rolhas ou curvas), podendo ser encontradas em forma isolada ou em arranjos diferentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A locomoção bacteriana é de grande importância para o desenvolvimento de uma infecção, já que é necessário que o micro-organismo alcance o sítio de aderência e ali se reproduza. Algumas bactérias apresentam estruturas denominadas de flagelos, que são longos apêndices filamentosos responsáveis pelo movimento por impulsão. Uma única célula bacteriana pode apresentar inúmeros ou

somente um flagelo. Algumas bactérias não apresentam essas estruturas, locomovendo-se por deslizamento, sendo necessário um fluido para a locomoção das mesmas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

2.2.1 Morfologia bacteriana

As bactérias são compostas por uma membrana plasmática e uma parede celular, conforme esquematizado na Figura 1. A membrana plasmática é constituída por uma camada dupla de fosfolípidos que envolve completamente a célula. Além de manter o material citoplasmático no interior da célula, a membrana atua como uma barreira seletiva, permitindo ou bloqueando a passagem de moléculas e íons através da membrana. A parede celular é uma estrutura complexa, semirrígida e envolve toda a célula. Tem como principal função a proteção da membrana plasmática, prevenindo assim, a ruptura da célula e conseqüentemente, a morte do organismo. Devido às diferenças na constituição da parede celular, as bactérias são classificadas em Gram-positivas, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Streptococcus pneumoniae*, etc, e Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

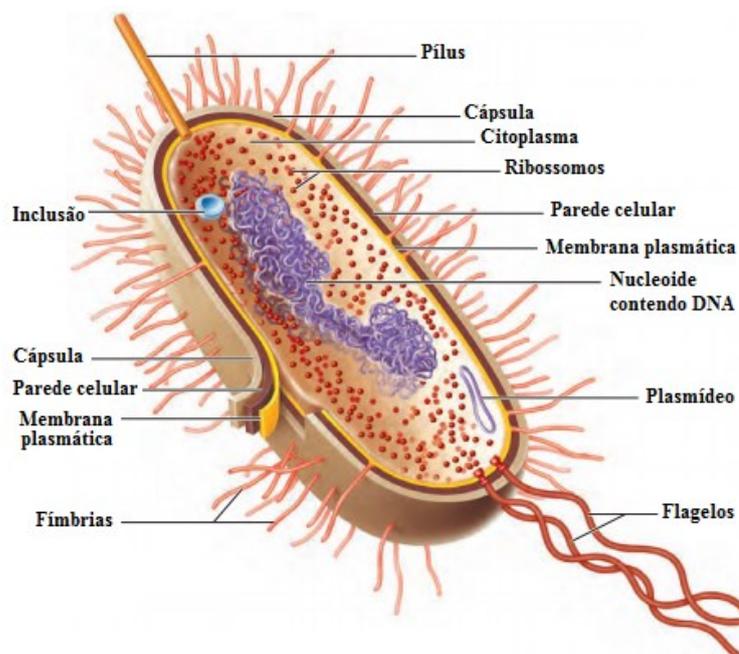


Figura 1. Estruturas típicas de uma célula bacteriana (Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, p.80).

Tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas apresentam parede celular com composição química semelhante, denominada peptídeoglicana. Essa camada consiste em um dissacarídeo repetitivo, composto pelos monossacarídeos N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM), unidos por polipeptídeos (grupo de aminoácidos L-alanina, D-alanina, ácido-glutâmico e lisina), formando uma rede que envolve e protege toda a célula. Na maioria das bactérias Gram-positivas a parede celular apresenta diversas camadas de peptídeoglicanos, como ilustrado na Figura 2, sendo assim cerca de 90% da parede celular é composta por esse polímero, caracterizando uma estrutura rígida e espessa. Além deste, a parede também é formada pelo ácido teicóico e proteínas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

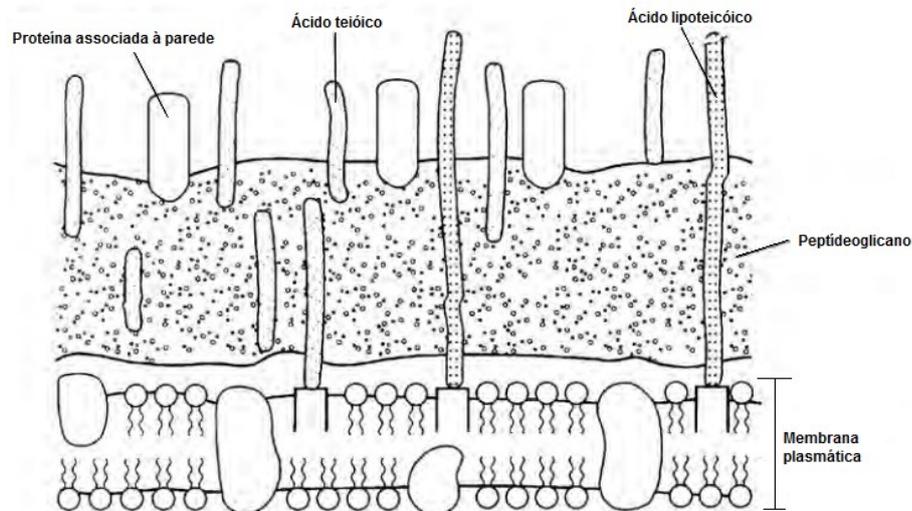


Figura 2 – Parede celular de bactérias Gram-positivas (Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p.37).

A estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas (Figura 3) possui camadas adicionais, denominadas de membrana externa, uma vez que estão localizadas externamente à camada de peptídeoglicana. A membrana externa é formada por dupla camada lipídica, possuindo uma camada interna composta basicamente por fosfolipídeos, e uma camada externa contendo lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas (porinas, proteínas de membrana e lipoproteínas). O LPS é constituído por um lipídeo complexo (lipídeo A), ao qual está ligado um polissacarídeo (antígeno O). A capacidade tóxica do LPS, também denominado como endotoxina, pode provocar respostas fisiológicas em animais, como febre, por exemplo. Embora a principal função dessa membrana seja estrutural, ela também atua como uma barreira seletiva bloqueando a passagem de alguns componentes

tóxicos à célula, como antibióticos (por exemplo, penicilina) e enzimas digestivas como a lisozima, e detergentes e sais biliares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A camada de peptidoglicano em bactérias Gram-negativas é denominada de periplasma, sendo localizado entre as membranas externa e plasmática. Além do peptidoglicano, o periplasma é composto por proteínas e enzimas. As proteínas são responsáveis pelo transporte de solutos para o interior da célula. Dentre as enzimas presentes nessa camada, as enzimas hidrolíticas (proteases, nucleases e lipases) são as responsáveis pela lise de macromoléculas, produzindo moléculas menores, permitindo a passagem dessas pela membrana plasmática; outras enzimas presentes nessa camada podem realizar a inativação de algumas drogas, como exemplo a beta-lactamase, capaz de inativar o antibiótico penicilina.

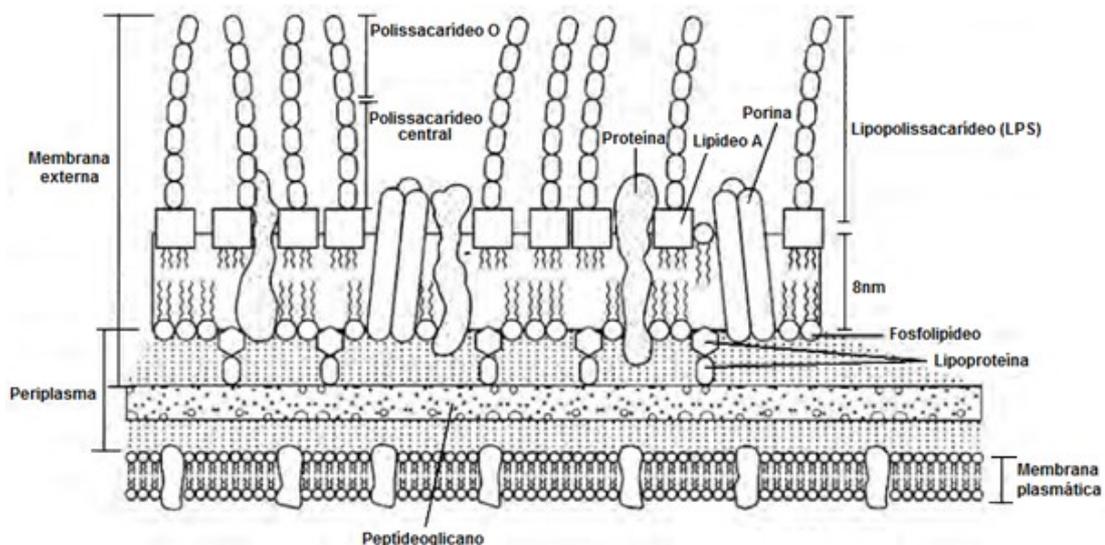


Figura 3 – Parede celular de bactérias Gram-negativas (Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p.37).

2.2.2 Possíveis danos à célula bacteriana por agentes antimicrobianos

Causar lesão à parede celular é o objetivo (ou forma de atuação) de algumas drogas antimicrobianas. Um exemplo comumente utilizado é a enzima lisozima, que possui atividade digestiva sobre a camada de peptidoglicano da parede celular de bactérias Gram-positivas, tornando-as vulneráveis à lise. Entretanto, devido à presença da membrana externa, as bactérias Gram-negativas possuem maior resistência à lisozima, pois mesmo quando a membrana externa é degradada parcialmente, a membrana interna permanece íntegra, impedindo o rompimento celular. A destruição da membrana plasmática é outro local de ação visado por

vários agentes antimicrobianos. Esses agentes incluem alguns álcoois e compostos de amônia quaternária, que são responsáveis por romper a membrana fosfolipídica, levando à bacteriólise e conseqüentes perdas de fluidos internos, causando a morte celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

2.3 Própolis

A palavra "própolis" é de origem grega e formada pela união de "pro"= *em favor de*, e "polis"= *cidade*, considerando sua utilização na defesa e proteção das colmeias (MARCUCCI, 1996; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). A própolis é uma substância resinosa de composição complexa produzida pelas abelhas (*Apis mellifera*) sendo resultante do processamento de materiais coletados da flora próxima à colmeia. A estes materiais são adicionados enzimas provenientes das secreções salivares, especialmente a β -glicosidase, que hidrolisam os flavonoides glicosilados em agliconas livres, que apresentam elevada ação farmacológica (VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979a, 1979b). Posteriormente são adicionadas ceras, as quais conferem maleabilidade à própolis (BURDOCK, 1998).

As abelhas utilizam a própolis como material defensivo na colmeia contra a ação de insetos e micro-organismos, recobrando as paredes e realizando preenchimentos de lacunas e rachaduras, assim como no preparo de locais assépticos para a rainha depositar seus ovos e no embalsamento de insetos invasores, impedindo sua putrefação pela sua ação antimicrobiana (GHISALBERTI, 1978; MARCUCCI, 1995). A própolis é considerada responsável pela baixa ocorrência de fungos e bactérias no interior das colmeias (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; KALOGEROPOULOS et al., 2009; RAMOS; MIRANDA, 2007).

Além das atividades antimicrobianas também é atribuída à própolis outras atividades biológicas benéficas como anti-inflamatória, antiúlcera gástrica, anestésico local, antitumoral e imunoestimulante (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BURDOCK, 1998; GHISALBERTI, 1978; MARCUCCI, 1995). Em função de tais atividades a humanidade tem feito amplo uso desta substância desde os tempos antigos, sendo a própolis considerado um medicamento da "medicina popular" (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Por ser produzida em diferentes regiões do planeta, a própolis possui características muito variadas, como composição química, cor, sabor e aroma, que

dependem das espécies botânicas da região e também da abelha que a produz. A característica maleável da própolis pode indicar a presença de alto teor de lipídeos (cera), em contrapartida, na própolis com características mais rígidas e frágeis, é maior o teor de resinas vegetais, sendo estas as mais almejadas pelo mercado, considerando que suas atividades biológicas são atribuídas aos componentes presentes nas resinas (FUNARI; FERRO, 2006).

2.3.1 História

Ao longo da história diversos produtos naturais passaram a ser utilizados pelo homem como medicamentos. Dentre esses, a própolis vem sendo empregada por séculos pelos romanos, incas, egípcios e assírios. Também conhecida como “cera negra” no antigo Egito (1700 a.C.), a própolis, devido a sua atividade anti-putrefativa, era um dos materiais empregados para embalsamar cadáveres (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; LUSTOSA et al., 2008; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Também foi usado pelos assírios, no tratamento de infecções e inchaços (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007). Na Grécia antiga, a própolis tornou-se popular no uso para o processo de cicatrização, e pelos romanos, foi descrita como de uso medicinal geral (CAPASSO; CASTALDO, 2002; LUSTOSA et al., 2008). Os Incas faziam uso da própolis como um agente antitérmico (CAPASSO; CASTALDO, 2002).

No século XIX, durante a guerra Anglo-Boer na África do Sul, a própolis foi utilizada como unguento para tratamento de ferimentos de guerra. Durante a Segunda Guerra Mundial, também foi amplamente utilizada no tratamento de diversas injúrias (LUSTOSA et al., 2008; MARCUCCI, 1996). Na antiga URSS e em países no leste da Europa, a própolis mereceu especial atenção na medicina humana e veterinária, principalmente no tratamento da tuberculose, com registros de redução das deficiências pulmonares e na recuperação do apetite (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Em demais países como Japão e nas Américas do Norte e do Sul, a própolis tornou-se popular a partir dos anos 1980 (SALATINO et al., 2005).

2.3.2 Publicações e Patentes

Do ponto de vista técnico-científico, os primeiros escritos sobre a ação da própolis datam do século XVI na França (MARCUCCI, 1996). Em 1908, o primeiro trabalho científico sobre as propriedades químicas e “composição” da própolis foi publicado por Helfenberg e indexado no Chemical Abstract (referência nº 192). Nas décadas de 1980 e 1990, houve um substancial crescimento no número de publicações científicas sobre a própolis, principalmente no Japão, com foco em suas propriedades biológicas. Segundo o Chemical Abstract entre 1965 a 2000 foram catalogadas 450 publicações científicas no tema, originárias de 39 países distintos. No Brasil, a primeira publicação sobre a própolis data de 1984, apresentando um estudo comparativo entre a ação da própolis e de antibióticos na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Atualmente diversos grupos e instituições pesquisam o uso e características da própolis e ainda que, o Brasil esteja em uma posição de destaque em relação a produção e comércio da própolis, a atividade de pesquisa não reproduz de forma condizente, em termos de quantidade e conteúdo, o interesse internacional sobre o potencial deste material (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

A primeira patente sobre própolis, segundo o *Chemical Abstract*, é de origem romena e data de 1965, a qual descreve o uso da própolis para a produção de loções para banho (IULIU, 1965 apud PEREIRA et al. 2002). Desde a publicação desta até aproximadamente os anos 2000, o número de patentes mundialmente concedidas, tendo própolis como matéria-prima principal, totaliza 239 (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Até o final da década de 1980, a URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia, dominaram o tema e conseqüentemente o número de patentes fazendo uso a própolis. Atualmente é o Japão que lidera com 43% dos depósitos. O Brasil obteve sua primeira patente em 1995 para o uso da própolis em tratamentos odontológicos e na prevenção de cáries e gengivites. Contudo, o desenvolvimento de novas tecnologias ou processos empregando a própolis no Brasil é extremamente baixo, inferior a 2% de todas as patentes depositadas no país (duas patentes entre 1995 e 2000). Este fato é decorrente, entre outras razões, pela ausência de uma política de “proteção” do conhecimento desenvolvido no país. Em

contrapartida, ocorre o oposto no Japão, no qual foi depositado 98 patentes no mesmo período (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

2.3.3 Composição química

Como já comentado, a composição química da própolis é extremamente complexa e variada. Os principais constituintes, segundo a literatura, são a cera de abelha, as resinas vegetais e diversos compostos voláteis (SALATINO et al., 2005). A própolis contém mais de 300 substâncias, com grande variação regional (da flora onde é coletada) e sazonal (do período em que esta coleta ocorre) (DOS SANTOS et al., 2003; FUNARI; FERRO, 2006). Além desses fatores, a variabilidade genética das rainhas também tem forte influência na composição química final (PARK et al., 1998).

De um modo geral, a própolis, é composta por 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais e 5% de grão de pólen, além de flavonoides, ácidos graxos, ácidos aromáticos, fenóis, aminoácidos, aldeídos, cetonas, terpenóides, e minerais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e vitaminas B1, B2, B6, C e E (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MARCUCCI, 1996; BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983). Seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos à presença de diversos compostos fenólicos, principalmente aos flavonoides (PARK et al., 1998).

Adelmannm (2005), Bankova, Castro e Marcucci (2000) e Marcucci (1995) identificaram os principais grupos químicos constituintes da própolis, confirmando sua composição heterogênea e diversificada, segundos dados resumidamente apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos químicos encontrados na própolis (Fonte: ADELMANNM, 2005; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MARCUCCI, 1995).

Classe	Tipos
Ácidos alifáticos e seus ésteres	Ácidos: Acético, angélico, butírico, cítrico, esteárico, fumárico, glutárico, isobutírico, linoléico, málico, metilbutírico, mirístico, salicílico, sórbico, succínico. Ésteres: Acetato de isobutila, acetato de isopentila e de isopentenila.
Ácidos aromáticos e seus ésteres	Ácidos: Ácido 3,4-dimetoxicinâmico, benzóico, caféico, cinâmico, cumárico, ferúlico, gálico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, salicílico, vanílico. Ésteres: Acetato de benzila, benzoato de benzila, benzoato de etila, benzoato de metila, cafeato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de fenil etila, cumarato de benzila, ferulato de prenila, salicilato de benzila e salicilato de metila.
Ácidos graxos e seus ésteres	Ácidos: Araquídico, behênico, cerótico, láurico, lignocérico, mirístico, oleico e palmítico. Ésteres: hexacosilhexadecanoato.
Açúcares	Ácido galacturônico, d-frutose, d-glucitol, d-glucose, d-ribofuranose, eritritol, galactose, inositol, lactose, maltose, manose, melibiose, sacarose, talose, xilitol e xilose.
Álcoois	Benzílico, cinamílico, eugenol, fenetílico, isobutenol e prenílico.
Aldeídos	Aldeído caprótico, anetol, benzaldeído, caprótico, haxanal, isovanilina, p-hidroxibenzaldeído e vanilina.
Aminoácidos	β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, ácido aspárico, ácido glutâmico, ácido piroglutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, cistina, fenilalanina, glicina, hidroxiprolina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, prolina, sarcosina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina.
Cetonas	Acetofenonas e seus derivados.
Chalconas	Chalcona de alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinocembrina.
Esteróides	Acetatos de estigmasterol e calinasterol.
Flavonoides	Flavonas e flavonóis: Acacetina, apigenina, crisina, galangina, kampferol e quercetina. Flavononas: Naringenina, pinobanksina, pinocembrina, pinostrobina e sakuranetina.
Lignanas	Aschantina, dihidrobenzofurano, sesamina e sesartenina.
Minerais	Alumínio, bário, bismuto, cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, estrôncio, ferro, magnésio, manganês, níquel, potássio, prata, silício, sódio, titânio, vanádio e zinco.
Terpenóides	1,8-cineol, cimeno, estireno, farnesol, geraniol, hexanolactona, limoneno e naftaleno.
Vitaminas	A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico e ácido pantotênico.

No Brasil a comercialização da própolis é realizada principalmente na forma de extratos etanólicos e hidroetanólicos. Estes e outros produtos apícolas possuem registros junto à ANVISA e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e seguem legislações específicas para seu uso e comercialização. Para assegurar um padrão de qualidade da própolis existe uma legislação criada pelo MAPA; a Instrução Normativa nº 3 do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis, que define os procedimentos e requisitos mínimos necessários à sua comercialização. Na tabela 2 temos listados os requisitos físico-químicos exigidos pela norma.

Tabela 2 - Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA necessários à comercialização da própolis (Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001)

Parâmetros	Própolis bruta	Extrato hidroalcoólico
Cera	-	1% do extrato seco
Compostos fenólicos	Mínimo de 5% (m/m)	Mínimo de 0,5% (m/m)
Flavonoides	Mínimo de 0,5% (m/m)	Mínimo de 0,25% (m/m)
Atividade de oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Solúveis em etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-
Extrato seco	-	11% (m/v)
Teor alcoólico	-	Máximo de 70° GL (v/v)
Metanol	-	Máximo 0,40 mg/L

2.3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem-se em substâncias químicas caracterizadas por um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático. Nos vegetais, os compostos fenólicos são abundantes e diversos, oriundos do metabolismo secundário das plantas, tendo como origem os aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina. Os compostos fenólicos são altamente reativos e antioxidantes (tem a capacidade de doar hidrogênio ou elétron), além da capacidade de quelar metais, inibir a enzima lipoxigenase e sequestrar radicais livres. Por apresentar alta biocompatibilidade atribui-se à atividade biológica da própolis a presença de compostos fenólicos diversos em sua composição (DE CASTRO, 2001).

Dentre as diversas estruturas fenólicas encontram-se os ácidos fenólicos, flavonoides, fenóis simples, taninos, cumarinas e ligninas que são as mais comuns. Estas substâncias são encontradas nos diversos seres vivos (reino vegetal e animal) com forte presença nos micro-organismos. No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático, fazendo com que a síntese, em baixas quantidades, de compostos fenólicos, torne-se possível pela administração exógena, isto é, substâncias aromáticas obtidas através da dieta. Em contrapartida, os vegetais e a maioria dos micro-organismos são capazes de sintetizar o anel benzênico, possibilitando a produção de diferentes compostos fenólicos (OLDONI, 2007).

Como citado, diversas atividades biológicas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, destacando-se as agliconas de flavonoides, os ácidos fenólicos e seus ésteres aos quais são atribuídos elevada atividade contra vários micro-organismos patogênicos (BANSKOTA et al, 1998; BURDOCK, 1998).

Para a determinação do teor de compostos fenólicos, o método mais utilizado é o espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, no qual os fenóis contidos na amostra reagem com uma mistura dos ácidos de molibdênio e tungstênio (reagente Folin-Ciocalteu). Resumidamente, o ácido de molibdênio está no estado de oxidação (apresenta coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), quando este é colocado em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se complexos de molibdênio-tungstênio $[(\text{PmoW}_{11}\text{O}_4)^{-4}]$ (Figura 4), gerando uma solução de coloração azul (GALLICE; MESSERSCHMIDT; ZAMORA, 2011; OLIVEIRA, 2011). A intensidade das absorbâncias nos comprimentos de onda característicos permite assim a quantificação da quantidade de composto presente.

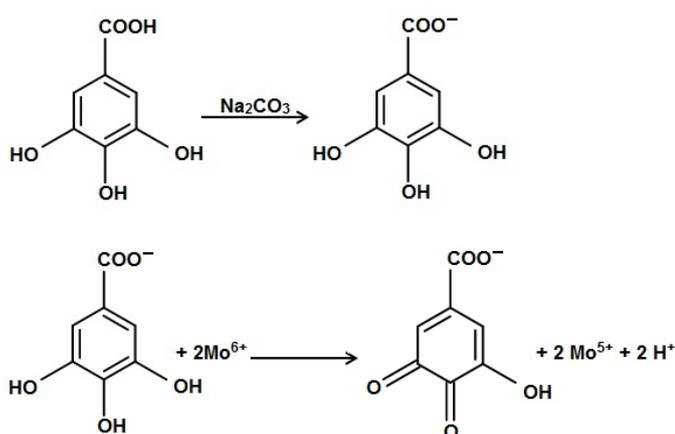
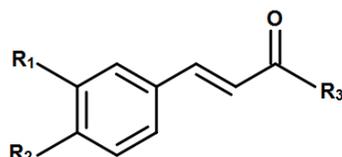


Figura 4 - Reação de óxido-redução do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.

2.3.3.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres

Os principais ácidos fenólicos são aqueles derivados de ácido benzoico e os derivados de ácido cinâmico, os quais são constituídos em comum por um núcleo básico hidroxifenilpropenoico, conforme ilustrado na tabela 3.

Tabela 3 - Núcleo básico hidroxifenilpropenoico e seus radicais (Fonte: PEREIRA, 2011).



Ácidos fenólicos	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido cafeico	OH	OH	OH
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	OH	OH
Ácido ferúlico	OH	OCH ₃	OH
Ácido isoferulico	OCH ₃	OH	OH
Ácido 3,4 – Dimetil-cafeico	OCH ₃	OCH ₃	OH
Ácido <i>p</i> -cumárico metil éster	H	OH	OCH ₃
Ácido <i>p</i> -cumárico isoprenil éster	H	OH	
Ácido cafeico isoprenil éster	OH	OH	
Ácido cafeico benzil éster	OH	OH	
Ácido cafeico feniletill éster, CAPE	OH	OH	
Ácido cafeico cinamil éster	OH	OH	

Adicionalmente, em análises do extrato etanólico de própolis verde por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Barros e colaboradores (2007) identificaram a presença de outros ácidos além dos dispostos na tabela 3, como o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (drupanina) e o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepelina C).

2.3.3.4 Flavonoides

A palavra flavonoide tem origem no latim *flavus*, que significa amarelo. No início o termo “flavonoide” era atribuído somente aos compostos que apresentavam essa coloração. Atualmente esse termo inclui compostos de colorações diversas, menos intensas, ou incolores, como as antocianinas que apresentam coloração vermelha ou azulada (ÁSSIMOS, 2014).

Diversas formas estruturais podem ser encontradas para os flavonoides, das quais todas são caracterizadas por possuírem um núcleo básico composto por dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados através de um anel pirânico (anel C), conforme ilustração disposta na figura 5 (STALIKAS, 2007).

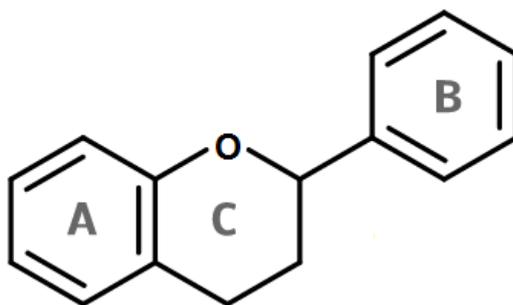


Figura 5 - Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides estão amplamente distribuídos no reino vegetal, estão presentes em toda estrutura das plantas, desde as raízes até as flores e frutos. A presença destes compostos pode ocorrer em duas formas: na forma livre ou ligados a açúcares, como as agliconas e glicosídeos (VILA, 2006).

A grande diversidade estrutural dos flavonoides decorre das modificações que estes compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. Dependendo do estado de oxidação do anel heterocíclico, os flavonoides podem ser separados em diversas classes, como antocianinas, flavanas,

flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonoides (LOPES et al., 2000; STALIKAS, 2007). Tais compostos são polares ou moderadamente polares, sendo assim, solúveis em etanol, metanol, butanol ou em combinações desses solventes com água (VILA, 2006).

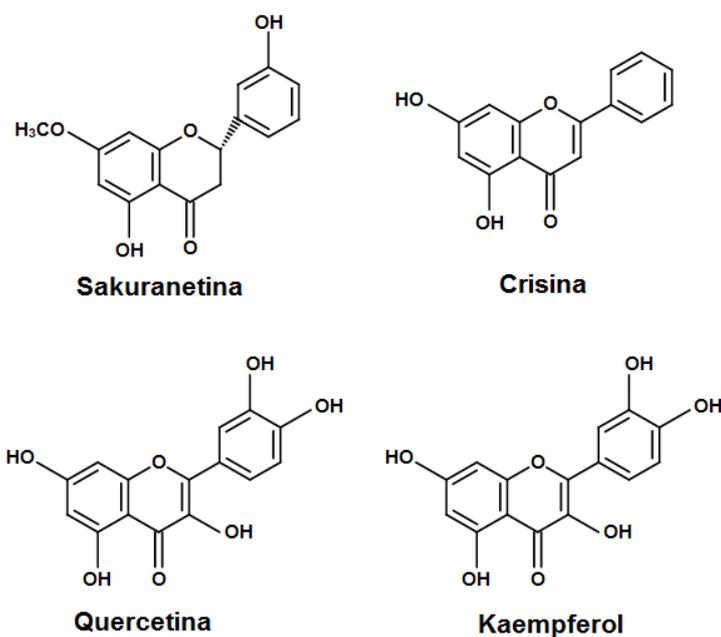


Figura 6 - Algumas estruturas de flavonoides.

Os flavonoides desempenham várias funções na planta, por exemplo, a geração de cores que auxiliam na atração de agentes polinizadores ou como uma “barreira” química na defesa contra ataques de micro-organismos (bactérias, fungos e vírus) ou insetos e outros animais. Além disso, os flavonoides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, reduzindo os efeitos degradativos da radiação UV presente na luz solar.

Segundo Cushnie e Lamb (2005a), preparações contendo flavonoides como principais constituintes fisiologicamente ativos têm sido usados durante séculos por curandeiros e médicos para tratar diversas enfermidades. Diversos estudos têm relatado que a atividade antibacteriana da própolis está ligada à alta concentração de flavonoides (BOSIO et al., 2000; CHENG; WONG, 1996; GRANGE; DAVEY, 1990). Longhini e colaboradores (2007) e Park et al. (1998), também afirmam que a capacidade antibacteriana de extratos de própolis está diretamente associada ao teor de flavonoides em cada extrato. Em estudo recente, Franca et al. (2014), identifica os flavonoides quercetina, kaempferol, galangina e pinocembina, e os ésteres de ácidos fenólicos como responsáveis pela ação antimicrobiana.

Para a determinação do teor de flavonoides é comumente empregado o método descrito por Park et al. (1995), no qual a reação dos flavonoides com cloreto de alumínio promove a formação de complexos estáveis.

2.3.4 Solventes utilizados na extração

Segundo Fontana e colaboradores (2004), o solvente mais adequado para a maioria das preparações farmacêuticas, e também para a extração dos componentes de interesse da própolis é o álcool em concentrações entre 70 e 80%. Extratos contendo maiores concentrações de água podem apresentar aparência opaca, devido à insolubilidade de ceras e/ou de componentes menos hidrofílicos presentes na própolis. De acordo com Konishi et al. (2004), a própolis bruta contém substâncias solúveis em água e em óleo e, também, em ambos. Entretanto, a maior parte da própolis é composta por substâncias com características apolares, insolúveis em água, dessa forma, a extração mais eficiente da própolis pode ser realizada através do emprego do álcool como solvente. Sun e colaboradores (2015) investigaram o efeito de diferentes concentrações de solventes água/etanol (25, 50, 75 e 100%) na extração de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de própolis, observando que a extração destes compostos demonstrava-se maior à medida que maiores concentrações de etanol eram usadas como solvente.

Apesar da água e etanol serem os solventes mais utilizados para a extração de componentes ativos, há autores que utilizaram outros solventes, como Moraes et al. (2008) que avaliou cinco tipos de solventes extratores como o acetato de etila, acetona, clorofórmio, hexano e o metanol. Bankova, Popov e Marekov (1983), Marcucci et al. (2001), Funari & Ferro (2006), entre outros utilizaram o metanol como solvente da própolis. O uso desses solventes é eficiente, entretanto, são considerados tóxicos, logo o uso da água e etanol torna-se assim mais apropriado para a produção dos extratos com objetivos de uso humano.

2.3.5 Atividades biológicas

A própolis é um produto utilizado na medicina tradicional desde os tempos antigos, e tem ganhado grande atenção recentemente devido ao seu amplo uso em medicamentos, produtos alimentícios, dermatológicos e domésticos, em razão de

suas várias propriedades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, entre outros (LU; CHEN; CHOU, 2005; MARCUCCI, 1995; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

2.3.5.1 Atividade antimicrobiana

Segundo revisão apresentada por De Castro (2001), a presença de flavonoides e derivados de ácido cafeico está diretamente associada às atividades antibacterianas de extratos de diferentes amostras de própolis. Diversos estudos registram que extratos etanólicos de própolis (EEP) apresentam elevada capacidade de inibição frente ao crescimento de bactérias Gram-positivas, contudo com baixa atividade sobre as Gram-negativas. Sforcin e colaboradores (2000) notaram forte ação do EEP contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, que foi suscetível a baixas concentrações do extrato, entretanto quando o extrato foi testado contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, foram necessárias maiores concentrações para que ocorresse uma inibição efectiva. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Grange & Davey (1990), que ao avaliarem 21 cepas de bactérias, entre elas Gram-positivas e Gram-negativas, notaram que as Gram-negativas apresentaram uma maior resistência à própolis do que as Gram-positivas, o que foi atribuída às diferenças nas estruturas dessas bactérias.

Park et al. (1998) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis produzidos com diferentes concentrações de água e etanol, dos quais os extratos que apresentaram maior atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus* foram de 60, 70 e 80% etanol, não havendo inibição para o extrato aquoso. No estudo de Bankova et al. (1999), extrato de própolis com 70% etanol foi testada contra *S. aureus* e *Candida albicans* com grande capacidade antibacteriana e antifúngica. Fernandes Jr et al. (1995) avaliaram as capacidades antibacteriana e antifúngica do EEP contra micro-organismos isolados de pacientes humanos, apresentando a seguinte ordem de sensibilidade ao extrato: *Staphylococcus aureus* > *Salmonella typhimurium* > *Escherichia coli* para as bactérias e *Candida albicans* > *Candida guilliermondii* > *Candida parapsilosis* para os fungos avaliados.

2.3.6 Possíveis mecanismos de ação antibacteriana da própolis

No estudo de Mirzoeva et al. (1997), foi verificado o efeito antibacteriano do extrato etanólico de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, encontrando que bactérias Gram-negativas são mais resistentes ao extrato do que bactérias Gram-positivas, provavelmente devido à presença da membrana externa nessas espécies. O equilíbrio do potencial de membrana é essencial para as bactérias, pois através dele ocorre o transporte de nutrientes pela membrana entre o meio externo e interno, a síntese de ATP e a motilidade celular. Os autores constataram que a própolis e alguns de seus componentes (quercetina, naringerina, ácido cafeico e CAPE – ácido cafeico fenil-etil éster) provavelmente possuem efeito sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, desestabilizando o gradiente eletroquímico de prótons da membrana o que leva à interferência sobre os processos essenciais para a manutenção da célula. Estes componentes presentes na própolis também foram relatados como responsáveis pela inibição da motilidade bacteriana.

Através de análises por microscopia eletrônica, Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994) notaram que a própolis promoveu a inibição do crescimento bacteriano pela modificação de processos de divisão celular, desorganizando o citoplasma celular e causando alterações na membrana plasmática e defeitos na estrutura das paredes celulares, resultando em uma bacteriólise parcial. Cushnie e Lamb (2005b) identificaram que o flavonoide galangina é um dos responsáveis por danos a membrana bacteriana, causando lise osmótica que leva a perda de potássio do interior da célula. Bryan, Redden e Traba (2015) também fazendo uso de microscopia eletrônica (MEV) avaliaram a ação do extrato etanólico de própolis de origem Rússia contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Após 18 horas de exposição ao extrato as bactérias apresentaram graves danos às paredes celulares, que segundo os pesquisadores, indicam que o extrato induz lesões na parede celular, levando à lise da célula, e eventualmente, morte bacteriana.

2.3.7 Aplicações da própolis

Em todo o mundo a própolis é utilizada com o intuito de melhorar a saúde e prevenir doenças, como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e até mesmo câncer (BANSKOTA et al., 2002). A própolis também é comumente utilizada no tratamento de infecções na garganta, halitose (mau hálito), úlceras, eczema e infecções urinárias (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Lustosa *et al.* (2008) relatam que no mercado brasileiro há existência de aproximadamente noventa produtos a base de própolis, dentre eles cápsulas, chá, sabonete, bala, creme, protetor solar, pomada, condicionador, xampu, entre outros. A lista de aplicações da própolis é extensa (BURDOCK, 1998). Estas aplicações incluem produtos dermatológicos os quais são utilizados para a cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, úlceras nas pernas e herpes simples e genital. Utilizada na composição de “bio-cosméticos” em pomadas, loções antiacne e cremes faciais. A própolis também pode ser encontrada em preparações bucais no tratamento de gengivites e na pós-extração dentária, prevenindo infecções no local (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998).

Soluções de própolis (5 – 10%) tiveram resultados positivos no tratamento de otite externa, otite crônica e perfurações do tímpano. Na otorrinolaringologia a própolis também é utilizada para tratar inflamações de ouvido, bronquite crônica, rinite, faringolaringite e rinofaringolaringite (MARCUCCI, 1995). Segundo Grange e Davey (1990), uma solução alcoólica de própolis a 10% foi utilizada na desinfecção de mãos em cirurgias dentárias. Além disso, a própolis também é usada no tratamento de infecções herpéticas cutâneo-mucosas (AMOROS et al., 1994).

2.4 Caracterização bacteriana por Microscopia de força atômica

A Microscopia de força atômica é uma técnica de microscopia extremamente versátil. Devido à sua capacidade de realizar imagens de superfície de materiais em variadas condições (ar, vácuo e em meio líquido), é considerado uma das técnicas mais adequadas para o estudo de materiais em micro e nano-escala (BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2004). Devido à sua capacidade de alta resolução e não necessitar da utilização de um revestimento condutor na superfície da amostra, o microscópio de força atômica (AFM – Atomic Force Microscope) é ideal para

análises em amostras de origem biológica. Dessa forma, o AFM tem sido amplamente utilizado em estudos da caracterização superficial e morfológica de bactérias (HODGES, 2002; OSIRO et al., 2012).

A diferença entre o AFM e os outros microscópios é a forma de construção da imagem. Nos microscópios mais comuns, a imagem é gerada através da focagem de luz, obtendo uma imagem bidimensional da superfície, não sendo possível obter informações da altura da superfície da amostra. Entretanto, as imagens utilizando o AFM são construídas através de um processo físico, no qual uma sonda toca a superfície da amostra, gerando um perfil topográfico possibilitando a medição da altura, comprimento, largura, rugosidade e volume de qualquer elemento da imagem (EATON; WEST, 2010).

2.4.1 Princípio de funcionamento

O modo de operação do AFM é semelhante às agulhas dos antigos toca-discos. No microscópio, a agulha é substituída pelo cantilever, que consiste em uma haste flexível, a qual possui em sua parte inferior, uma ponteira com dimensão de poucas micras, e é responsável por percorrer a superfície da amostra. Um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas ou sistema eletromecânico permite a movimentação do cantilever nas três direções (xyz) pela amostra. Além desse sistema, existe o sistema de alinhamento com feixe de laser, que é posicionado sobre o cantilever e reflete em um detector. O detector fornece informações ao sistema de controle, que registra as diferenças de altura obtidas pelo cantilever gerando assim a imagem da topografia da amostra (BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2004).

O AFM possui três modos de operação: o modo contato, não-contato e contato intermitente. A escolha do modo a ser utilizado depende, primeiramente, do tipo de amostra, levando em consideração se ela é rígida ou não.

No modo contato, as imagens são obtidas através do contato entre a agulha do cantilever e a superfície da amostra, onde a agulha toca suavemente a superfície. Para este modo, amostras rígidas são as mais indicadas.

No modo não-contato o cantilever oscila sobre a superfície da amostra sem tocá-la. Uma das vantagens deste modo de operação é a não contaminação da agulha com o material da amostra. Entretanto, devido à varredura ocorrer afastada

da superfície, as imagens geradas apresentam menos detalhes do que aquelas obtidas utilizando os modos contato e contato intermitente.

O modo contato intermitente é comumente chamado “TappingMode™”. Neste a agulha do cantilever vibra em alta frequência sobre a amostra, tocando-a suavemente mas não continuamente. Em análises de estruturas microbianas, o modo *tapping* é comumente utilizado devido à baixa possibilidade de danos tanto na amostra quanto na agulha, uma vez que, as interações entre o cantilever e a amostra são menos severas do que os outros modos de operação (BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2004).

2.4.2 Aplicações em estruturas microbianas

O AFM é uma ferramenta que tem sido amplamente aplicada para análise de bactérias. Comumente, as bactérias são estudadas por microscopia óptica permitindo obter informações gerais sobre a morfologia bacteriana e no processo de contagem de células. No AFM contudo, é possível permite obter informações de outras propriedades através da obtenção de imagens tridimensionais de alta resolução, permitindo obter detalhes da morfologia celular e características sub-celulares, como frimbrias e pili (CAMPOS et al., 2012; DUFRÊNE, 2014). Além das bactérias, vários outros micro-organismos são focos de estudos utilizando o AFM, tais como fungos (DUFRÊNE, 2010; PILLET et al., 2014), esporos (PAUL et al., 2013; RAMOS et al., 2015), vírus (ALSTEENS et al., 2013; MARTINEZ-MARTIN et al., 2012) e outros.

Vejamos exemplos de alguns estudos que fizeram uso do AFM na caracterização bacteriana: Gammoudi e colaboradores (2016), observaram por AFM alterações morfológicas na superfície de *Escherichia coli* em função do tempo. As lâminas empregadas nestas análises foram produzidas através do gotejamento de suspensão bacteriana sob a superfície de mica recém-clivada e imagens geradas em modo *tapping*. Foram observadas células bacterianas na forma de bastonete, com a presença de membrana irregular “texturizada”, além de flagelos e pili com alterações estruturais após sete dias. Segundo os pesquisadores, acredita-se que essas mudanças sejam devido à reorganização ocorridas nas moléculas de lipopolissacarídeos na ausência de meio de cultura e água.

No estudo apresentado por Tollersrud et al. (2001), as superfícies de quatro cepas de *S. aureus*, que diferem na expressão de polissacarídeos capsulares, foram investigadas em AFM sendo possível observar diferenças das superfícies entre as cepas. As duas cepas ausentes de polissacarídeos capsulares exibiram superfícies com características lisas e regulares, enquanto as outras duas, com presença dos polissacarídeos capsulares, apresentaram uma superfície rugosa. Osiro et al. (2012) também utilizaram o AFM para medir as variações de dimensões das células bacterianas em uma colônia. As análises revelaram células dispersas, com valores similares de tamanho e com consistência lisa da membrana.

No estudo de Eaton et al. (2008), o AFM foi utilizado como uma ferramenta para avaliar os efeitos do contato com o polissacarídeo quitosana com a integridade das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. As análises de alta resolução foram geradas possibilitando a determinação da altura e comprimento das células. Variações na rugosidade e o aumento da degradação celular ao longo do tempo que as células foram evidenciadas no contato com a quitosana. Campos et al. (2012), em procedimento similar analisou empregou o AFM para estimar a capacidade antibacteriana da goma do cajueiro frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. As imagens obtidas permitiram observar estruturas características da morfologia de cada bactéria, além da mensuração da altura e rugosidade das células. As imagens indicaram que o tratamento com a goma do cajueiro geram uma diminuição da altura e o surgimento de superfícies mais irregulares, além da presença de células colapsadas, e a ausência da pili e fimbrias na *E. coli*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a ação da atividade antimicrobiana do extrato de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos aquosos e etanólicos da própolis verde e avaliar qualitativamente e quantitativamente a presença dos compostos em diferentes concentrações de solventes
- Avaliar atividade antimicrobiana dos extratos contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*
- Caracterizar possíveis danos morfológicos na celular bacterina decorrentes da interação entre o extrato etanólico de própolis (EEP) e as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, fazendo uso do Microscópio de força atômica (AFM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção dos extratos de própolis

A própolis verde de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), produzida por abelhas *Apis mellifera* e colhida na região de Barbacena no estado de Minas Gerais, foi gentilmente fornecida pela empresa Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas LTDA.

Cinco diferentes tipos de extratos foram produzidos a partir da amostra recebida, os quais diferem nas concentrações dos solventes álcool etílico absoluto (99,3%) e água destilada. Na elaboração dos extratos empregou-se as seguintes proporções em volume de água e álcool de 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100, sendo identificados segundo a nomenclatura: EAP (extrato aquoso de própolis), EHP30 (extrato hidroetanólico de própolis 30% etanol), EHP50 (extrato hidroetanólico de própolis 50% etanol), EHP70 (extrato hidroetanólico de própolis 70% etanol) e EEP (extrato etanólico absoluto de própolis).

Todos os extratos foram obtidos seguindo o mesmo procedimento, e de acordo com o processo apresentado por Brandão (EMBRAPA, 2013). Este processo tem por princípio a trituração inicial da amostra de própolis em almofariz (Figura 7), seguido pela maceração de 13,75 g da própolis bruta em um erlenmeyer de 250 mL, adicionando 100 mL da solução solvente. O erlenmeyer foi protegido com papel alumínio e Parafilm®, e a solução homogeneizada sob agitação magnética em rotação de 180 rpm, durante 15 dias em temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2,0$.



Figura 7 – Amostra de própolis utilizada no estudo. a) Própolis in natura, b) própolis triturada.

Posteriormente as soluções dos extratos permaneceram em repouso por 24 horas na temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$, permitindo a decantação espontânea e retirada

dos sobrenadantes de cada recipiente (Figura 8). Finalmente, as misturas foram filtradas em filtros com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de poros de 0,2 μm , originando-se assim os extratos.

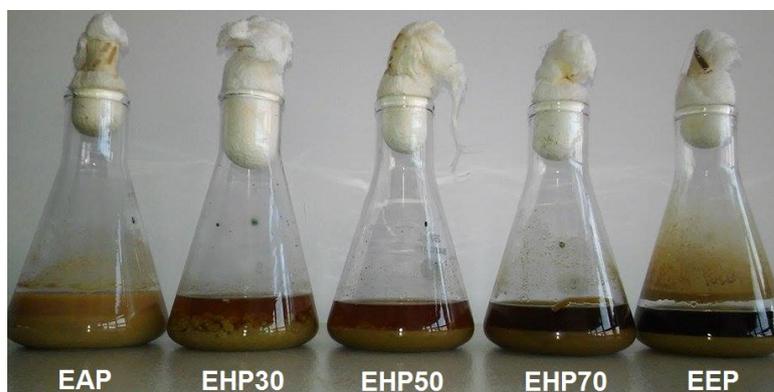


Figura 8 – Aparência de cada extrato de própolis obtido, identificados segundo nomenclatura adotada.

4.2 Análise do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Swain e Hillis (1959). Este método baseia-se no princípio de óxido-redução do complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico em meio alcalino, resultando em óxidos de tungstênio e molibdênio. Esta reação é causada pela presença dos compostos fenólicos, gerando um complexo de coloração azulada.

Três repetições foram realizadas para cada análise. A base das análises consiste na separação de uma alíquota de cada extrato (150 μL), seguido de diluição em 2,4 mL de água nanopura (padrão mili-Q – resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{cm}^{-1}$), e adição de 150 μL da solução de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Esta solução foi incubada ao abrigo da luz durante 3 minutos na temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$. Posteriormente, a reação foi interrompida através da adição de 300 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3), e novamente foi incubada sem exposição à luz, durante 25 minutos. As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro da marca SHIMADZU (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, EUA), modelo UV-1600, no comprimento de onda de 725 nm. Um branco foi preparado utilizando 150 μL de metanol diluído em 2,4 mL de água nanopura, assim como nos extratos, e

usado como controle. O teor de compostos fenólicos totais de cada amostra foi determinado após o levantamento de curva analítica padrão (25 - 200 mg/L) construída a partir de diferentes concentrações de ácido gálico. Para as medidas, os extratos foram diluídos conforme a necessidade para ajuste dos valores da absorbância dentro dos valores traçados para a curva analítica padrão.

4.3 Análise do teor de flavonoides

A concentração de flavonoides totais foi determinada através do método descrito por Funari & Ferro (2006). Este método consiste na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides em meio metanólico (Figura 9). A formação do complexo possibilita o deslocamento das bandas de absorbância para maiores comprimentos de onda, possibilitando a quantificação relativa dos flavonoides presentes em cada amostra, sem a interferência de outras substâncias fenólicas.

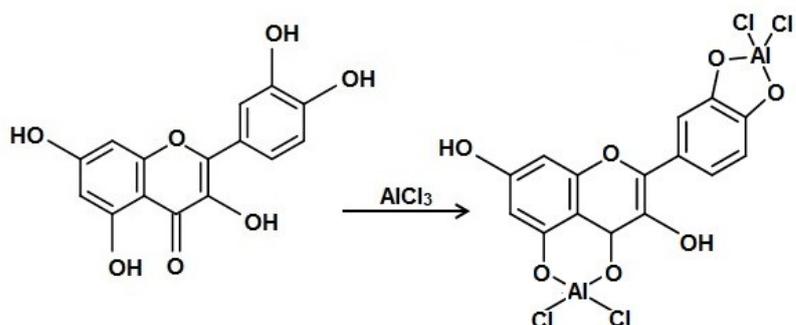


Figura 9 - Formação do complexo do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl₃), formando o complexo estável flavonoide-Al₃⁺.

As análises foram realizadas em triplicata para cada extrato. O procedimento consistiu em transferir 1 mL de cada extrato para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% (m/v). Posteriormente o volume final de cada balão foi ajustado com álcool etílico. A solução foi então incubada durante 30 minutos ao abrigo da luz na temperatura de 28°C±2. As análises das absorbâncias foram realizadas em comprimento de onda de 425 nm, utilizando um espectrofotômetro (SHIMADZU -1600). O branco foi obtido através da solução de 1 mL de solução etanólica de AlCl₃ a 2% (m/v) e 24 mL de etanol absoluto. O teor de flavonoides foi definido a partir da curva analítica padrão

tendo como flavonoide referência a quercetina (2 – 12 mg/L). Os extratos foram diluídos conforme a necessidade para que os valores das absorvâncias se ajustassem dentro dos valores de absorvância da curva de referência.

4.4 Análise estatística

Os valores referentes à estimativa de concentração dos compostos fenólicos e flavonoides nos diversos extratos foram comparados por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$ utilizando o programa Microcal OriginLab v.9.0.

4.5 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente foram obtidos os perfis de seis diferentes padrões de referência: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, crisina, kaempferol, quercetina e sakuranetina. Cada solução padrão foi produzida na concentração de 100ppm em metanol. Para a análise dos extratos, eles foram diluídos na relação de cinco por um em metanol.

Para identificar o comprimento de onda ideal para detectar cada padrão, estas foram primeiramente analisadas em espectrofotômetro UV, obtendo o comprimento de onda 290nm para os padrões ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, crisina e sakuranitina, e o de 380nm para os padrões kampfferol e quercetina.

As análises no CLAE foram realizadas de acordo com o método descrito por Sousa et al. (2007), em equipamento VARIAN composto por duas bombas Pro-Star 210 pumps e detector ultravioleta-visível Pro-Star 325 a 290 e 380 nm. As soluções dos extratos e dos padrões foram injetadas no cromatógrafo, utilizando a coluna C18 RP Agilent (2,5 x 25 mm x 5 μ m). A fase móvel utilizada foi constituída pelos solventes A e B. O solvente A foi composto por ácido acético/acetato de amônia/metanol/água deionizada, nas proporções de 0,8: 0,3: 5,0: 93,9% (V/m/V/V), respectivamente, e o solvente B por acetonitrila. Inicialmente os solventes foram definidos na proporção de 75: 25% (V/V), que foi linearmente mudada para 0: 100% (V/V) durante a corrida de 60 minutos. O fluxo de bombeamento do eluente foi de 1 mL/min.

Para cada extrato foram realizadas duas análises utilizando os comprimentos de onda de 310 e 290nm, permitindo assim a obtenção dos dados espectrais pelo

detector de UV. Os picos foram atribuídos de acordo com seus tempos de retenção e por co-eluição com os padrões analíticos, através da comparação dos espectros de UV dos padrões e das amostras, realizados sob as mesmas condições cromatográficas.

4.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Inicialmente uma alíquota (10 mL) de cada extrato de própolis foi colocada em uma capela permitindo a evaporação da parte solvente de cada extrato, obtendo resíduos em pó. A própolis bruta foi triturada e todas as amostras, na forma de pó, caracterizadas pela medida das absorvâncias na região do infravermelho por espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR). As análises foram conduzidas em espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70. As leituras foram realizadas na faixa espectral de $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, em modo ATR (reflectância total atenuada). As análises foram realizadas na temperatura de $28 \text{ °C} \pm 2$, tomando a média de 32 varreduras para cada amostra. As análises foram realizadas com o intuito de identificar os grupos funcionais dos principais compostos presentes na própolis e comparar a eficiência dos meios (aquoso e alcoólico) na remoção desses compostos para os extratos.

4.7 Atividade antibacteriana

4.7.1 Concentração inibitória mínima (MIC)

A determinação da capacidade de inibição bacteriana dos extratos de própolis foi realizada pela determinação da MIC (concentração inibitória mínima). A MIC foi determinada para duas linhagens de bactérias, a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC2 5922. Cepas padrões do banco disponível na Embrapa Instrumentação.

Para garantir a esterilidade do material utilizado (meio de cultura, vidraria, ponteiras), os procedimentos padrões prévios de esterilização em autoclave foram realizados. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em tubos falcon contendo caldo Müller-Hinton. Os tubos foram incubados “overnight”, em temperatura de $35 \pm 0,5\text{°C}$, em estufa com circulação apropriada para o crescimento dos micro-

organismos. Posteriormente, com base na escala McFarland 0,5 a concentração de células bacterianas de cada tubo foi ajustada por diluições sequenciais até uma concentração final de 10^6 UFC/mL.

O método escolhido para a determinação da MIC foi o de diluição seriada em microplaca, no qual ocorre a diluição de alíquota inicial de 100 μ L do extrato de própolis em 100 μ L de caldo Müller-Hinton, seguido da adição de 10 μ L do inóculo em cada poço da microplaca.

As microplacas foram incubadas em estufa a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante um período de 24 horas. A análise do teste foi feita após 2 horas da adição de 50 μ L de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,1%, no qual a coloração avermelhada está presente nos poços em que houve o crescimento bacteriano. A mínima concentração inibitória foi considerada como a primeira diluição da amostra que não demonstrou coloração.

Para garantir a confiabilidade dos resultados das atividades antibacterianas dos extratos de própolis, foram realizadas análises da MIC somente do álcool contra as *S. aureus* e *E. coli*.

4.8 Microscópio de Força Atômica (AFM)

4.8.1 Preparação das amostras bacterianas

Com o objetivo de inferir a interação entre os extratos e alterações nas superfícies das bactérias, foram conduzidas análises comparativas por AFM sobre micro-organismos com e sem tratamento. Considerando os resultados obtidos pelas medidas de atividade antibacteriana (MIC) frente à *S. aureus* e *E. coli*, elegeu-se o EEP como o extrato de interação para posterior geração de imagens.

Todo o material utilizado (solução salina, água deionizada, meio de cultura, ponteiros, lâminas e vidrarias) foi submetido a processo prévio de esterilização em autoclave atestando sua inocuidade.

As bactérias foram imobilizadas separadamente sob lâminas vítreas segundo adaptação do método aplicado por Santana et al. (2012). O preparo inicial dos micro-organismos consistiu na inoculação em tubo falcon contendo caldo Müller-Hinton, e incubação por 24 horas em temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O tubo foi centrifugado em 2090 xg durante 15 minutos na temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2,0$. O

precipitado bacteriano foi então lavado por três vezes com solução salina 0,9% e ressuspensão em 5 mL da mesma solução, seguido de nova centrifugação e lavagem em solução salina. Posteriormente, as bactérias foram ressuspensas à concentração de 10^7 UFC/mL (com base na escala McFarland 0,5 – concentração de 10^8 UFC/mL) em dois tubos contendo 5 mL de solução salina. Um dos tubos foi designado como grupo controle, e o outro nomeado como tratamento (Figura 10). Neste último foram adicionados separadamente o volume de 5 μ L de EEP para a bactéria *S. aureus* e 156 μ L para a *E. coli*, conforme valores definidos pelo teste da MIC. Os tubos foram incubados durante 4 horas em $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sob agitação (180 rpm). O mesmo procedimento foi realizado para o período de 12 horas.

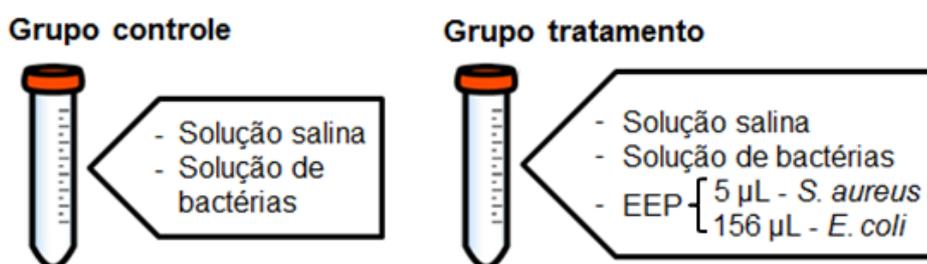


Figura 10 – Conteúdo adicionado no tubo de cada grupo.

Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados em 6150 g , durante 15 minutos na temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2,0$. Em seguida, a suspensão bacteriana foi lavada três vezes com água deionizada e ressuspensa em 5 mL de água deionizada. Finalmente, a alíquota de 20 μ L da suspensão aquosa bacteriana foi vertida sobre a superfície de uma lâmina de vidro com secagem espontânea ao ar. Anterior à imobilização, as lâminas foram tratadas durante 10 minutos em ultrassom com isopropanol, e, posteriormente, lavadas com água deionizada para a eliminação de possíveis materiais aderidos que pudessem interferir nas imagens.

4.8.2 Análise das amostras no AFM

As imagens foram realizadas sobre as bactérias imobilizadas e tratadas com o extrato EEP. Imagens dos micro-organismos expostos somente à solução salina também foram geradas a título de comparação. Utilizou-se o microscópio de força atômica da VEECO, modelo Flex, marca Nanosurf. As análises foram realizadas em

modo intermitente (tapping) no ar e na temperatura ambiente. A área varrida foi de 5 x 5 μm , com frequência de operação de 150 kHz.

O processamento, valores da entropia e determinação dos parâmetros das imagens foram realizadas através do uso do Software Gwyddion versão 2.47. E os dados comparados por análise de variância (ANOVA) pelo teste Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa Microcal OriginLab 9.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da proporção água/etanol como solvente extrator

Segundo Konishi et al. (2004), a própolis bruta contém substâncias solúveis em água e em compostos apolares como óleos e álcoois. Em função da maior presença de compostos apolares, o álcool etílico hidratado é o solvente mais comumente empregado nos métodos de extração da própolis, devido à baixa solubilidade em água.

Fontana et al. (2004), atesta que o etanol 70 – 80% é o solvente adequado para o preparo de soluções densas e límpidas. Por sua vez, a extração de própolis em meio com maiores concentrações de água resulta em extratos com turbidez opaca e leitosa em decorrência da insolubilidade de ceras e outros componentes menos hidrofílicos.

Desta forma, a utilização de diferentes proporções água/etanol na produção dos extratos de própolis resulta em soluções com diferentes colorações e composições, como observado na Figura 11. Visualmente os extratos etanólicos resultam em uma coloração mais intensa quando comparados aos extratos aquosos.



Figura 11 – Diferenciação visual entre os diferentes extratos de própolis. EAP (Extrato Aquoso de Própolis), EHP30 (Extrato Hidroetanólico de Própolis 30% etanol), EHP50 (Extrato Hidroetanólico de Própolis 50% etanol), EHP70 (Extrato Hidroetanólico de Própolis 70% etanol), EEP (Extrato Etanólico absoluto de Própolis).

5.2 Teor de compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos nos diversos extratos teve por base a construção, em triplicata, de curvas analíticas usando como padrão fenólico o ácido gálico. Como é possível observar na Figura 12, o ajuste apresenta um valor de coeficiente de regressão (R^2) superior a 99%, refletindo em um alto grau de confiabilidade da curva padrão.

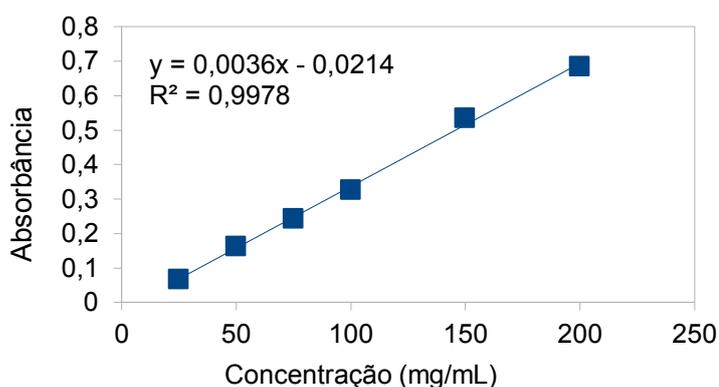


Figura 12 – Curva padrão do ácido gálico.

Através dos valores obtidos nas análises espectrofotométricas determinou-se os teores de compostos fenólicos totais de cada extrato, segundo valores dispostos na Figura 13, com base na reta $y = 0,0036x - 0,0214$, conforme obtido para o ácido gálico. Esses valores foram obtidos em mg de compostos fenólicos/mL de extrato, sendo então convertidos em mg de compostos fenólicos/g de extrato, através da pesagem de 1,0 mL de cada extrato seco (os extratos foram secos à $28^{\circ}\text{C} \pm 2,0$ por aproximadamente 15 dias), posteriormente os valores foram convertidos em porcentagem, o que permite a comparação entre as concentrações de fenólicos obtidas neste estudo com as preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A conversão consistiu na pesagem de 1,0 mL dos extratos secos, através da evaporação do solvente de cada extrato, possibilitando obter a massa de 1,0 mL de cada extrato. Calculou-se assim, a concentração (em porcentagem) de compostos fenólicos em cada extrato.

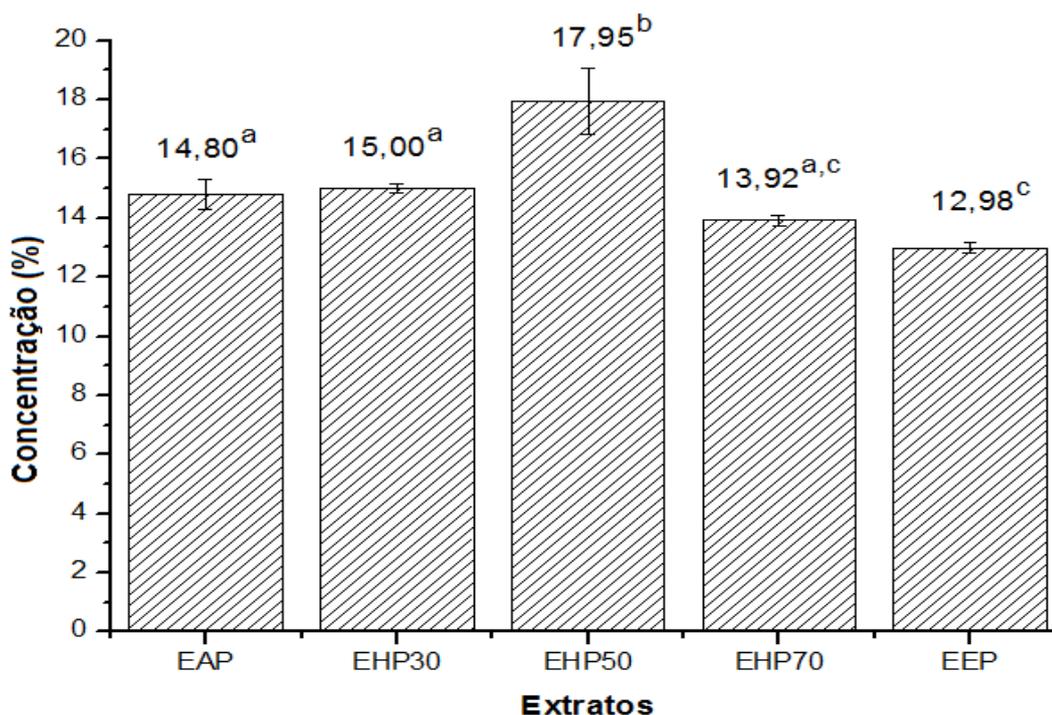


Figura 13 - Valores do teor de compostos fenólicos totais em cada extrato com base no ajuste obtido para o ácido gálico. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os extratos (Tukey, $p < 0,05$).

É possível afirmar, através dos valores apresentados na Figura 13, que todos os extratos obtidos neste estudo atendem ao requisito mínimo de compostos fenólicos totais na própolis, segundo a exigência do Ministério da Agricultura, que definiu o mínimo como 5% (BRASIL, 2001).

Nota-se que a maior presença de compostos fenólicos foi registrada para o extrato EHP50, composto pela mesma proporção de água e etanol (50:50). Tal resultado sugere um possível equilíbrio de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos na amostra de própolis utilizada. Ficou evidenciado pelas concentrações inferiores de fenólicos medidos para o extrato com maior porção etanólica (EEP), que a própolis empregada contém uma menor concentração de compostos fenólicos apolares. Os extratos EAP, EHP30 e EHP70, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre seus valores de concentração de compostos fenólicos, indicando que a variedade das concentrações de água/etanol nestas proporções não interfere no volume de compostos eluídos.

É de certa forma difícil comparar as concentrações obtidas com os dados encontrados na literatura, considerando que amostras de origem diversas apresentam concentrações diversas. De um modo geral, contudo, os valores obtidos neste estudo indicam que os extratos produzidos são ricos em fenólicos em função

das concentrações presentes na amostra de própolis empregada. Podemos citar o estudo de Funari e Ferro (2006), que analisaram o extrato metanólico de própolis, obtendo o valor de 7,39% para o teor de fenólicos. De forma similar, nas análises realizadas por Mello; Petrus; Hubinger (2010), em extrato alcoólico a etanol 80%, foi registrado 9,87% de compostos fenólicos, e de 3,66% quando medido em extrato aquoso.

Sun e colaboradores (2015), analisaram seis extratos de própolis, os quais eram diferenciados pela proporção água/etanol como solvente extrator: 25, 50, 75, 95 e 100% EEP, e o extrato aquoso. Segundo os pesquisadores o extrato 75% EEP apresentou maior concentração de compostos fenólicos, com 16,4%, similares aos obtidos neste trabalho, enquanto que o extrato aquoso foi o que extraiu menores concentrações (0,67%), o que indica que a própolis utilizada possuía maiores concentrações de compostos fenólicos com características apolares, o que aparentemente diferencia de nossa amostra. No estudo de Buriol et al. (2009), foi analisada a concentração de compostos fenólicos presente em seis extratos etanólicos de própolis, nas concentrações de 30, 50, 70, 80, 95 e 100% etanol, obtendo valores entre 15,95% e 8,55%. Neste caso, os resultados demonstraram que os compostos fenólicos presentes na própolis utilizada possuíam características polares, já que a maior proporção de água utilizada na extração da própolis resultou em maiores concentrações de fenólicos.

5.3 Teor de flavonoides

Para a determinação do teor de flavonoides presentes nos extratos de própolis foi igualmente obtida a curva analítica, utilizando o flavonoide quercetina como padrão (Figura 14). O valor do R^2 superior a 99% da curva de ajuste reflete um alto grau de confiabilidade.

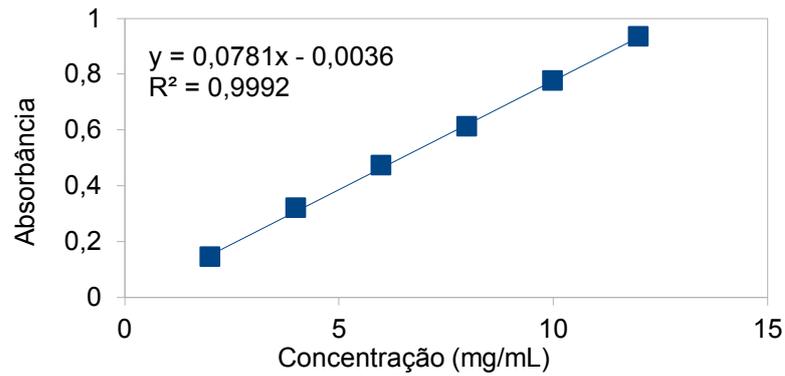


Figura 14 – Curva padrão da quercetina.

Utilizando os valores obtidos nas análises espectrofotométricas com relação a reta analítica $y = 0,0781x - 0,0036$, os teores de flavonoides presentes em cada extrato de própolis foram estimados em mg de flavonoides/mL de extrato, e convertidos em mg de flavonoides/g de extrato (através da pesagem de 1 mL de cada extrato seco), permitindo obter os valores em porcentagem, como detalhado na Figura 15.

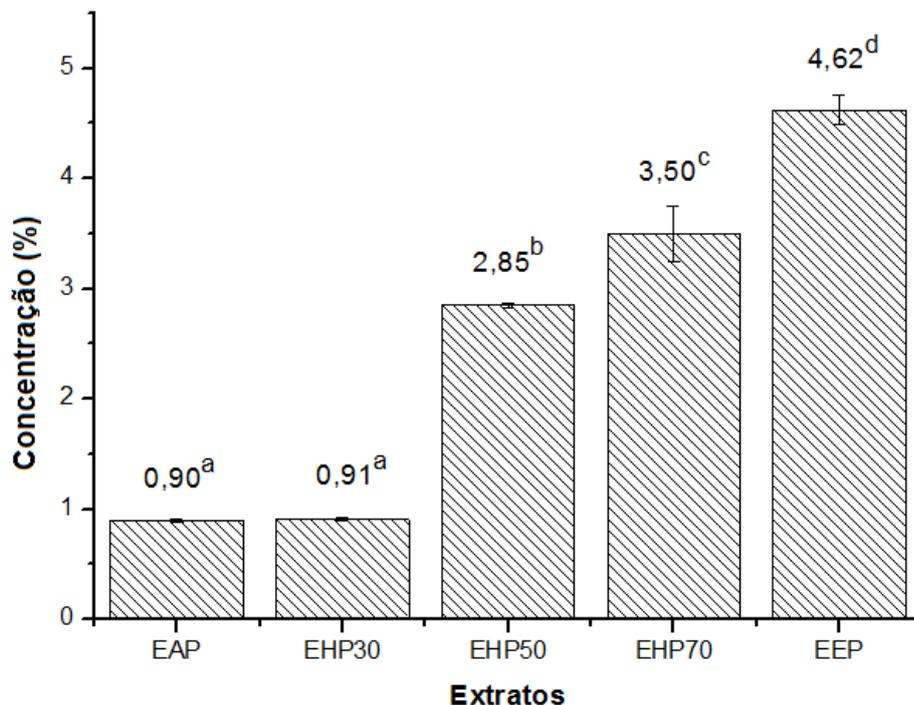


Figura 15 – Valores do teor de flavonoides presentes em cada extrato de própolis, com base no ajuste obtido para a quercetina. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os extratos (Tukey, $p < 0,05$).

Inicialmente pode-se afirmar que todos os extratos analisados possuem teor de flavonoides acima do requisito mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura, sendo esse de 0,25% (BRASIL, 2001).

Nota-se pelos dados da Figura 15, que o teor de flavonoides presente em cada extrato é maior à medida que a concentração de etanol utilizada como solvente extrator aumenta. Pode-se assim, afirmar que a extração dos flavonoides é fortemente dependente da concentração alcoólica utilizada no solvente de extração. Os extratos com maior porção aquosa (EAP e EHP30), que não apresentam uma diferença significativa, possuem menores concentrações de flavonoides, o que já era esperado devido à, já conhecida, baixa solubilidade destes compostos em água.

Em comparação a outros estudos envolvendo análises quantitativas de flavonoides em amostras de própolis, os extratos estudados neste trabalho apresentam valores de concentrações de flavonoides próximos aos encontrados na literatura. Podemos citar Bonvehí e Coll (1994), que registram valores próximos a 3% em extratos etanólicos a 50, 70 e 100%, em mesmo procedimento aqui realizado (ajuste de quercetina), e o estudo realizado por Funari e Ferro (2006), no qual foi encontrado o teor de 2,64% de flavonoides no extrato metanólico (100%). Batista e colaboradores (2012), por sua vez, quantificaram concentrações de 4,5% e 5,9% em extratos etanólicos obtidos de própolis verde e vermelha respectivamente.

Uma maior solubilidade de flavonoides em meio alcoólico também foi evidenciada em outros trabalhos, como exemplo no estudo realizado por Mello; Petrus; Hubinger (2010), que identificaram que o etanol foi capaz de extrair três vezes mais flavonoides do que a água, obtendo concentração de 6,94% em etanol contra 2,37% em meio aquoso. No trabalho realizado por Buriol e colaboradores (2009) também foi confirmada a solubilidade dos flavonoides em etanol, registrando concentrações de 5,1% em extrato com etanol a 70%.

5.4 Identificação dos constituintes dos extratos de própolis por CLAE

A análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possibilitou identificar a presença de alguns compostos presentes nos extratos de própolis. Para a detecção de todos os compostos, padrões foram utilizados e a análise realizada em dois comprimentos de onda 290 e 380nm. Através da

comparação dos tempos de retenção entre os cromatogramas dos padrões e dos extratos foi possível sugerir a presença ou ausência desses compostos nos extratos.

Os cromatogramas exibidos nas Figuras 16 e 17 apresentam os tempos de retenção dos diversos compostos presentes nos extratos. Inicialmente, temos confirmado a influência do solvente na extração dos compostos da própolis. Os extratos contendo maior proporção de água (EAP e EHP30) apresentaram cromatogramas com menor número de compostos retidos em comparação aos demais extratos. Com base nos padrões utilizados, seis compostos puderam ser identificados, o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, crisina, kaempferol, quercetina e sakuranetina. Os flavonoides sakuranetina (3) e crisina (4) estão praticamente ausentes no extrato aquoso (EAP) e no extrato com baixo teor de etanol (EHP30), indicando que esses não são solúveis em soluções polares. Com o aumento do teor de etanol, esses compostos são identificados no extrato, assim como, o aumento na concentração do ácido cafeico (1) e ácido *p*-cumárico (2).

No cromatograma correspondente ao extrato EHP30, nota-se que a intensidade correspondente à presença de ácido cafeico é mais intensa que as observadas para os demais extratos e que o teor de ácido *p*-cumárico aumenta com o teor de etanol no extrato.

Os resultados estão em concordância com as análises espectroscópicas, indicando composições similares para os extratos etanólicos (EHP50, EHP70 e EEP).

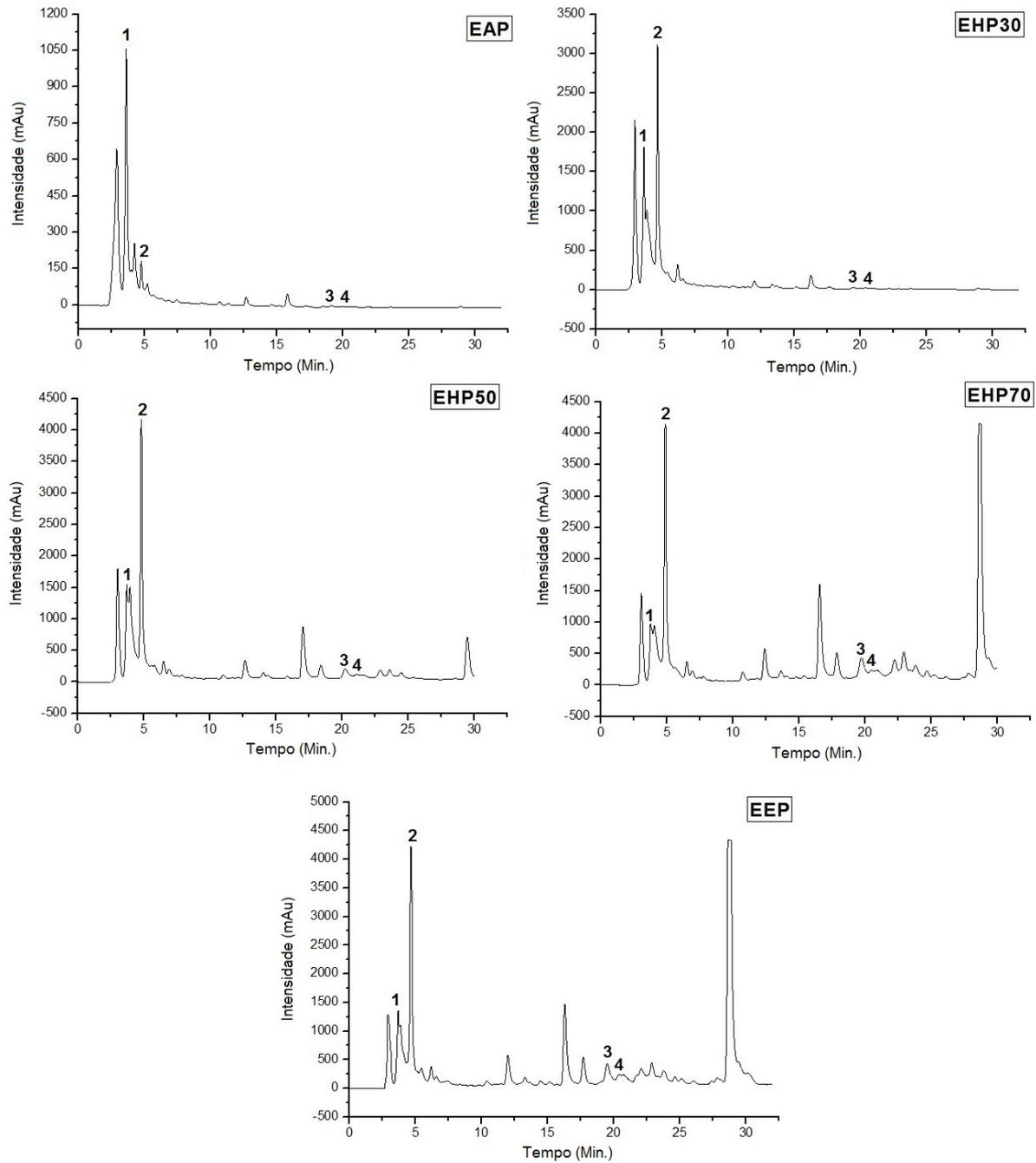


Figura 16 – Cromatogramas em CLAE dos extratos de própolis (realizados em 290nm). Os picos foram identificados como: (1) Ácido cafeico, (2) ácido *p*-cumárico, (3) sakuranetina, e (4) crisina.

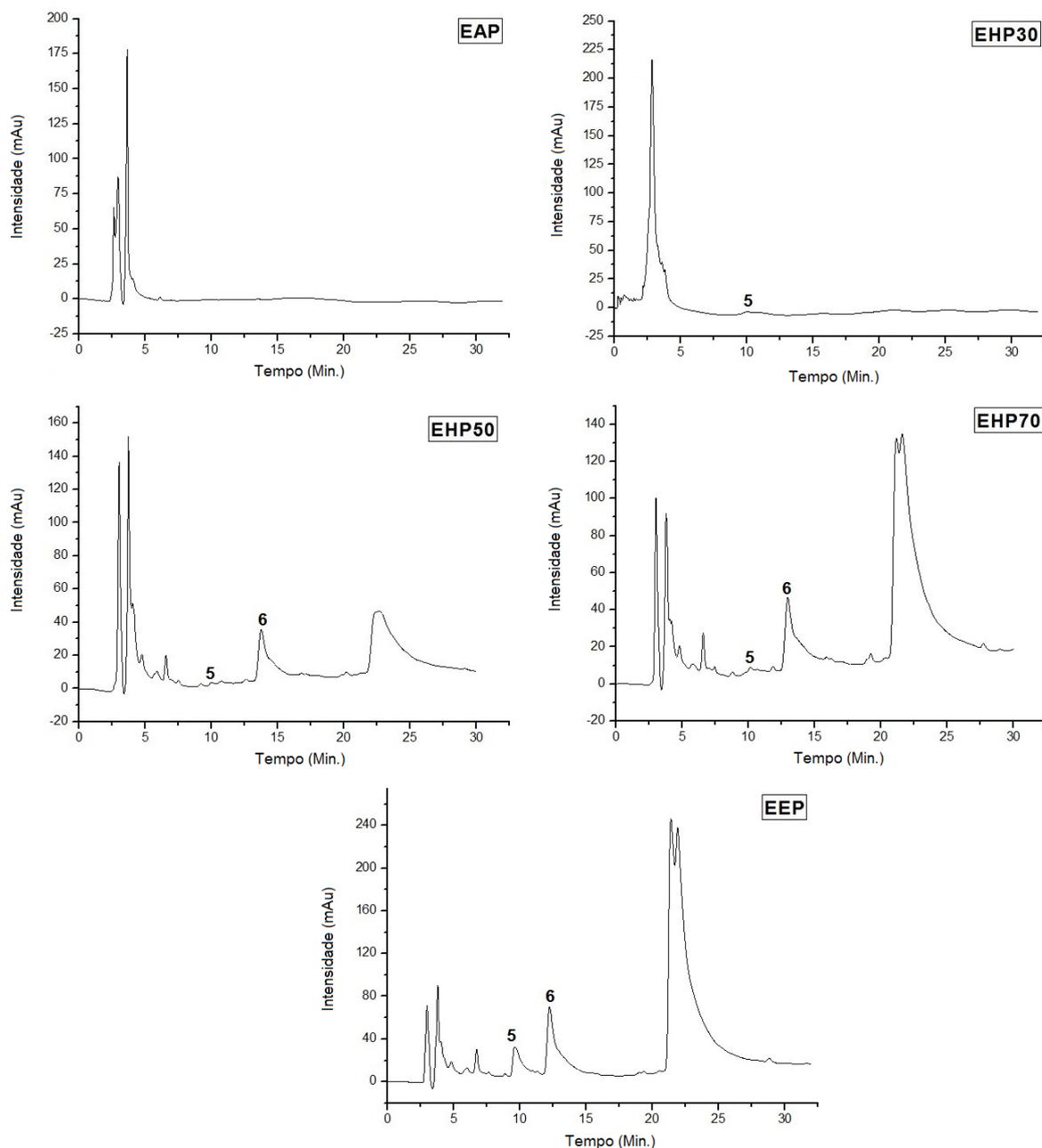


Figura 17 - Cromatogramas em CLAE dos extratos de própolis (realizados em 380nm). (5) Quercetina, e (6) kaempferol.

Com respeito aos dados disponíveis na literatura, Park e Ikegaki (1998), apresentam resultados similares a partir de análises de extratos com diferentes proporções água/etanol por CLAE, indicando que com o aumento da concentração de etanol a presença de picos referentes aos flavonoides também aumentava.

Rocha e colaboradores (2013), ao analisarem a composição química do extrato aquoso e do extrato etanólico de própolis, identificaram que ambos os extratos apresentaram todos os compostos padrão avaliados, entretanto, em concentrações diferentes.

Uma análise cromatográfica mais completa foi realizada por Sun e colaboradores (2015), que identificaram 29 compostos distintos em seis extratos com diferentes concentrações de etanol. Os autores evidenciaram a influência da polaridade dos solventes na extração dos compostos da própolis demonstrando que nos extratos contendo concentrações de etanol igual ou acima de 50%, além dos ácidos fenólicos apolares, há a presença de fenóis fracos-polares como os flavonoides.

5.5 Análise dos extratos por espectroscopia na região do infravermelho

As análises por espectrometria de infravermelho foram realizadas com o objetivo de investigar a presença das bandas características dos compostos presentes na composição da própolis e dos extratos, além de comparar o potencial de extração dos componentes da própolis em cada extrato.

Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda dos carboidratos (intensidade 10) em 1028 cm^{-1} , devido ao alto teor destes compostos na própolis (OSIRO et al., 2004). A normalização permitiu relacionar essa banda com bandas referentes a outros compostos, possibilitando realizar uma análise comparativa da capacidade de extração dos compostos presentes na própolis entre os extratos. Na Figura 18 está apresentado o espectro de FTIR para a própolis bruta sendo possível identificar as bandas características de absorbâncias. Pode-se observar uma banda larga em 3282 cm^{-1} corresponde aos grupos O-H de fenol de compostos fenólicos e/ou ao estiramento de N-H de amins e amida A. Na região 3028 cm^{-1} ocorre a presença de uma banda de baixa intensidade com relação ao seu vizinho, correspondente ao estiramento dos grupos C-H dos compostos aromáticos e de amida B. Os dois picos de maiores intensidades centralizados em 2918 e 2850 cm^{-1} e a presença de um “ombro” em 2955 cm^{-1} , correspondem aos grupos C-H dos compostos alifáticos (YULIANA; WIJAYA; NASRULLAH, 2013). A banda na região de 1682 cm^{-1} tem sido assinalada como corresponde a presença do grupo carbonila (C=O) característicos de flavonoides, ésteres e amida primária, indicando respectivamente, a presença de lipídeos e proteínas, identificadas como presentes em diversas composições de própolis (FRANCA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; YULIANA; WIJAYA; NASRULLAH, 2013). As bandas centradas em 1628 , 1599 , 1512 e 1495 cm^{-1} são relativas às vibrações dos grupos C=C dos compostos

aromáticos presentes na estrutura dos flavonoides, além disso, a banda em 1512 cm^{-1} também indica dobramento em N-H_2 , característico de aminas aromáticas (FRANCA et al, 2014; OLIVEIRA et al., 2015). A banda em 1628 cm^{-1} também pode estar relacionada ao dobramento N-H_2 de amida primária. Em 1471 , 1455 e 1435 cm^{-1} ocorre a presença de dobramento dos grupos C-H. A banda em 1375 cm^{-1} corresponde às vibrações angulares dos grupos CH_3 . Nota-se a presença de um “ombro” em 1304 cm^{-1} , pouco visível devido à sobreposição da banda 1260 cm^{-1} . Nestas regiões temos vibrações correspondentes à presença de C-O de ésteres presentes em lipídeos, e também são relativas a vibrações em C-N de aminas aromáticas. Sobreposições também podem ser observadas em 1221 cm^{-1} pela banda 1260 cm^{-1} , e em 1178 e 1088 cm^{-1} pela banda 1165 cm^{-1} . Picos centrados em 1221 , 1178 , 1165 , 1132 , 1088 , 1028 e 979 cm^{-1} ocorrem devido a vibração de ligações C-O-C e C-O, e são indicativos típicos da presença de açúcares.

Como a própolis bruta consiste em uma mistura orgânica de composição variada, cabe salientar que diversas dessas bandas aqui assinaladas podem corresponder a vibrações decorrentes de demais compostos não identificados presentes em sua composição.

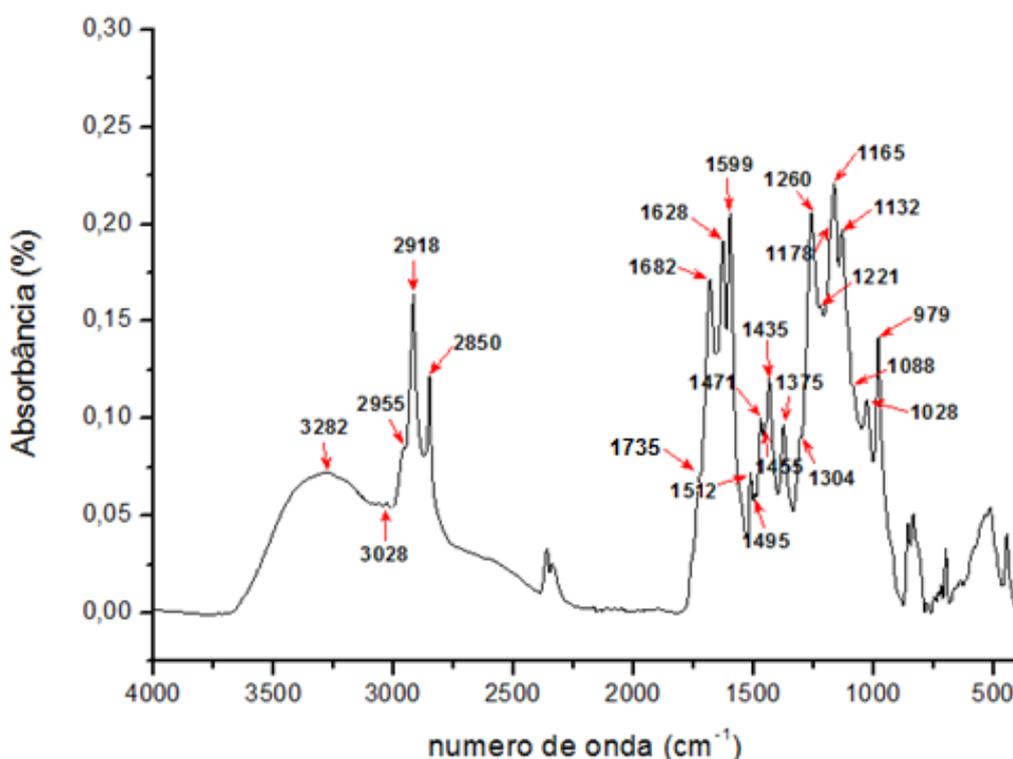


Figura 18 – Espectroscopia na região do infravermelho de própolis bruta, com principais bandas de absorbâncias identificadas.

Na figura 19 estão representados os espectros dos extratos de própolis. Embora, de uma forma geral todos apresentem vibrações similares, nota-se que com o aumento do teor de álcool nos extratos, tem-se o alongamento de algumas bandas, além do surgimento de vibrações não visíveis no extrato aquosos, indicando a presença de compostos insolúveis em meio aquoso, mas presentes no extrato etanólico. Nota-se que com o aumento da concentração de álcool, há uma redução na intensidade da banda centrada em 3244 cm^{-1} , correspondente aos grupos O-H e N-H, indicando, como esperado, uma redução de compostos polares. Há alterações também nas regiões entre 2956 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} com aumento das vibrações correspondentes aos estiramentos dos grupos C-H de grupos alifáticos, pouco definidos nos extratos obtidos com maior teor de água.

Nas regiões de vibrações de compostos fenólicos (entre 1682 a 979 cm^{-1}), temos o aparecimento de duas bandas como os picos centrados em 1682 e em 1628 cm^{-1} indicando a presença de compostos apolares (solúveis em etanol) principalmente flavonoides e amida. A diferença nas intensidades das bandas na região entre 1682 e 979 cm^{-1} está em concordância com as análises anteriores (tópicos 5.1, 5.2 e 5.3), demonstrando que a concentração do etanol influencia em uma maior extração de flavonoides, enquanto que nas soluções mais aquosas temos uma maior extração de compostos fenólicos como observado na região de 3282 cm^{-1} . Além dos flavonoides, o etanol também influenciou a maior extração de outros compostos, como ésteres, amidas, aminas e açúcares. As atribuições detalhadas das bandas de absorção no FTIR da própolis e dos extratos obtidos estão descritas na Tabela 4.

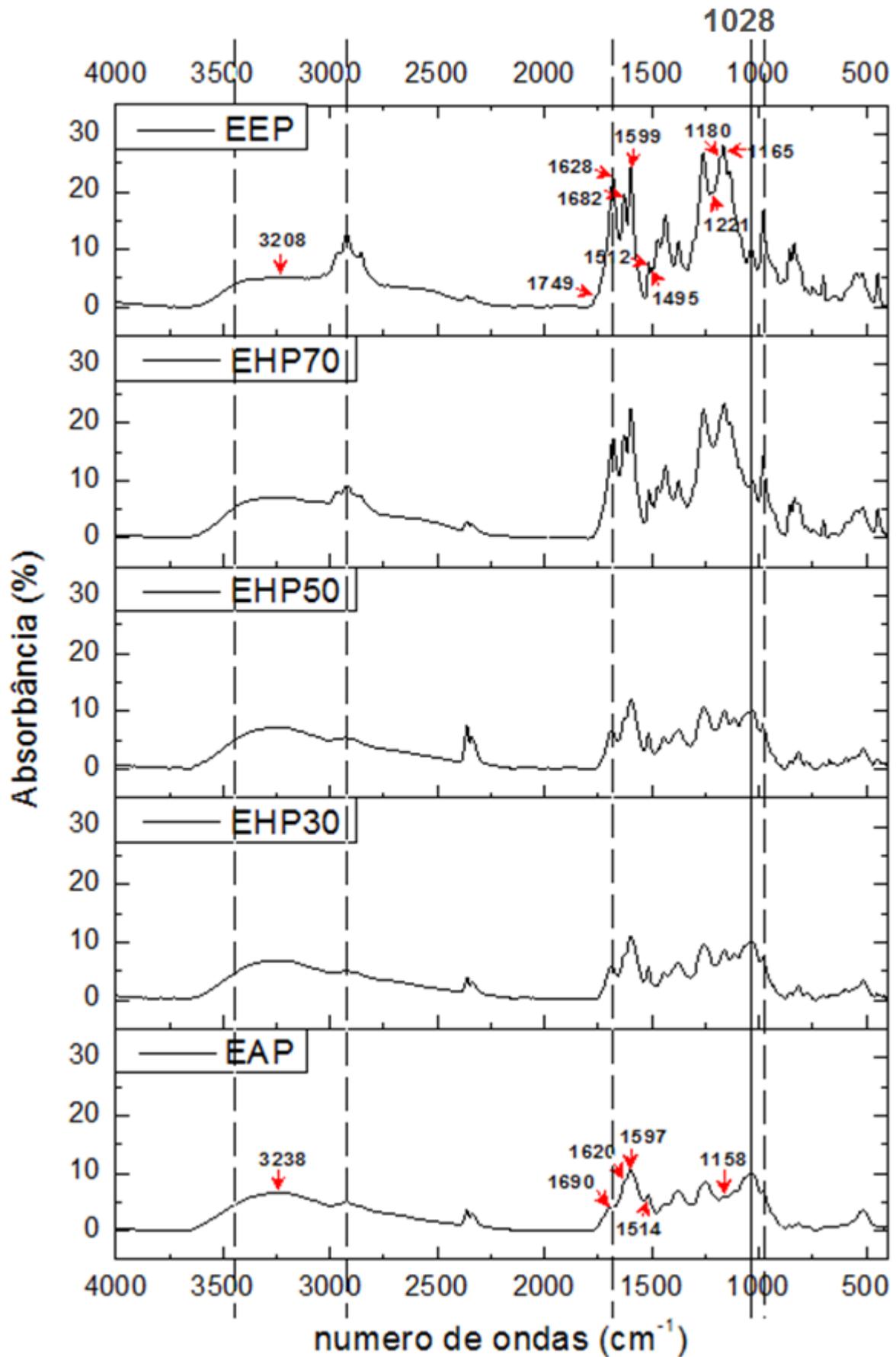


Figura 19 – Comparação dos espectros dos extratos de própolis na região do infravermelho.

Tabela 4 – Valores das principais bandas de absorção referentes à própolis bruta e à cada extrato de própolis.

Atribuição	Amostra					
	Bruto	Extratos (cm ⁻¹)				
		EEP	EHP70	EHP50	EHP30	EAP
Estiramento de –OH ou N-H	3282	3208	3201	3225	3234	3238
Estiramento de C-H dos grupos aromáticos	3028	3028	3028	-	-	-
	2955	2964	2967	2965	-	2965
Estiramento axial de C-H	2918	2922	2926	2928	2933	2922
	2850	2853	2855	-	-	2852
	1735	1753	1752	-	-	-
Estiramento de C=O	-	-	-	1688	1691	1690
	1682	1682	1679	1682	1682	1679
Deformação angular de C=C de anel aromático ou dobramento de N-H ₂	1628	1628	1628	1626	1622	1619
Deformação angular de C=C de grupos aromáticos	1599	1599	1596	1596	1599	1597
	1495	1494	1496	-	-	-
Deformação angular de C=C de anel aromático ou estiramento C-N	1512	1512	1512	1514	1514	1514
Dobramento de C-H	1471	1471	1471	1471	-	-
	1435	1435	1435	1443	1444	1444
Vibração angular de CH ₃	1375	1375	1375	1373	1371	1373
Estiramento de C-O de carbonila ou vibrações de C-N	1304	1302	1302	1303	1303	-
	1260	1260	1261	1256	1256	1251
Estiramento de C-O-C e C-O	1221	1220	-	-	-	-
	1178	1180	-	-	-	-
	1165	1165	1161	1158	1158	1158
	1132	1135	1134	1115	1114	1114
	1088	1087	1087	1043	1045	1066
	1028	1034	1028	1027	1028	1028
	979	979	979	978	979	979

5.6 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos de própolis verde foi testada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). Os valores obtidos no teste MIC estão apresentados abaixo na Tabela 5, na qual são colocados para comparação os valores medidos para as concentrações isoladas de etanol.

Tabela 5 – Números dos poços de inibição do teste em microplaca de cada extrato de própolis e do etanol e valores das concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos extratos para *S. aureus* e *E. coli*.

	EAP	EHP30 (mg/mL)	EHP50 (mg/mL)	EHP70 (mg/mL)	EEP (mg/mL)	Etanol 30%	Etanol 50%	Etanol 70%	Etanol 100%
<i>S. aureus</i>	I.N.O.*	2º poço (34,38)	6º poço (2,15)	8º poço (0,54)	10º poço (0,13)	1º poço	3º poço	4º poço	5º poço
<i>E. coli</i>	I.N.O.*	1º poço ^a (68,75)	2º poço ^b (34,38)	4º poço (8,59)	5º poço (4,30)	1º poço ^a	2º poço ^b	3º poço	4º poço

I.N.O.* : Inibição não observada.

Letras iguais indicam valores iguais para a MIC.

A atividade dos extratos de própolis sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* é evidenciada na Tabela 5, indicando que o valor da MIC (concentração inibitória mínima) é menor à medida com que o teor de etanol aumenta em cada extrato, isto é, a atividade inibitória é consideravelmente maior à medida que o teor de etanol aumenta em cada extrato. Na análise para o extrato aquoso (EAP) não foi possível observar inibição do crescimento desta bactéria, indicando que os componentes com atividades antibacterianas estão ausentes ou presentes em pequenas quantidades neste extrato. Com base nos dados de espectroscopia, temos que para o extrato aquoso, foi detectado baixo teor de flavonoides em comparação aos outros extratos, sugerindo que esses compostos possam ser responsáveis pela atividade antimicrobiana. Esse resultado é, de certa forma, confirmado com o aumento do teor de etanol para valores acima de 30%. Os extratos obtidos com essas concentrações de etanol mostram-se eficazes na inibição de *S. aureus*, permitindo afirmar que a inibição bacteriana ocorre devido à presença dos flavonoides extraídos da própolis, cuja concentração maior é encontrada nos extratos etanólicos.

A partir dos resultados obtidos no teste MIC para a bactéria *E. coli*, pode-se afirmar que os extratos apresentam atividades inferiores contra essa bactéria Gram-negativa quando comparados aos valores obtidos contra o *S. aureus* (Gram-positiva). De forma similar, o poder de inibição dos extratos é maior conforme a concentração de etanol aumenta nesses extratos. Entretanto, a inibição bacteriana, devido à presença dos componentes da própolis, ocorre somente nos extratos EHP70 e EEP. Nos extratos EHP30 e EHP50, a presença dos compostos da própolis não tem efeitos, sendo os resultados de inibição idênticos aos obtidos para o controle de etanol puro. Assim como na bactéria Gram-positiva, o EAP não foi observada atividade inibitória contra a *E. coli*.

As análises permitem alegar que a própolis verde possui maior atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* quando comparada à bactéria Gram-negativa *E. coli*, o que pode ser entendido com base na diferença da composição das paredes celular de cada bactéria. Esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual diversos autores afirmam que a própolis possui maior efeito de inibição contra espécies Gram-positivas e é pouco eficaz ou com atividade nula na inibição do crescimento de espécies Gram-negativas (DE CASTRO, 2001; GRANGE; DAVEY, 1990; SFORCIN et al., 2000).

Estudos com outras bactérias Gram-positivas como *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp. e *Bacillus cereus*, e Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foram realizados por Grange e Davey (1990), confirmando melhor capacidade antibacteriana do extrato etanólico de própolis na inibição das bactérias Gram-positivas. No trabalho de Uzel et al. (2005) foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente à diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, confirmando a maior eficiência do extrato na inibição de bactérias Gram-positivas.

Sawaya e colaboradores (2004), identificaram que extratos altamente polares apresentam fraca atividade antibacteriana em função de sua baixa capacidade em extrair compostos apolares, que em princípio, seriam os responsáveis pela atividade inibitória da própolis. Em contrapartida, extratos com altas concentrações de etanol foram capazes de extrair componentes com e sem atividade inibitória, entretanto, esses extratos não foram os que apresentaram melhor atividade antibacteriana. O extrato composto pela mesma proporção de água e etanol foi o antibacteriano mais eficiente, sugerindo que esta solução solvente permitiu a maior extração de compostos polares e apolares com capacidade inibitória, resultando em alta capacidade de inibição bacteriana. Nina et al. (2015) também analisaram a relação entre a composição de extratos de própolis com sua capacidade de inibição bacteriana, encontrando através de análises em CLAE, que extratos menos ativos demonstraram maior proporção de constituintes polares, enquanto que os extratos com maior atividade antibacteriana apresentaram maior concentração de componentes apolares, determinando que a atividade dos extratos está ligada à proporção de compostos apolares presentes no mesmo. Assim, com base nas informações fornecidas por esses estudos e nos resultados obtidos neste trabalho, vemos que os resultados são distintos e qualquer comparação de dados podem incorrer em erros de interpretação. Contudo, pode-se afirmar que o teor de compostos apolares e polares com características antimicrobianas no extrato é fortemente dependente tanto do solvente extrator utilizado, quanto da origem e composição da amostra de própolis empregada. Ou seja, a amostra de própolis utilizada neste estudo, possui maiores concentrações de compostos apolares antimicrobianos, o que pode ser confirmado com base nas análises de eficiência da atividade inibitória.

5.7 Análises das estruturas bacterianas através do AFM

As análises realizadas por Microscopia de Força Atômica tiveram como base o estudo de Eaton e colaboradores (2008), que avaliaram a integridade das bactérias *S. aureus* e *E. coli* quando expostas à quitosana durante diversos períodos de interação. Nas análises, o *S. aureus* revelou a presença de células agrupadas com forma quase esférica nas imagens do grupo controle. Após 4 horas de exposição ao extrato, foram observados danos celulares com aumento na rugosidade superficial. Quando expostas por um longo período (24 horas) as bactérias apresentaram características semelhantes às células expostas ao tempo de 4 horas, mas com tendência a um aumento da rugosidade superficial. As imagens de *E. coli* pertencentes ao grupo controle apresentaram células íntegras com morfologia de bastão. Nas imagens das células expostas durante 4 horas foram identificadas diversas células danificadas, indicando a ocorrência de lise celular. As células expostas durante 24 horas demonstraram estruturas danificadas semelhantes àquelas encontradas nas imagens para o período de 4 horas de interação.

Nas análises realizadas neste estudo, o período de incubação das células ao extrato EEP foi escolhido com base nos trabalhos de Campos et al. (2012), Eaton et al. (2008) e Santana et al. (2012), que tinham objetivos de análise semelhantes

5.7.1 *Staphylococcus aureus*

5.7.1.1 Período de 4 horas de exposição

As imagens geradas para a bactéria *S. aureus* estão apresentadas na Figura 20 permitindo comparar as mudanças morfológicas nas bactérias do grupo controle com as tratadas com o extrato EEP. É possível visualizar células com forma esférica, característicos de cocos, com a altura de 0,50 μm da maior bactéria da imagem da Figura 20A. Enquanto as bactérias expostas ao tratamento pelo período de 4 horas apresentaram pequenas alterações morfológicas, como o aumento da altura das células, sendo a mais alta 0,60 μm , e aparente aumento da rugosidade superficial. Outra característica importante visualizada na imagem (Figura 20C) é a presença de deformação estrutural da célula, na qual podemos supor a ocorrência de lise celular.

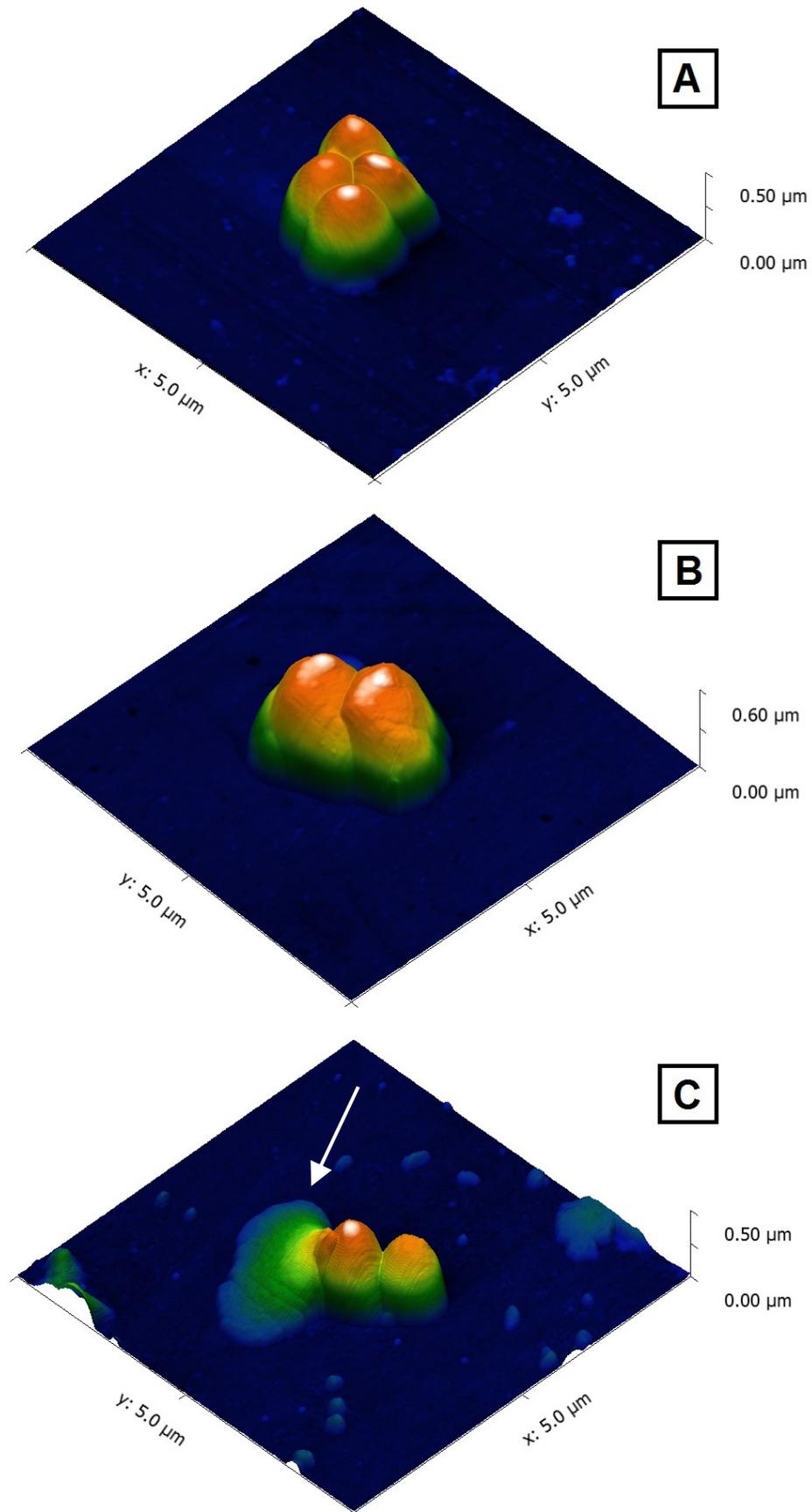


Figura 20 – Imagens topográficas das células de *S. aureus* no período de 4 horas. (A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. A seta na imagem (C) indica uma estrutura deformada por uma aparente bacteriólise.

Foram realizadas análises das mudanças morfológicas no total de 38 bactérias, sendo avaliados os volumes, alturas e diâmetros celulares, conforme os exemplos das Figuras 21 e 22.

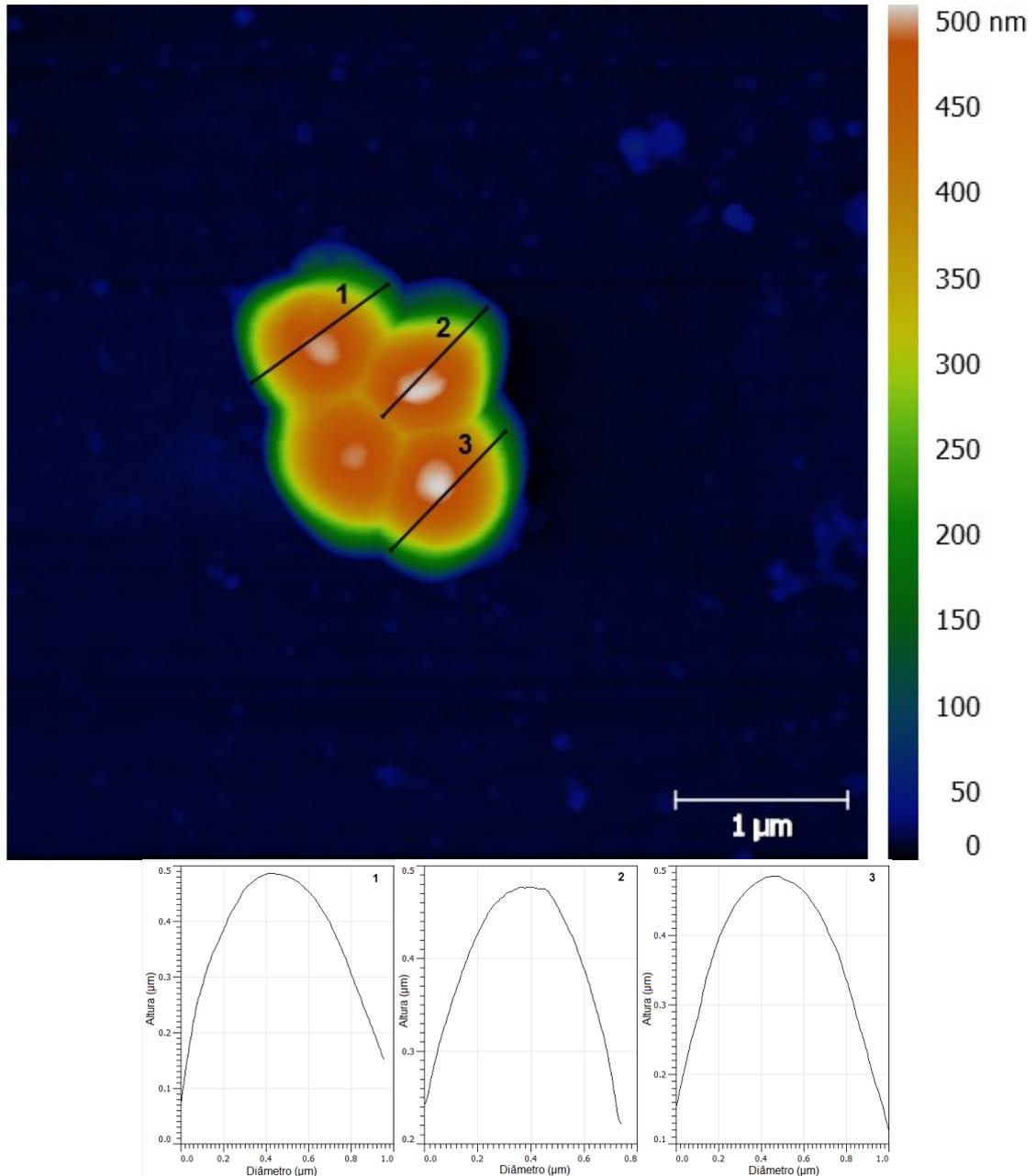


Figura 21 – Imagens topográficas e perfil de alturas e diâmetros de *S. aureus* do grupo controle no período de 4 horas. Os números correspondem às secções analisadas.

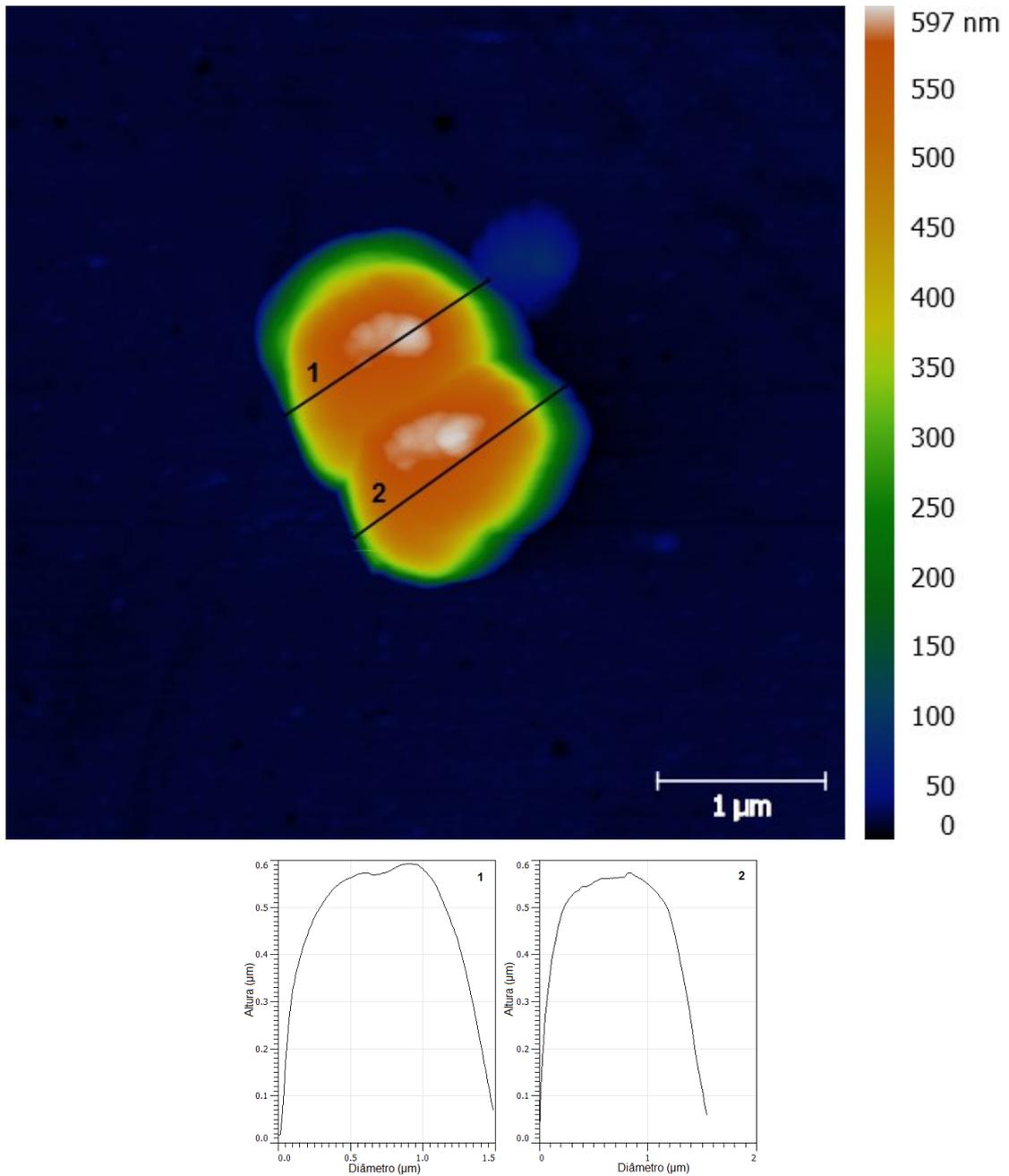


Figura 22 - Imagens topográficas e perfis da altura e diâmetro de *S. aureus* tratadas com extrato EEP. Os números correspondem às secções analisadas.

Os dados obtidos nas medições estão apresentados na Tabela 6. Podendo identificar que os valores médios de volume, altura e diâmetro são maiores para as bactérias expostas ao extrato EEP.

Tabela 6 – Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 4 horas.

<i>S. aureus</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,251 \pm 0,107 ^a	0,338 \pm 0,106 ^b
Altura (μm)	0,529 \pm 0,081 ^a	0,633 \pm 0,088 ^b
Diâmetro (μm)	0,961 \pm 0,124 ^a	1,22 \pm 0,204 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

Comparando os valores da Tabela 6, temos que as bactérias expostas ao extrato, apresentam aumento da estrutura celular. Há indícios da ocorrência de bacteriólise conforme indicado na Figura 20C em razão do volume de 0,291 μm^3 encontrado, similar aos medidos no grupo tratamento.

Segundo Hayflick (2007), mudanças na estrutura molecular do organismo podem ser resultado de alterações entrópicas, que levam a um aumento na desorganização do sistema. Essas medidas são passíveis de serem estimadas pelo Software Gwyddion através da medida conjunta das variações. Assim a estimativa da variação entrópica medida em 38 bactérias indica uma tendência de aumento na desorganização geral para aquelas expostas à própolis. Numericamente temos: bactérias não tratadas, média de $-18,08 \pm 0,44$, e bactérias tratadas $-16,89 \pm 0,42$, confirmando uma atividade degradativa do extrato sobre as paredes bacterianas.

5.7.1.2 Período de 12 horas de exposição

Para observar as alterações celulares bacterianas durante um maior de tempo, as bactérias *S. aureus* foram expostas ao EEP – e à solução salina – durante 12 horas. As imagens geradas nestas condições estão apresentadas na Figura 23, possibilitando comparar as mudanças morfológicas entre as bactérias dos grupos controle e tratamento. Nas imagens das bactérias do grupo controle foi possível visualizar estruturas semelhantes às encontradas no grupo controle de 4 horas. Na figura podemos observar uma bactéria com característica de cocos, possuindo forma esférica e com altura de 55 μm . Alterações morfológicas podem ser identificadas nas imagens das bactérias do grupo tratamento. Além do aumento da estrutura celular, é possível observar o aumento da altura e da rugosidade superficial das células. Outra característica importante observada nas imagens das bactérias expostas ao EEP foi

a perda da característica de cocos das células, passando a apresentar estruturas disformes (n=23) que podem ser bactérias que sofreram lise celular, como visualizado na Figura 23C.

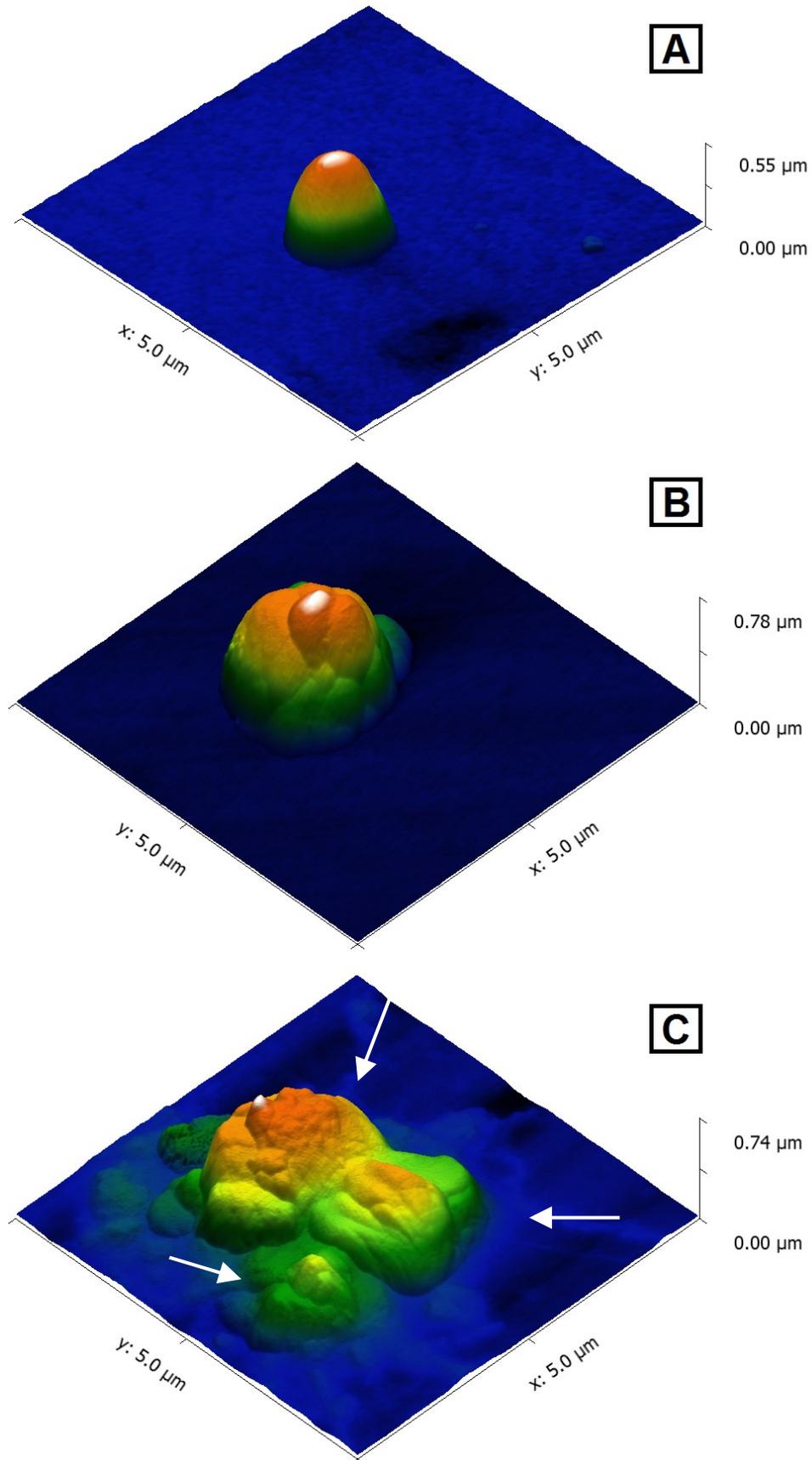


Figura 23 – Imagens topográficas das células de *S. aureus* no período de 12 horas. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. As setas na imagem (C) indicam estruturas deformadas por aparente bacteriólise.

Com o objetivo de confirmar estatisticamente os dados obtidos, foram analisadas no total de 30 imagens, sendo avaliados, como no tópico 5.7.1.1, os volumes, alturas e diâmetros celulares. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 12 horas.

<i>S. aureus</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,266 \pm 0,119 ^a	0,751 \pm 0,193 ^b
Altura (μm)	0,528 \pm 0,079 ^a	0,667 \pm 0,057 ^b
Diâmetro (μm)	0,978 \pm 0,221 ^a	1,542 \pm 0,403 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

Comparando os valores da Tabela 7, podemos observar que o grupo tratamento apresenta estruturas com maiores dimensões. Além disso, os organismos presentes na Figura 23C possuem volumes semelhantes aos volumes das células bacterianas do grupo tratamento. Também foram encontrados valores de volume semelhantes ao do grupo tratamento em 21 outras estruturas medidas, demonstrando indicativos de bacteriólise nas bactérias do grupo tratamento.

Quando comparados os grupos tratamento das Tabelas 6 e 7, nota-se um aumento considerável das estruturas das bactérias, principalmente quando comparados os valores médios dos volumes celulares, onde a média do grupo tratado por 4 horas foi de 0,338 \pm 0,106 μm^3 , e a de 12 horas foi de 0,751 \pm 0,193 μm^3 , indicando a influência do tempo de exposição das bactérias ao extrato sobre a atividade antibacteriana da própolis.

As alterações entrópicas de 30 bactérias também foram medidas indicando que as bactérias expostas ao EEP apresentaram uma tendência de aumento na desorganização celular, confirmando uma ação degradativa celular como mecanismo de ação do extrato sobre as paredes bacterianas. Numericamente as bactérias do grupo controle apresentaram a média de -17,94 \pm 0,22, e as bactérias do grupo tratamento -16,78 \pm 0,79.

Os resultados obtidos para ambos os períodos de tratamentos utilizados estão em concordância com os dados encontrados em outros estudos. O aumento da rugosidade superficial e alterações na forma e tamanho das células observados no

presente trabalho também foram encontrados nas análises realizadas por Santana et al. (2012), que utilizando o AFM investigaram alterações estruturais de *S. aureus* expostas durante 4 horas ao extrato etanólico de própolis (etanol 70%), registrando imagens de bactérias com alterações morfológicas significativas, como mudanças na forma e tamanho, e presença de irregularidades superficiais nas células.

A presença de deformações na parede celular observada também foram encontradas em outros estudos em que as bactérias Gram-positivas *Streptococcus agalactiae* foram tratadas com extrato de própolis em etanol 25%, segundo os pesquisadores, Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994), o extrato de própolis causa alterações estruturais, promovendo mudanças na membrana plasmática, assim como defeitos na parede celular, levando em alguns casos à bacteriólise parcial.

5.7.2 *Escherichia coli*

5.7.2.1 Período de 4 horas de exposição

As imagens realizadas para a bactéria *E. coli* expostas ao período de 4 horas ao extrato – e à solução salina, no caso do grupo controle - estão apresentadas na Figura 24. A partir das imagens é possível comparar as diferenças estruturais entre os grupos controle e tratamento. As bactérias pertencentes ao grupo controle apresentaram estruturas características de *E. coli*, como a forma bastão, e dimensões de 0,27 μm de altura, 1,5 μm de comprimento e 0,9 μm de diâmetro. Enquanto as bactérias do grupo tratamento apresentaram um aumento evidente em sua estrutura, apresentando altura de 0,7 μm , comprimento de 2,1 μm e diâmetro de 1,3 μm , por exemplo. Além disso, foi observado um leve aumento da rugosidade superficial das bactérias expostas ao extrato, como visualizado na Figura 24C.

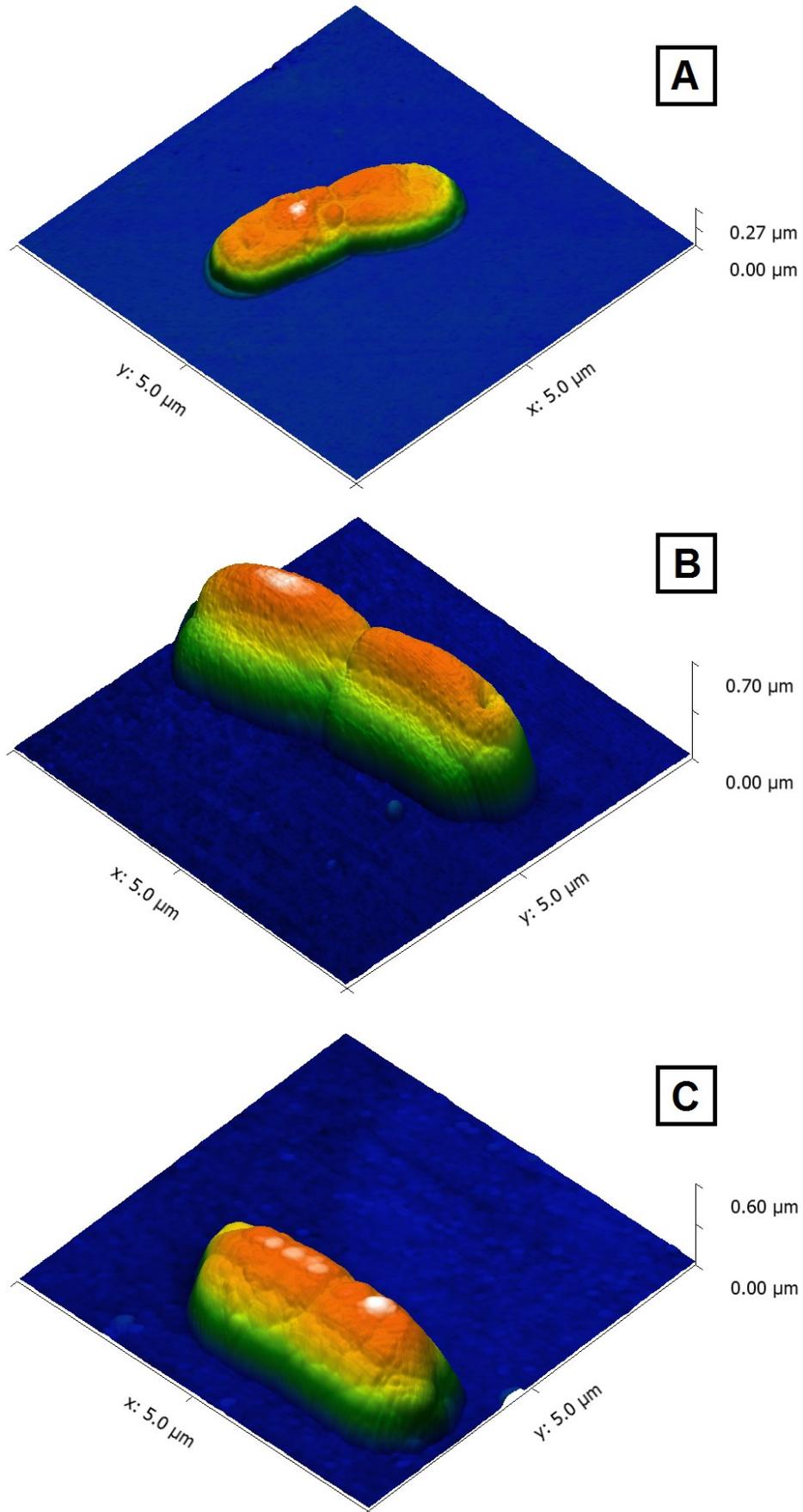


Figura 24 – Imagens topográficas das células de *E. coli* no período de 4 horas. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP.

Para verificar estatisticamente as alterações morfológicas causadas pelo extrato, análises do volume, altura, comprimento e diâmetro do total de 30 bactérias foram avaliados, conforme os exemplos das Figuras 25 e 26.

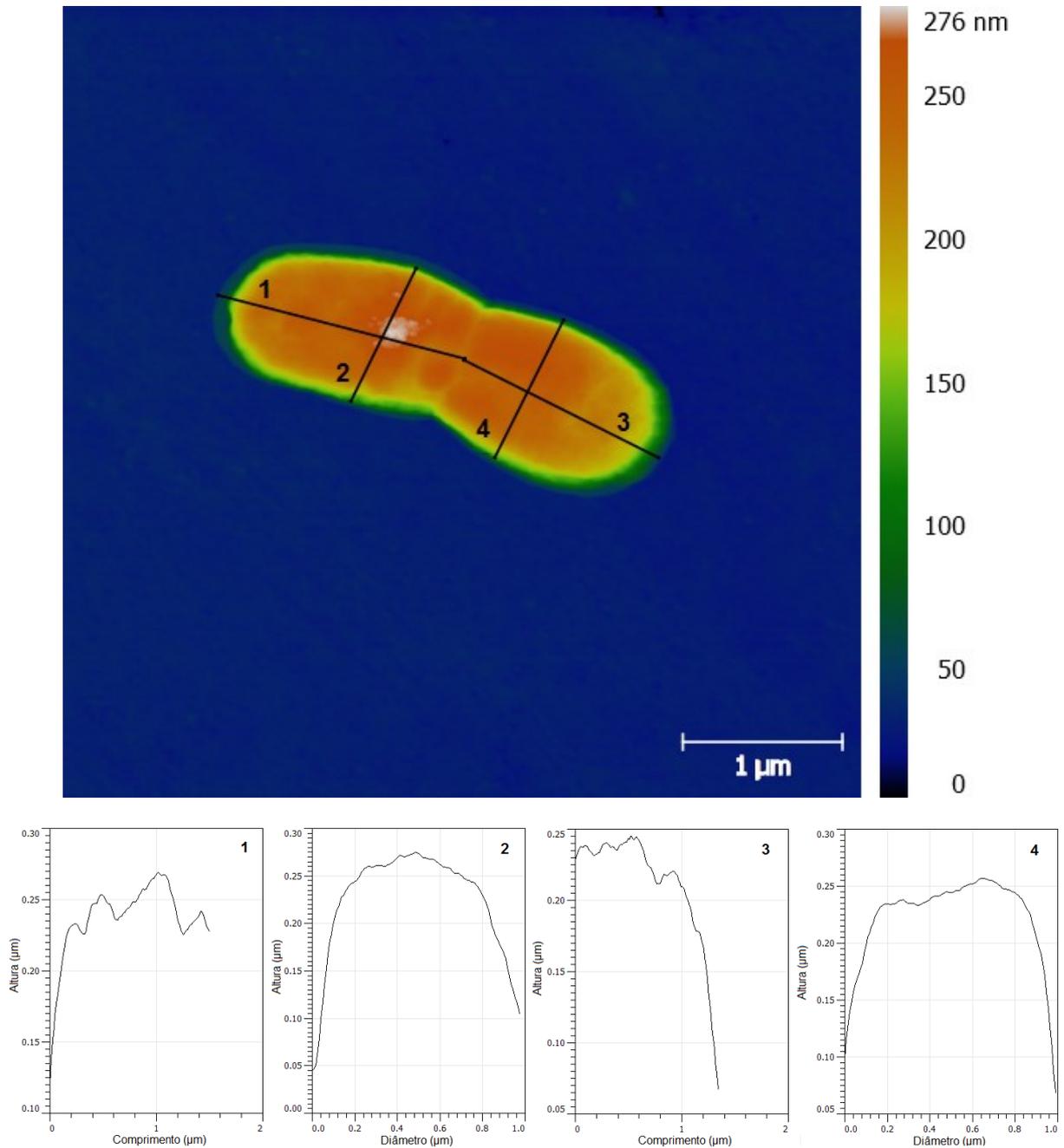


Figura 25 – Imagens topográficas e perfil de alturas e diâmetros de *E. coli* do grupo controle no período de 4 horas. Os números correspondem às secções analisadas.

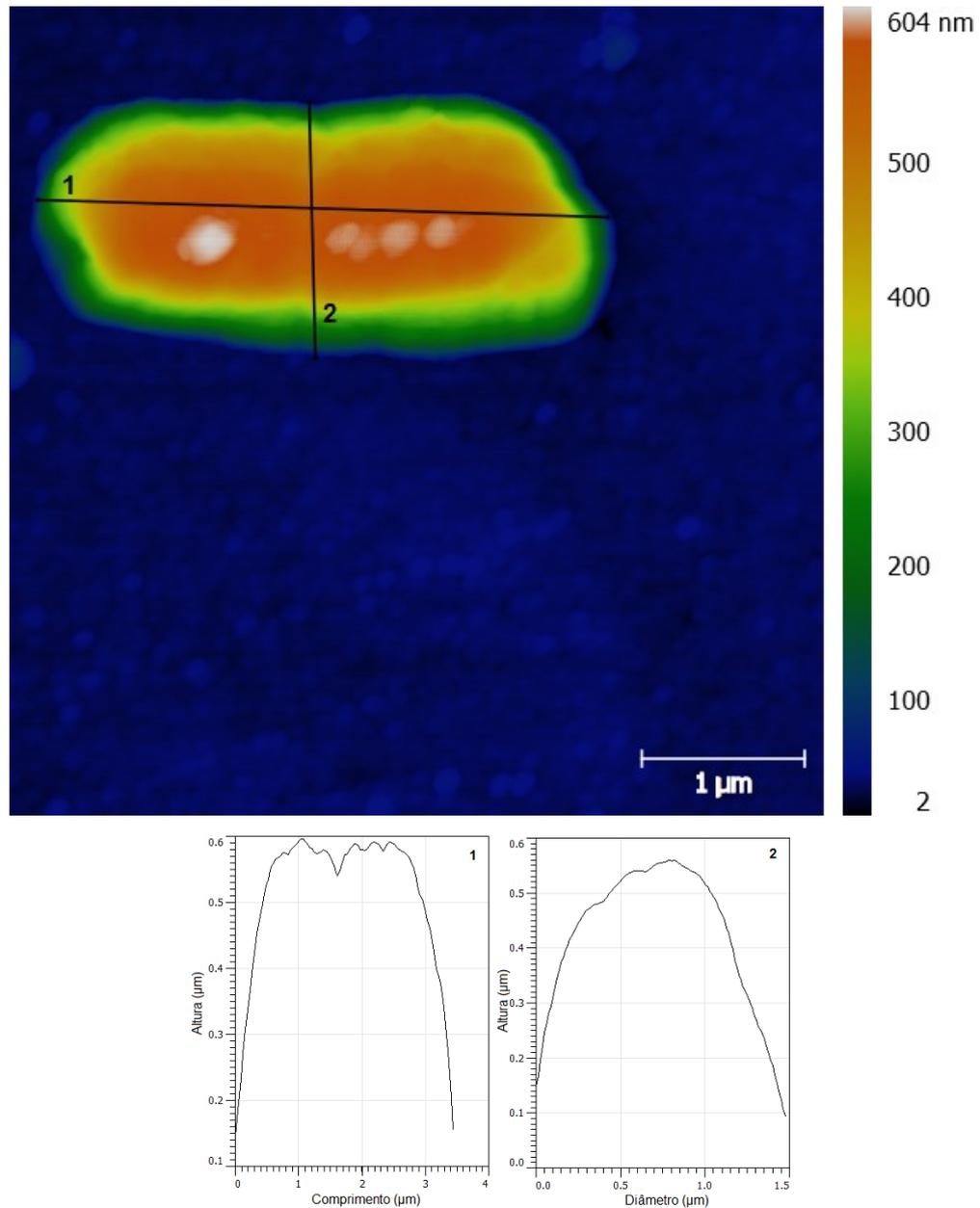


Figura 26 - Imagens topográficas e perfis da altura e diâmetro de *E. coli* tratadas com extrato EEP durante 4 horas. Os números correspondem às secções analisadas.

Os dados obtidos através das medições realizadas estão dispostos na Tabela 8. Foram realizadas medições do volume, altura, comprimento e diâmetro das células.

Tabela 8 – Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 4 horas

Dimensões	<i>E. coli</i>	
	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,300 \pm 0,045 ^a	1,661 \pm 0,473 ^b
Altura (μm)	0,327 \pm 0,073 ^a	0,687 \pm 0,062 ^b
Comprimento (μm)	2,053 \pm 0,026 ^a	2,833 \pm 0,583 ^b
Diâmetro (μm)	0,806 \pm 0,185 ^a	1,401 \pm 0,151 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

Comparando os valores da Tabela 8, é possível indicar que as bactérias expostas ao extrato apresentaram aumento de suas estruturas celulares, como o aumento do volume, altura, comprimento e diâmetro, demonstrando que o extrato de própolis EEP também apresenta atividade sobre as bactérias *E. coli*.

Assim como para *S. aureus*, foram realizadas análises para determinar se houve aumento da desorganização intracelular bacteriana de *E. coli*, quando exposta ao EEP. Sendo encontrado um aumento na desorganização celular com valores numéricos de $-17,67 \pm 0,62$ para as bactérias do grupo tratamento, e $-18,12 \pm 0,39$ para o grupo controle, demonstrando a ocorrência de atividades degradativas do extrato sobre as paredes bacterianas.

5.7.2.2 Período de 12 horas de exposição

As imagens obtidas para as bactérias expostas ao extrato – e a solução salina – durante 12 horas estão apresentadas na Figura 27, permitindo comparar as estruturas entre os grupos controle e tratamento. No grupo controle as bactérias apresentam forma de bastonete, característica de bacilo, com dimensões de 0,26 μm de altura, 1,9 μm de comprimento e 1,1 μm de diâmetro. Entretanto, as imagens das bactérias do grupo tratamento apresentaram aumento das dimensões, como nos valores de 0,71 μm na altura e 3,4 μm no comprimento. Além disso, alterações estruturais foram observadas em diversas bactérias ($n=8$), como demonstradas na Figura 27B e C, nas quais apresentam provável degradação parcial da parede celular (indicados pelas setas).

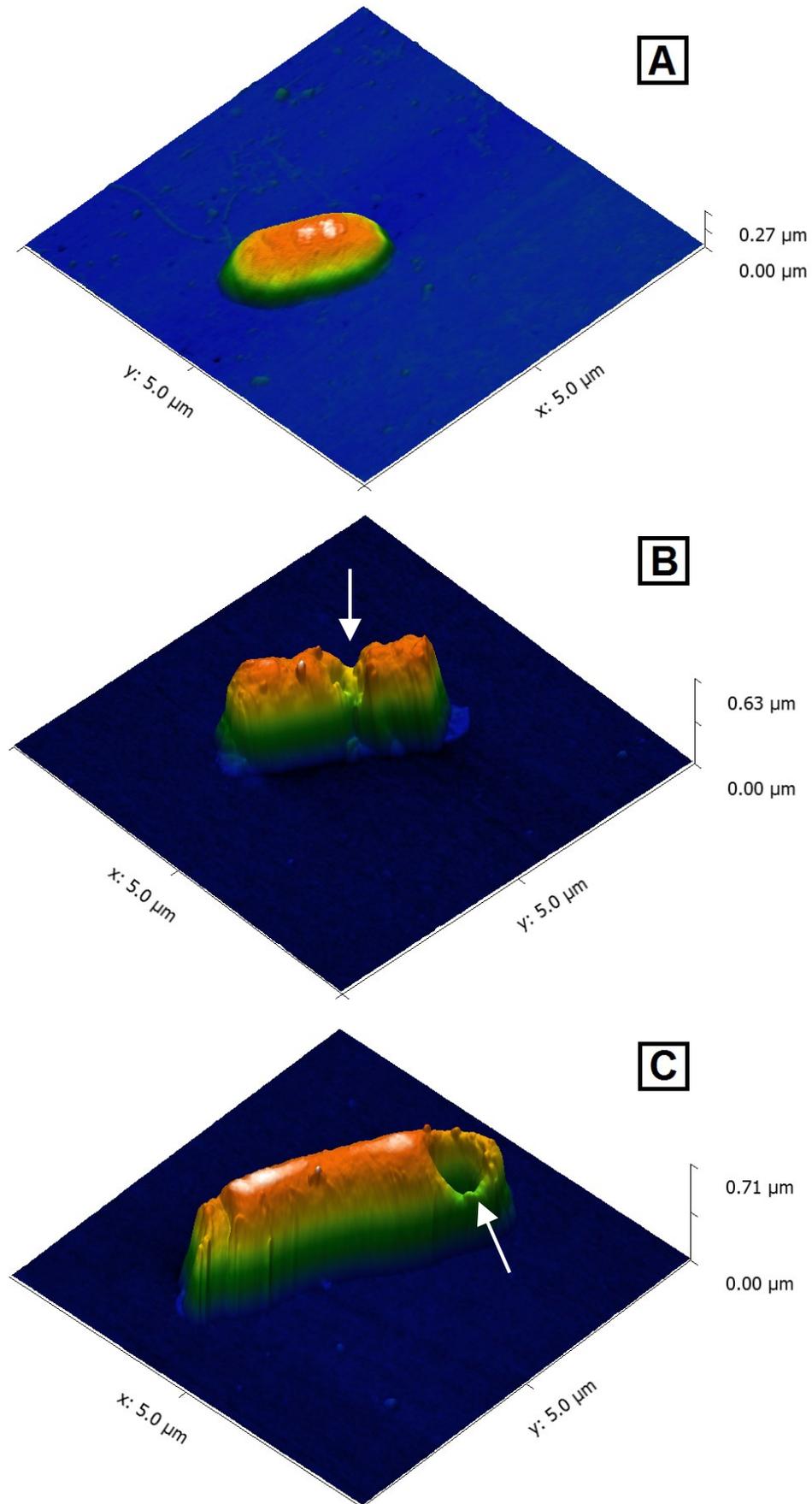


Figura 27 – Imagens topográficas das células de *E. coli* no período de 12 horas. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. As setas nas imagens (B) e (C) indicam alteração da parede celular.

Análises das dimensões celulares do total de 30 bactérias foram realizadas (volume, altura, comprimento e diâmetro celular), cujos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 12 horas.

Dimensões	<i>E. coli</i>	
	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,560 \pm 0,167 ^a	1,396 \pm 0,443 ^b
Altura (μm)	0,330 \pm 0,077 ^a	0,736 \pm 0,087 ^b
Comprimento (μm)	2,558 \pm 0,462 ^a	2,867 \pm 0,785 ^a
Diâmetro (μm)	1,292 \pm 0,193 ^a	1,025 \pm 0,218 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

A partir dos dados da Tabela 9, nota-se um considerável aumento das células tratadas com o extrato, as quais apresentaram aumento significativo de volume e altura celular, demonstrando que o extrato interferiu na atividade celular bacteriana.

Comparando os valores dos grupos tratamento das Tabelas 8 e 9, não são observadas diferenças significativas entre dimensões estruturais dos grupos. Entretanto, quando observadas as imagens desses grupos, nota-se a interferência do tempo na atividade do extrato, onde as bactérias expostas ao extrato pelo maior período de tempo (12 horas) sofreram alterações estruturais mais intensas.

A estimativa da variação entrópica medida de 30 bactérias indica uma tendência de aumento na desorganização estrutural geral das bactérias expostas ao EEP, demonstrando que o extrato apresenta atividade degradativa junto a parede celular bacteriana. Em termos numéricos, foi obtida a média de $-18,01 \pm 0,32$ das bactérias do grupo controle, e $-17,08 \pm 0,61$ das bactérias do grupo tratamento.

Os resultados para ambos os tempos de tratamento com o EEP estão em concordância com os dados encontrados em outros estudos. É provável que o aumento medido do volume das células ocorre devido às alterações na membrana, que segundo Cushnie e Lamb (2005b), alguns componentes presentes na própolis são responsáveis por agir na membrana bacteriana, interferindo no processo de osmose, e levando ao aumento do fluxo de água para o interior da célula, podendo causar lise osmótica. Bryan, Redden e Traba (2015) também relataram alterações estruturais em bactérias tratadas com extrato etanólico de própolis, sugerindo que danos na parede celular dessas bactérias levam à lise celular.

6 CONCLUSÕES

- A escolha do tipo de solvente utilizado na extração da própolis tem forte influência na extração de seus componentes ativos. O etanol devido à sua baixa polaridade foi mais eficaz na solubilização de compostos flavonoides, sendo, segundo as análises semiquantitativas, o extrato EEP o que apresentou maior concentração desses compostos.

- Uma maior presença de compostos flavonoides no extrato EEP foi confirmada por análises realizadas por CLAE, indicando que a própolis utilizada contém uma maior quantidade de compostos apolares, com maior solubilidade ao etanol.

- A análise espectroscópica por FTIR permitiu a identificação de maiores quantidades de grupos funcionais ativos no extrato EEP, principalmente relacionados aos flavonoides.

- A combinação das técnicas CLAE, FTIR e MIC permitiu confirmar que o extrato EEP tem maior eficiência na inibição bacteriana. Efeito este atribuído a maior presença de flavonoides em sua composição. Inversamente, o extrato aquoso (EAP), o qual foi identificado baixa presença de flavonoides, não apresentou nenhuma atividade seja contra a *E. coli* ou contra o *S. aureus*.

- Nos extratos com presença de etanol, ficou evidente a maior eficiência na inibição da Gram-positiva *Staphylococcus aureus* do que da Gram-negativa *Escherichia coli*. Em decorrência, provavelmente, das diferenças na composição das paredes celulares entre os grupos.

- Os resultados obtidos nas análises em AFM permitiram concluir que os componentes extraídos pelo extrato EEP apresentam efeitos degradativos sobre a integridade de *S. aureus* e *E. coli*. Acredita-se que as diferenças na parede celular dessas bactérias, a camada extra LPS (lipossacarídica) de bactérias Gram-negativas, atuam como um revestimento protetor adicional à membrana celular, reduzindo os efeitos do EEP junto à membrana. Os resultados indicam que maiores concentrações de EEP são necessários para que ocorra um efetivo inibitório satisfatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** 2005. 186 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

ALSTEENS, D.; TRABELSI, H.; SOUMILLION, P.; DUFRÊNE, Y. F. Multiparametric atomic force microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bactéria. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F. E.; CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3- methyl-but-2-enyl caffeate. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.5, p. 644-647, 1994.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração.** 2014. 88 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2014.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of própolis. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 4, p. 471-474, 1983.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCINB, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEVC, A.; MAIMONI-RODELLAB, R.; POPOV, S. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 54c, p. 401-405, 1999.

BANKOVA, V.; DE CASTRO, S.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. v. 31, p. 3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their citotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 896-900, 1998.

BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L. Y.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 67-73, 2002.

BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Effect of brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 567-571, 2007.

BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; DE ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de força atômica. In: CANEVAROLO Jr., S.V. (coord). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. cap. 10, p. 201-207.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic Composition of Propolis from China and from South America. **Z. Naturforsch.**, v. 49c, p. 712-718, 1994.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005.

BRYAN, J.; REDDEN, J.; TRABA, C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. **Letters in Applied Microbiology**. v. 62, p. 192-198, 2015.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p. 347-363, 1998.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; DOS SANTOS, J. M. T.; DA ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, A. C.; COSTA, E. M.; FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; ARARUNA, F. B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. M. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymeres**, v. 90, p. 270-274, 2012.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia 73 Suppl.** v. 1, p. S1-S6, 2002.

CHENG, P. C.; WONG, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v. 77, p. 8–15, 1996.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005a.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 243–248, 2005b.

DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities, therapeutic uses of this bee-product. **Annu. Rev. Biol. Sci.**, v. 3, p. 49-83, 2001.

DOS SANTOS, C. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 71-74, 2003.

DUFRENE, Y. F. Atomic Force Microscopy in Microbiology: New Structural and Functional Insights into the Microbial Cell Surface. **mBio**, v. 5, 2014. DOI:10.1128/mBio.01363-14.

DUFRENE, Y. F. Atomic force microscopy of fungal cell walls: an update. **Yeast**. v. 27, p. 465-471, 2010.

EATON, P.; FERNANDES, J. C.; PEREIRA, E.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, v. 108, p. 1128-1134, 2008.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. Nova York: Oxford University Press Inc., 2010. 448 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Juiz de Fora, MG). Humberto de Mello Brandão. **Compositions based on propolis nanocapsules which can be used as carriers for substances of interest, methods for producing same and use thereof**. US 2013/0295181 A1, 7 nov. 2013, 19 jul. 2013.

FERNANDES Jr., A.; SUGIZAKI, M. F.; FOGO, M. L.; FUNARI, S. R. C.; LOPES, C. A. M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 63-69, 1995. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301995000200003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 09 nov. 2016.

FERNANDES, J. C.; EATON, P.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. **Ultramicroscopy**, v. 109, p. 854–860, 2009.

FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; DE LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: WALKER, J. M.; SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A. L. R. (Ed.). *Environmental Microbiology. Methods and Protocols*. Editora Humana Press Inc., New Jersey, 2004. p. 203-218.

FRANCA, J. R.; DE LUCA, M. P.; RIBEIRO, T. G.; CASTILHO, R. O.; MOREIRA, A. N.; SANTOS, V. R.; FARACO, A. A. G. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria.

BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014. 11 p. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/478>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n.1, p. 171-178, 2006.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 206-212, 2007.

GALLICE, W. C.; MESSERSCHMIDT, I.; ZAMORA, P. P. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 397-403, 2011.

GAMMOUDI, I.; MATHELIE-GUINLET, M.; MOROTEA, F.; BEVENB, L.; MOYNET, D.; GRAUBY-HEYWANGA, C.; COHEN-BOUHACINAA, T. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 355-364, 2016.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**. v. 60, p. 59-84, 1978.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

HAYFLICK, L. Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem. In: RATTAN, S. I. S., AKMAN, S. (authors). **Biogerontology: Mechanisms and Interventions**. Editora: Blackwell Publishing Inc., 2007, p. 1-13.

HELFENBERG, K. D. The analysis of beeswax and própolis. **Chemikerzeitung**, v. 2, p. 192-194, 1908.

HODGES, C. S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 99, p. 13-75, 2002.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**. v.116, p. 452-461, 2009.

KONISHI, S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUSTÓDIO, A. R.; CUNHA, I. B. D. S.; SHIMIZU, M. T. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem doce**. n. 75, p. 22-25, 2004.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *staphylococcus aureus*. **Arzneimittel-Forschung**, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J., et al. Flavonóides. **Biocologia, Ciência & Desenvolvimento**, [S. l.], v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.

LU, L. C.; CHEN, Y. W.; CHOU, C. C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2005.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK**. 10ª ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 2004. 624p.

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**. v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARTINEZ, J. L.; FAJARDO, A.; GARMENDIA, L.; HERNANDEZ, A.; LINARES, J. F.; MARTÍNEZ-SOLANO L.; SANCHEZ, M. B. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 33, p. 44-65, 2009.

MARTINEZ-MARTIN, D.; CARRASCO, C.; HERNANDO-PEREZ, M.; DE PABLO, P. J.; GOMEZHERRERO, J.; PEREZ, R.; MATEU, M. G.; CARRASCOSA, J. L.; KIRACOFÉ, D.; MELCHER, J.; RAMAN, A. Resolving Structure and Mechanical Properties at the Nanoscale of Viruses with Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. **Plos One**, v. 7, 2012.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 166-172, 2010.

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. **Microbiol. Res.**, v. 152, p. 239-246, 1997.

MORAES, C. S.; DAUGSCH, A. D.; FORT, P.; PARK, Y. K. Extrações de própolis vermelha do nordeste brasileiro em diferentes concentrações alcoólicas, com

diferentes solventes e suas atividades contra *Staphylococcus aureus*. **APACAME – Mensagem Doce**, 2008. 5 p. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/99/artigo.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NINA, N.; QUISPE, C.; JIMÉNEZ-ASPEE, F.; THEODULOZ, C.; FERESÍN, G. E.; LIMA, B.; LEIVA, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. **Molecules**, v. 20, p. 18144-18167, 2015. DOI:10.3390/molecules201018144

NISHINO, T.; IKEMOTO, E.; KOGURE, K. Application of Atomic Force Microscopy to Observation of Marine Bacteria. **Journal of Oceanography**, v. 60, p. 219-225, 2004.

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, I. M.; JUNQUEIRA, A. M. R. Aspectos da contaminação microbiológica em hortaliças. Brasília: UnB, 2005. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/default.asp?id=3447>>. Acesso em: 8 abril 2016.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero capsicum spp.** 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, 2011.

OLIVEIRA, R. N.; MANCINI, M. C.; OLIVEIRA, F. C. S.; PASSOS, T. M.; QUILTY, B.; THIRÉ, R. M. S.; MCGUINNESS, G. B. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Revista Matéria**, v.21, n.3, pp. 767-779, 2016.

OSIRO, D.; COLNAGO, L. A.; OTOBONI, A. M. M. B.; LEMOS, E. G. M.; SOUZA, A. A.; COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 313–318, 2004.

OSIRO, D.; BERNARDES FILHO, R.; ASSIS, O. B. G.; JORGE, L. A. C.; COLNAGO, L. A. Measuring Bacterial Cells Size with AFM. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 341-347, 2012.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1235-1259, 1995.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc Tecnol Aliment.** v. 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of Preparations. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998. DOI: 10.1271/bbb.62.2230.

PAUL, B. C.; MA, H.; SNOOK, L. A.; DAHMS, T. E. S. High-Resolution Imaging and Force Spectroscopy of Fungal Hyphal Cells by Atomic Force Microscopy. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; AYYACHAMY, M.; TURNER, K. M.; O'DONOVAN, A. (eds.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology.** Editora Springer, Nova York, 2013. p. 151-160.

PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova.** v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, I. N. **Própolis: matéria-prima de potencial aplicação farmacêutica.** 2013. 49 p. Dissertação (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

PILLET, F.; LEMONIER, S.; SCHIAVONE, M.; FORMOSA, C.; MARTIN-YKEN, H.; FRANCOIS, J. M.; DAGUE, E. Uncovering by Atomic Force Microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. **BMC Biology.** 2014. 11 p. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/12/6>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

PINTO, A. de F. M. A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Millenium**, [S. l.], n. 4, p. 91-100, 1996. Disponível em: < http://www.ipv.pt/millenium/ect4_1.htm>. Acesso em: 28 nov. 2016.

PLOMP, M.; LEIGHTON, T. J.; WHEELER, K. E.; HILL, H. D.; MALKIN, A. J. In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. **PNAS**, v. 104, n. 23, p. 9644-9649, 2007.

RAMOS, A. F. N.; MIRANDA, J. L. PROPOLIS: A REVIEW OF ITS ANTI-INFLAMMATORY AND HEALING ACTIONS. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.

RAMOS, M. V.; DE OLIVEIRA, R. S. B.; PEREIRA, H. M.; MORENO, F. B. M. B.; LOBO, M. D. P.; REBELO, L. M.; BRANDÃO-NETO, J.; DE SOUSA, J. S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FREITAS, C. D. T.; GRANGEIRO, T. B. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 119, p. 5-18, 2015.

ROCHA, B. A.; BUENO, P. C. P.; VAZ, M. M. O. L. L. ; NASCIMENTO, A. P.; FERREIRA, N. U.; MORENO, G. P.; RODRIGUES, M. R.; COSTA-MACHADO, A. R. M.; BARIZON, E. A.; CAMPOS, J. C. L.; OLIVEIRA, P. F.; ACÉSIO, N. O.; LIMA, S.

P.; TAVARES, D. C.; BERRETTA, A. A. Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 670451, 11 p., 2013. DOI:10.1155/2013/670451

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **eCAM**. v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 485–491, 2012.

SAWAYA, A. C. H.F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S; MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, p.739-744, 2004.

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

SOUSA, J. P. B de.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; FURTADO, N. A. J. C.; DE SOUSA, M. L.; BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2656-2665, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing propolis extracts. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2015. 9 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/595393>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, v.19, p.63-68, 1959.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SHCILCHER, H. Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance. **Planta Med.**, v. 60, p. 222-227, 1994.

TOLLERSRUD, T.; BERGE, T.; ANDERSEN, S. R.; LUND, A. Imaging the surface of *Staphylococcus aureus* by atomic force microscopy. **APMIS**, v. 109, p. 541-545, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TOUHAMI, A.; JERICHO, M. H.; BEVERIDGE, T. J. Atomic Force Microscopy of Cell Growth and Division in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3289-3295, 2004.

UZEL, A.; SORKUNB, K., ÖNCÜ, O.; ÇOĞULU, D.; GENÇAY, O.; SALİH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **J Pharm Belg**. v. 34, n. 5, p. 253-259, 1979a.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis II. Identification par chromatographies haute-performance (liquide, gas-liquide et sur couches minces) des constituants. Bioautographie des chromatogrammes des composés antibactériens. **J Pharm Belg**. v. 34, p. 317-328, 1979b.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2006.

YULIANA, N. D.; WIJAYA, C. H.; NASRULLAH, N. Classification of trigona spp bee propolis from four regions in indonesia using FTIR metabolomics approach. In: ASEAN FOOD CONFERENCE, 13., 2013, Singapore. **Meeting future food demands: security and sustainability: proceedings**. [S. l.: s. n.], 2016. não paginado.