

UNIVERSIDADE ANHANGUERA-UNIDERP  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM PRODUÇÃO E  
GESTÃO AGROINDUSTRIAL

EFEITOS DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS, POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
ANTIFÚNGICO DA PRÓPOLIS VERDE COLETADA EM  
CAMPO GRANDE-MS

Daiane Martini  
Biomédica, Esp. em Microbiologia

CAMPO GRANDE – MATO GROSSO DO SUL  
2015

UNIVERSIDADE ANHANGUERA-UNIDERP  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM PRODUÇÃO E  
GESTÃO AGROINDUSTRIAL

EFEITO DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS, POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
ANTIFÚNGICO DA PRÓPOLIS VERDE COLETADA EM  
CAMPO GRANDE-MS

Daiane Martini

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselle Feliciani Barbosa  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemary Matias  
Coorientador: Prof. Dr. Wolff Camargo Marques Filho

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado Profissional em Produção e Gestão Agroindustrial da Universidade Anhanguera-Uniderp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção e Gestão Agroindustrial.

CAMPO GRANDE – MATO GROSSO DO SUL  
Fevereiro – 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Anhanguera – Uniderp

M339e Martini, Daiane.  
Efeito da sazonalidade nas características físico-químicas, potencial antibacteriano e antifúngico da própolis verde coletada em Campo Grande-MS / Daiane Martini. -- Campo Grande, 2015.  
65f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Anhanguera – Uniderp, 2015.

“Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giselle Feliciani Barbosa.”

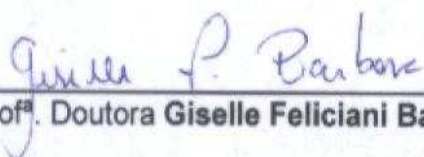
1. Própolis 2. Composição físico-química – Própolis 3. Efeitos biológicos 4. Atividade antimicrobiana 5. Atividade bacteriana I. Título.

CDD 21.ed. 615.329  
541.3

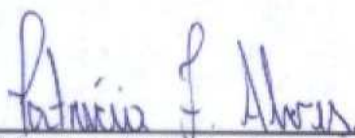
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Candidata: **Daiane Martini**

Dissertação defendida e aprovada em 13 de fevereiro de 2015 pela Banca Examinadora:



Prof<sup>a</sup>. Doutora **Giselle Feliciani Barbosa (Orientadora)**



Prof<sup>a</sup> Doutora **Patricia Ferreira Alves (Autonoma)**



Prof<sup>a</sup> Doutora **Deisy Lucia Cardoso (Universidade Anhanguera-Uniderp)**

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Jacir e Lourdes, que  
foram e sempre serão meu maior  
orgulho e fonte de inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Ao amor da minha vida, meu companheiro de todas as horas, Anderson! Sem você não teria saído do chão. Você me deu asas e permitiu voar! E foi meu porto seguro, sempre que precisei. Pelo apoio incondicional, pelo amor e carinho e principalmente, pela paciência, muito obrigada!

À Nayara, que além de me auxiliar na realização das análises e fazer da sua casa o “meu hotel” durante o mestrado, me proporcionou momentos memoráveis e me deu o prazer de uma amizade que quero que dure para a vida toda! Você é incrível Nay! Ter te conhecido e poder desfrutar de sua companhia foi e é um presente!

À Marissol, pela amizade, incentivo, e principalmente pela motivação em continuar. Você foi um grande presente em minha vida, conviver contigo me faz ver o mundo com outros olhos! Obrigada por tudo amiga!

Aos amigos e colegas do mestrado, pela parceria e encorajamento mútuo. Pelos momentos de diversão e as horas de estudo compartilhadas.

Aos meus grandes amigos e companheiros de trabalho do SENAI de Dourados, Rosane, Verônica e Everton. Vocês foram meu alicerce, seguraram a barra sempre que precisei me ausentar e me incentivaram a continuar em frente quando tudo parecia perdido. Pelo ombro amigo, pela ajuda, pela amizade e confiança, muito obrigada! Sem vocês não teria conseguido. Só vocês entenderam!

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e incentivo e por acreditarem que eu conseguiria. Mesmo distantes, vocês sempre me levaram a caminhar mais à frente. Por serem sempre meu porto seguro e meu alicerce, obrigada.

A minha orientadora Giselle, que assumiu o desafio de me orientar no meio do curso de mestrado, e que depois, teve o desafio ainda maior de me orientar a distância, quando mudei para Santa Catarina! Pelo apoio, paciência e todo auxílio, muito obrigada!

A professora Rose, pela confiança de me receber como sua orientanda e por toda a ajuda durante os dois anos de trabalho, por me socorrer sempre que precisei! Muito obrigada!

Ao professor Wolff, pela orientação, auxílio e contribuição no trabalho.

A todos os técnicos de laboratório da Universidade Anhanguera-Uniderp que me auxiliaram com a realização dos ensaios: Elen, Karen, Lucimar e Alcir.

A todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....	03
2.1. Própolis.....	03
2.2. Própolis Verde.....	03
2.3. Utilização.....	04
2.4. Características e Composição Química da Própolis.....	05
2.4.1. Compostos Fenólicos.....	07
2.4.2. Flavonoides.....	07
2.5. Efeitos Biológicos.....	08
2.5.1. Atividade Antimicrobiana.....	09
2.5.2. Atividade Antimicrobiana e Sazonalidade.....	15
2.6. Utilização de Produtos Naturais em Substituição aos Agrotóxicos.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	17
4. ARTIGO 1.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
4.1. Introdução.....	24
4.2. Material e Métodos.....	25
4.2.1. Coleta da Própolis.....	25
4.2.2. Análises Físicas e Químicas.....	26
4.2.3. Atividade Antibacteriana.....	30
4.2.4. Análises Estatísticas.....	31
4.3. Resultados e Discussão.....	31
4.4. Conclusões.....	42
4.5. Referências Bibliográficas.....	43



5. ARTIGO 2.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
5.1. Introdução.....	49
5.2. Material e Métodos.....	51
5.2.1. Coleta da Própolis.....	51
5.2.2. Preparo do Extrato Etanólico.....	51
5.2.3. Atividade Antifúngica.....	52
5.2.4. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides...	53
5.2.5. Análises Estatísticas.....	54
5.3. Resultados e Discussão.....	54
5.4. Conclusões.....	62
5.5. Referências Bibliográficas.....	62

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença
- ATCC – *American type culture collection*
- ATP – Adenosina Tri Fosfato
- BDA – Ágar Batata Dextrose
- BOD – *Biochemical oxygen demand*
- CAPE – Ácido cafeico feniletil ester
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CIM – Concentração inibitória mínima
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- DTA – Doença transmitida por alimentos
- ICMSF – *International commission on microbiological specifications for foods*
- IgG – Imunoglobulina G
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MIC – *Minimal inhibitory concentration*
- MS – Mato Grosso do Sul
- PIC – Percentual de Inibição de crescimento
- RTIQ – Regulamento técnico de identidade e qualidade
- TSS – Teor de sólidos solúveis
- TX – Taxa de crescimento
- UFC – Unidade formadora de colônia
- URSS – União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
- UV – Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Quantidade de Própolis Verde por colmeia em cada época de coleta.....	26
Tabela 2. Valores médios de umidade, cinzas e ceras da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	32
Tabela 3. Resultado da análise qualitativa de compostos fenólicos e flavonoides em própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	34
Tabela 4. Valores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides e índice de oxidação da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	34
Tabela 5. Precipitações, temperaturas médias e umidades relativas do ar nos meses de coleta das amostras de própolis verde, em Campo Grande, MS.....	36
Tabela 6. Valores médios de pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis dos extratos da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	37
Tabela 7. Teste de inibição por difusão em poço para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	39
Tabela 8. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	40
Tabela 9. Quantidade de Própolis Verde por colmeia em cada época de coleta.....	51
Tabela 10. Valores médios do diâmetro da colônia em ensaio " <i>in vitro</i> " da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Campo Grande, MS, 2014.....	54

- Tabela 11. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no primeiro dia de avaliação do ensaio "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014..... 55
- Tabela 12. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no segundo dia de avaliação do ensaio "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014..... 56
- Tabela 13. Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento (PIC), taxa de crescimento micelial (TX) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em ensaios "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014..... 58
- Tabela 14. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no ensaio "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014..... 59
- Tabela 15. Valores médios de compostos fenólicos totais e flavonoides da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014..... 60

**LISTA DE QUADROS**

	Página
Quadro 1. Atividades farmacológicas atribuídas a alguns flavonoides.....	08

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Extratos etanólicos das própolis coletadas em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.....	32
Figura 2. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no primeiro dia de avaliação do ensaio " <i>in vitro</i> " da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Campo Grande, MS, 2014.....	55
Figura 3. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no segundo dia de avaliação do ensaio " <i>in vitro</i> " da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Campo Grande, MS, 2014.....	57
Figura 4. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no ensaio " <i>in vitro</i> " da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . Campo Grande, MS, 2014.....	59

**EFEITOS DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,  
POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DA PRÓPOLIS VERDE  
COLETADA EM CAMPO GRANDE-MS**

**RESUMO:** A própolis é um material resinoso produzida por abelhas a partir de exsudatos de plantas e saliva. Sua constituição, assim como propriedades biológicas diferem quanto à região geográfica e época de coleta. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a constituição química, propriedades físicas e o efeito antimicrobiano da própolis verde coletada em Campo Grande – MS, em diferentes épocas do ano. Foram realizadas as análises de umidade, ceras, cinzas, concentração de flavonoides e compostos fenólicos, e a atividade antibacteriana pelos testes de Inibição por Difusão em Poço e Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Também foi verificada a ação antifúngica adicionando-se o extrato ao meio fundido e observando o índice de crescimento micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Os resultados obtidos indicaram variação significativa na composição química da própolis em função da época de coleta e também houve variação significativa nos testes antimicrobianos, confirmando a hipótese inicial do efeito da sazonalidade sobre a constituição e efeito biológico.

**Palavras-chave:** perfil físico-químico, atividade antimicrobiana, inibição do crescimento micelial, época de coleta.

**EFFECTS OF SEASONALITY IN FEATURES PHYSICALS AND CHEMICALS,  
ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL POTENTIAL OF GREEN PROPOLIS  
COLLECTED IN CAMPO GRANDE – MS, BRAZIL**

**ABSTRACT:** Propolis is a resinous material produced by bees from plant exudates and saliva. Propolis collected in different geographic regions and different times of the year have different constitution and therefore, different biological properties too. The aim of this study was to evaluate the chemical composition, the physical properties and the antimicrobial effect of green propolis collected in Campo Grande – MS, at different times of the year. Analyses of waxes, ash, moisture, flavonoid and phenolic compounds it was performed. We also made the antibacterial activity tests by the methods “Inhibition by Diffusion in Well” and “Minimal inhibitory concentration” (MIC) against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. For antifungal analysis, it was performed to verify the mycelial growth inhibition of fungus *Lasiodiplodia theobromae* by adding the propolis extract to the culture medium. The results indicated significant variation in chemical composition of propolis in function of time of collection. In addition, significant variation was observed in antimicrobial tests. The results confirm the initial hypothesis that seasonality has an effect on the composition and biological effects of propolis.

**Keywords:** physico-chemical profile, antimicrobial activity, mycelial growth inhibition, time of collect.



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Própolis é o termo genérico utilizado para denominar um material resinoso coletado pelas abelhas, de várias fontes (MARCUCCI, 1995). Na colônia *Apis mellifera* L., a própolis possui a função de vedar as paredes e as rachaduras das colmeias e sua entrada, protegendo-as contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, além de ser utilizada no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; SILVA *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008; BANKOVA, 2009).

Trata-se de uma mistura complexa, formada por material resinoso, gomoso e balsâmico coletada pelas abelhas dos ramos, flores, brotos e exsudados de plantas; além desses, na colmeia as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen para elaboração do produto final (MARCUCCI, 1995; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; VARGAS *et al.*, 2004; MENEZES, 2005; FUNARI; FERRO, 2006).

A composição química da própolis é complexa e variada, e está diretamente relacionada com a flora da região, época de colheita e técnica empregada, assim como com a espécie da abelha e com sua genética. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas (VARGAS *et al.*, 2004), como a produzida a partir da *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), caracterizada como própolis verde.

A própolis verde é produzida no Cerrado brasileiro, rica em compostos fenólicos e derivados como os flavonoides, é conhecida em todo o mundo como “*green propolis*”. A coloração esverdeada é devido a presença de fragmentos de *B. dracunculifolia* (alecrim do campo) e a intensidade da coloração é diretamente proporcional a concentração desses fragmentos (FARNESI, 2007), os quais influenciam diretamente na quantidade e qualidade dos constituintes químicos e na propriedades biológicas da própolis (MENEZES, 2005; LONGHINI *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2007; FARNESI, 2007).

Dentre os diversos efeitos biológicos atribuídos a própolis verde estão as atividades antimicrobiana (bactericida e fungicida), anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, fotoprotetora, antibiótica, antiviral, antioxidante, imunomodulatória,

hipotensiva, anti-HIV, anticancerígena e até mesmo antineoplásica (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; VARGAS *et al.*, 2004; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006).

Neste contexto, frente à crescente demanda por alimentos orgânicos, livres de agrotóxicos, aumenta a busca por agentes naturais que possam ser utilizados no controle de patógenos que causam deterioração dos alimentos, e a própolis destaca-se como produto com potencial de utilização para este fim.

Diversos são os trabalhos no Brasil que apontam a composição química da própolis, a atividade biológica e a influência das condições ambientais e sazonalidade (CASTRO *et al.*, 2007). Entretanto, até o momento poucos trabalhos relatam a composição da própolis verde produzida em Mato Grosso do Sul e sua relação com a sazonalidade e atividade biológica. Dessa maneira, levanta-se a hipótese de que a própolis coletada na mesma região, da mesma colmeia, apresenta composição e efeitos biológicos diferentes em função da época de coleta.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito ocasionado pela sazonalidade na composição química, propriedades físicas e no potencial antibacteriano e antifúngico da própolis verde, coletada na Fazenda Escola da Universidade Anhanguera - Uniderp, em Campo Grande, MS.

## **2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA**

### **2.1. Própolis**

Própolis é o termo genérico utilizado para denominar um material resinoso, gomoso e balsâmico coletado pelas abelhas de várias fontes (MARCUCCI, 1995).

De origem grega, a palavra própolis resulta da combinação entre as expressões pró (defesa) e polis (cidade). A denominação se dá, pois a própolis possui a função de vedar as paredes e as rachaduras das colmeias e sua entrada, reparar e reforçar os favos de mel e na mumificação de insetos invasores mortos, além de proteger a colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias utilizadas no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (MARCUCCI, 1995; SILVA *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008).

### **2.2. Própolis Verde**

A própolis verde é produzida no Cerrado brasileiro, rica em derivados prenilados e é conhecida em todo o mundo como “*green propolis*”. A coloração esverdeada é devido a presença de fragmentos da planta *Baccharis dracunculifolia* e a intensidade da coloração é diretamente proporcional a concentração desses fragmentos (FARNESI, 2007).

O Cerrado é uma savana mais ou menos densa, com uma cobertura herbácea contínua, elementos arbóreos e arbustivos de galhos retorcidos, cascas espessas e grandes folhas coriáceas. O clima é tropical estacional, com uma época seca bem definida com déficit hídrico, durante 5 a 7 meses, coincidindo com os meses mais frios. Genericamente, o cerrado pode ser definido pelos solos ácidos, distróficos e clima estacional (CARVALHO *et al.*, 2014).

Sousa *et al.* (2007) estudaram a própolis coletada em 6 diferentes regiões de Franca (SP) e Passo (MG) e demonstraram que a própolis verde foi produzida principalmente em localidades onde a mata nativa, característica de Cerrado, era predominante. Nas demais áreas onde havia a interferência mais acentuada da atividade agrícola, com culturas de cana-de-açúcar, café e eucaliptos, a própolis produzida não poderia ser caracterizada como própolis verde.

A própolis verde tem sido muito utilizada na profilaxia e também no tratamento de alguns tipos de cânceres. Deste tipo de própolis é isolado o ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico, que possui efeito comprovadamente protetor para carcinomas pulmonares e atividade antileucêmica (ABUBAKAR *et al.*, 2014). A própolis verde também possui comprovado efeito antimicrobiano (FARNESI, 2007).

Outro efeito biológico atribuído à própolis verde brasileira é o imunoprotetor, através da ativação dos macrófagos peritoneais aumentando sua atividade fagocítica, além de aumentarem também a concentração de IgG e hemolisinas (GAO *et al.*, 2014).

### **2.3. Utilização**

Há relatos de que a própolis tem sido utilizada desde a antiguidade, quando os egípcios embalsamavam os faraós, com uma mistura de ervas e própolis (FARNESI, 2007).

Os gregos, entre os quais Hipócrates, após estudarem a própolis, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores. O termo própolis já era descrito no século XVI na França e, em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e “composição”, indexado no Chemical Abstracts. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Já o primeiro estudo que avaliou a atividade biológica da própolis foi realizado no Instituto de Veterinária de Kazan (URSS), em 1947 investigando suas propriedades curativas e antimicrobianas (FARNESI, 2007).

No Brasil a primeira publicação sobre a própolis, em 1984, apresentou um estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*. A própolis brasileira estudada apresentou mais atividade do que vários antibióticos testados (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

O interesse global de pesquisas na própolis tem duas justificativas: a primeira devido a suas características de panaceia, ou seja, a capacidade que a própolis tem de possuir inúmeras atividades biológicas simultaneamente. A

segunda é devido ao seu alto valor agregado, pelo qual um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, mas chegando a custar 150 dólares em Tóquio (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos culminou com a seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS *et al.*, 2004).

Além disso, o consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos, de origem natural ou o mais próximo possível desta origem. Esta é a realidade à qual está submetida, também, a indústria cosmética; formulação de produtos naturais, com a não inclusão de matérias primas sintéticas para, por exemplo, conservação do produto final (PACKER; LUZ, 2007). Nesse âmbito, os produtos naturais vêm ganhando cada vez mais força, e a medida que as pesquisas aumentam, vão ganhando cada vez mais a confiança de médicos e pacientes de diversas áreas.

#### **2.4. Características e Composição Química da Própolis**

A própolis é uma substância rígida, quebradiça quando fria e que se torna dúctil e maleável quando aquecida a partir de 30°C. Sua coloração é dependente da vegetação presente no local de extração pelas abelhas operárias, do tipo e do tempo de coleta. Assim, pode apresentar tonalidades que variam entre o marrom escuro e o marrom avermelhado ou esverdeado. Possui odor característico, no entanto, algumas amostras não possuem nenhum odor. O ponto de fusão varia entre 60 - 70°C (SIMÕES; ARAÚJO; ARAÚJO, 2008).

Trata-se de uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores; além desses, na colmeia as abelhas adicionam secreções salivares (MARCUCCI, 1995; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; VARGAS *et al.*, 2004; MENEZES, 2005).

De modo geral, contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (LUSTOSA *et al.*, 2008).

Conforme Funari e Ferro (2006), a composição química é bastante variada. Já foram identificadas mais de 200 substâncias em diferentes amostras, provenientes de localidades distintas. Dentre essas substâncias destacam-se os ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, esquiterpenos, ligninas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, além de vitaminas e minerais.

Na própolis brasileira ocorrem principalmente compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas), os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferulico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzoico) e alguns oligoelementos (alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6 e C) (MARCUCCI *et al.*, 2001). Entretanto, foi observado que dependendo da estação do ano existem variações dos componentes. É o caso dos diterpenos por exemplo, que podem ser detectados em própolis produzida durante o verão e outono, mas não estão presentes nas outras estações (BANKOVA *et al.*, 1998).

Segundo Pereira, Seixas e Aquino Neto (2002), a composição química da própolis é justamente o maior problema para o seu uso em “fitoterapia”, tendo em vista que esta varia conforme a flora da região e época de colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (no caso brasileiro também o grau de “africanização” da *Apis mellífera* pode influenciar a sua composição). Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas (VARGAS *et al.*, 2004).

Park *et al.* (2002) identificaram e classificaram 12 tipos de própolis no Brasil, de acordo com as características químicas deste produto natural. Preliminarmente, a própolis foi classificada de acordo com sua procedência, ou seja, em função da região onde era coletada. Entretanto, ao se constatar que a própolis de um mesmo tipo - portanto com características químicas similares, poderia ser encontrada em diferentes regiões, passou-se a classificá-la de acordo com o perfil revelado por esse produto através da cromatografia em camada delgada (CCD), e não mais com base no local original da coleta.

### **2.4.1. Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos de grande diversidade estrutural, mas que possuem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

Grande grupo do qual fazem parte os flavonoides, ácidos fenólicos, derivados da cumarina, ligninas, taninos, alcaloides e terpenos, os compostos fenólicos são solúveis em água e solventes orgânicos polares. Podem ser isolados através da sua solubilidade em soluções fracamente básicas. São facilmente oxidáveis, ocasionando escurecimento das soluções. Ou seja, a velocidade do escurecimento da solução é diretamente proporcional a concentração de compostos fenólicos. Também sofrem oxidação na presença de metais (ferro e manganês), luz, calor e em meio alcalino (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

### **2.4.2. Flavonoides**

Os flavonoides são quantitativa e qualitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos no mundo. São constituintes das células vegetais superiores, atuam em atividades regulatórias de vitaminas lipossolúveis e eliminam odores que servem como sinais bioquímicos para diversos organismos do meio ambiente (FARNESI, 2007). Até o momento, mais de 4.200 flavonoides diferentes são conhecidos, e a eles são atribuídas inúmeras funções biológicas, conforme resumido no Quadro 1.

Quadro 1. Atividades farmacológicas atribuídas a alguns flavonoides.

<b>Atividade</b>	<b>Flavonoides</b>
Antitumoral	Quercetina
Antiespasmódica	Quercetina-3-glicosídeo; rutina; pinostrobrina
Anti-inflamatória	5,7,3'-triidróxi-3,6,4'-tri-metóxi-flavona; 5,3'-diidróxi-4'-metóxi-7-carbometóxi-flavonol; buteína; coparina; 3'-O-metil-violanona; xenognosina B; ternatina; quercetina
Antimicrobiana	7',4'-diidróxi-5-metóxi-flavona; 4',2,4'-tri-diidróxi-6'-metóxi-chalcona; 3',4',5,7-tetra-hidróxi-3-metóxi-flavona; Quercetina
Antimutagênica	Nobiletina; tangeretina
Antiúlcera	Quercetina
Antiviral	Quercetina; acacetina, apigenina; crisina; pectolinargenina; canferol; galangina; luteolina; quercitrina; amentoflavona
Antioxidante	Quercetina; diidroquercetina; rutina; diosmina; catequina; luteolina-3'-O- $\beta$ -D-glicorunídeo; luteolina-3'-O-(4''-O-acetil) - $\beta$ -D-glicorunídeo; luteolina-3'-O-(3''-O-acetil) - $\beta$ -D-glicorunídeo; hesperidina
Estrogênica	8-isopentenilnaringenina
Tripanossomicida	5-4'-diidróxi-7-metóxi-flavona; 5-4'-diidróxi-3,6,7-trimetóxi-flavona

(FONTE: Adaptado de Zuanazzi; Montanha, 2010).

## 2.5. Efeitos Biológicos

Ao longo dos anos, a própolis vem sendo incessantemente estudada por pesquisadores do mundo inteiro, na busca por reafirmar e comprovar seus efeitos antibióticos, antivirais, antifúngicos, anti-inflamatórios, antioxidantes, imunomodulatórios, hipotensivos, cicatrizantes, anestésicos, anti-HIV, anticariogênicos e até mesmo antineoplásicos (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; VARGAS *et al.*, 2004; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006).

As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química. Dentre as substâncias presentes na própolis destacam-se os flavonoides, os quais são indicados como responsáveis pelas



ações anti-inflamatória, antimicrobiana e, em especial pela antifúngica (MENEZES, 2005; LONGHINI *et al.*, 2007).

Para se ter uma ideia da diversidade a que nos referimos, somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; SILVA *et al.*, 2006; INOUE *et al.*, 2007).

### **2.5.1. Atividade Antimicrobiana**

A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida spp.* e sobre inúmeros outros microrganismos. Foi verificado também que bactérias Gram positivas se mostram mais sensíveis que as Gram negativas aos extratos de própolis (FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006). Segundo Gonsales *et al.* (2006) a ação sobre Gram negativos é limitada.

O termo Gram positivo e Gram negativo refere-se a ação de corantes sobre a parede celular desses dois tipos de microrganismos. Bactérias Gram positivas possuem uma parede celular mais espessa, composta por várias camadas de glicopeptídeos, com proteínas e polissacarídeos inseridos. A parede celular das bactérias Gram negativas, por sua vez é mais fina, no entanto é estruturalmente mais complexa: possui uma única camada de glicopeptídeos, uma membrana externa com constituição similar a membrana citoplasmática, e uma camada de lipopolissacarídeo (LPS) que são glicolipídios complexos que conferem resistência às bactérias (KONEMANN *et al.*, 2001).

O possível mecanismo da ação antibacteriana e antifúngica da própolis é devido a inibição da divisão celular. Segundo esta teoria, a própolis age na inibição da replicação do DNA e indiretamente na divisão celular (MARCUCCI, 1995).

Outro mecanismo comprovado de ação da própolis é o efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática. A própolis e alguns de seus componentes possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora. Como o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial para a bactéria, por

manter a síntese de ATP, o transporte através da membrana plasmática e a motilidade, tal efeito pode, conseqüentemente, contribuir muito sobre toda a ação citotóxica da própolis, podendo ainda diminuir a resistência das células a outros compostos antibacteriano, e isso explica a maior sensibilidade frente aos microrganismos Gram positivos do que Gram negativos (STRADIOTTI JUNIOR *et al.*, 2004; ABUBAKAR *et al.*, 2014), já que a parede celular dos microrganismos Gram positivos é mais permeável, permitindo que agentes externos atinjam mais facilmente a membrana plasmática (KONEMANN *et al.*, 2001).

Fernandes Junior *et al.* (2006) afirmam que o mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos e segundo eles, a proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma.

A própolis também causa uma inibição dose-dependente da motilidade bacteriana. As bactérias tornam-se rapidamente imóveis na presença de 50 µg mL<sup>-1</sup> de própolis. O principal componente causador desta imobilidade é o CAPE (ácido cafeico feniletílico éster), porém o seu efeito é reversível. Também provocam inibição da motilidade, por ordem decrescente de eficiência a quercetina, naringerina e ácido cafeico (ABUBAKAR *et al.*, 2014).

Geralmente as pesquisas utilizam-se de extratos alcoólicos, preparados no próprio laboratório, ou comercialmente disponíveis. O extrato alcoólico é a forma mais consumida da própolis, e por isso, o mais estudado. Dos Santos *et al.* (2003), através de um estudo controlado, constataram que as melhores atividades encontradas para a própolis foram para as alcoolaturas entre 50 e 90%.

Maia Filho *et al.* (2008) realizaram um estudo onde foram preparados extratos hidroalcoólicos das amostras de própolis, em comparação a outros “antimicrobianos” conhecidos. A sensibilidade frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis* foi avaliada qualitativamente através de um teste de difusão em ágar, que demonstrou que o extrato de própolis foi mais efetivo do que o Hipoclorito de Sódio na concentração de 5%, um sanitizante amplamente conhecido e muito utilizado em hospitais e laboratórios.

Vargas *et al.* (2004), avaliaram 161 isolados bacterianos, sendo 81 Gram positivos e 80 Gram negativos. Dentre as 161 amostras bacterianas avaliadas, 109 foram sensíveis ao extrato de própolis, o que representou 67,70% do total pesquisado.

Pinto *et al.* (2001) avaliaram diferentes extratos de própolis verde sobre bactérias isoladas de leite de vacas com mastite. Os resultados demonstraram que houve efeito antimicrobiano do extrato etanólico da própolis sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Streptococcus agalactiae*. No entanto, o extrato não apresentou efeito antimicrobiano sobre os microrganismos Gram negativos testados. Também foi observado que microrganismos da mesma espécie, no entanto isolados de amostras diferentes apresentaram graus diferentes de sensibilidade ao extrato.

Vários estudos já foram desenvolvidos avaliando a atividade antifúngica e antimicrobiana da própolis. Longhini *et al.* (2007) obtiveram resultados promissores, que mostraram que a própolis apresenta atividade antifúngica mesmo em quantidades muito pequenas. Eles observaram a inibição de uma levedura até a diluição de 1:256 (cerca de 0,04 mg mL<sup>-1</sup>). Além disto, o teste realizado mostrou que os líquidos extratores não inibiram o crescimento fúngico.

A seguir, uma breve descrição de alguns microrganismos causadores de doenças em animais e vegetais que poderiam ser controlados com o uso de produtos naturais e necessitam de estudos inclusive com a própolis.

- *Staphylococcus aureus*

As cepas de *S. aureus* são cocos Gram positivos que, caracteristicamente se dividem em mais de um plano, formando aglomerados de células que lembram um cacho de uvas. São anaeróbios facultativos, catalase positivos e coagulase positivo. Não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído em temperaturas acima de 60°C. Sua temperatura ótima de crescimento é de 35 a 40°C, com limites de 7 a 45°C (SILVA *et al.*, 2010).

É o patógeno humano de maior importância entre os estafilococos. É encontrado no meio ambiente externo e em narinas anteriores de 20 a 40% dos adultos, além de pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina (KONEMANN *et al.*, 2001). É uma bactéria patogênica, cuja doença transmitida por alimentos (DTA) é classificada pela *International Commission on Microbiological Specifications for*

*Foods* (2002) no grupo de risco III (doenças de perigo moderado). Trata-se de intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. (KONEMANN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

- *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram positivo, não esporogênico, catalase positivo e não produtor de gás sulfídrico. Seu crescimento ótimo é entre 30 e 37°C, no entanto consegue se multiplicar em temperaturas que variam de 1 até 45°C (SILVA *et al.*, 2010). É uma bactéria patogênica para o homem e outros animais, provocando doenças graves como encefalite, septicemia e aborto em bovinos, ovinos, caprinos e humanos. É encontrada em várias espécies de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e insetos, na maioria dos casos, portadores assintomáticos, que liberam a bactéria nas fezes sem desenvolver infecções. O reservatório primário é o solo e a vegetação, mas já foi encontrada na água, fezes, esgotos, plantas em decomposição e silagem (SILVA *et al.*, 2010).

Os sintomas incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite e infecção cervical ou intrauterina em gestantes que podem provocar o aborto ou nascimento prematuro. Também podem ocorrer endocardites, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos e lesões cutâneas. Essas desordens são precedidas por febre e sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. A taxa de letalidade em recém nascidos é de 30%; em adultos (sem gravidez) é de 35%. Os grupos susceptíveis são mulheres grávidas e fetos, indivíduos imunossuprimidos e idosos (INFORME-NET DTA, 2003).

- *Pseudomonas aeruginosa*

Os membros da família *Pseudomonadaceae* caracterizam-se como bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos; a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo oxidase positivos (SILVA *et al.*, 2010). A *P. aeruginosa* é o pseudomonídeo mais frequentemente isolado de amostras clínicas. É um patógeno oportunista, que causa infecções entre pacientes com queimaduras, leucemia, transplantados

etc. Também está envolvida com frequência em infecções do trato urinário e respiratório inferior, que podem ser bastante graves e colocar a vida do paciente em risco (KONEMANN *et al.*, 2001).

- *Salmonella Typhimurium*

*Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. As Salmonelas são o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceas* com mais de 2200 sorotipos descritos no esquema de Kaufmann-White (KONEMANN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

Métodos moleculares demonstram que o gênero *Salmonella* compreende apenas duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. A subespécie *enterica* corresponde por 95% dos isolados de *Salmonella*. Cada subespécie é subdividida em sorovares, definidos com base nos antígenos capsulares (O) e flagelares (H) que possui. (GRIMONT; WEILL, 2007). As salmonelas são mais comumente nomeadas pelo seu gênero, seguido do sorovar, ocultando-se a informação da espécie e subespécie. Por exemplo, o sorovar *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Typhimurium* é comumente encontrada na literatura como *Salmonella Typhimurium*.

As infecções humanas produzidas por salmonelas em geral ocorrem por ingestão de alimentos ou água contaminados. Os sintomas podem variar de gastroenterites leves até bacteremias e septicemias com sintomas gastrointestinais e febre entérica. A sintomatologia variada é atribuída as diferentes cepas causadoras da infecção, algumas com sintomas mais brandos e outras até letais (SILVA *et al.*, 2010).

Orsi *et al.* (2006) investigaram um possível efeito sinérgico entre extratos etanólicos de própolis e alguns antibióticos, contra a *Salmonella Typhi*. Eles utilizaram extratos de própolis provenientes do Brasil e da Bulgária. Constataram que ambos foram bastante eficientes e apresentaram sinergismo com os antibióticos testados, porém, o extrato proveniente da Bulgária mostrou-se mais eficiente que o extrato brasileiro.

- *Candida albicans*

A candidíase é a infecção fúngica mais comum, sendo o fungo *C. albicans* a espécie de levedura isolada com maior frequência a partir de amostras biológicas (LIMA *et al.*, 2006; KONEMANN *et al.*, 2001). Apesar de não estar associada com altos índices de mortalidade, essa patologia contribui muito para aumentar o tempo de internação e os custos para tratamentos, principalmente de pacientes imunodeprimidos (SCORZONI *et al.*, 2007).

As espécies de *Candida* são conhecidas por desenvolverem resistência rapidamente a muitos antibióticos conhecidos, o que torna seu tratamento difícil. Portanto é muito importante a busca por novos compostos que auxiliem no tratamento das patologias associadas a esses microrganismo (DARWISH *et al.*, 2009).

- *Lasiodiplodia theobromae*

*L. theobromae* é um ascomiceto prevalente em regiões de clima tropical e subtropical. É causador de cancrios, pericímio e podridão radicular em mais de 500 espécies, incluindo culturas perenes, frutas, verduras e plantas ornamentais (ÚRBEZ-TORRES *et al.*, 2008). Sobrevive na atmosfera, nos tecidos vegetais vivos ou mortos, sendo disseminado pelo vento, insetos e instrumentos de poda. Temperaturas altas, com média em torno de 28°C, umidade relativa próxima de 60% e precipitação pluviométrica de, aproximadamente, 15 mm favorecem o seu desenvolvimento (TAVARES, 2002).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especialização patogênica. Constantemente associado a infecções em plantas estressadas e com ferimentos naturais ou provocados. É considerado um patógeno fraco, mas nos últimos anos tem se tornado importante para diversas culturas, dentre as quais destacam-se manga, coco, caju entre outras. Possui grande capacidade de infectar frutos, o que o coloca como um dos mais eficientes patógenos disseminados através de sementes e causador de problemas pós-colheita (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006).

### **2.5.2. Atividade Antimicrobiana e Sazonalidade**

Para tentar confirmar a hipótese do efeito da sazonalidade da própolis, Silva *et al.* (2006), conduziram um estudo na Paraíba, no qual foram realizadas três colheitas, retiradas da mesma colmeia com variação no período: colheita 1: julho a setembro de 2001, colheita 2: setembro a dezembro e colheita 3: dezembro a janeiro. Essas amostras apresentaram diferenças nos parâmetros bromatológicos estudados (umidade, cinzas, resíduos insolúveis, ceras, sólidos insolúveis, fenóis, flavonoides e índice de oxidação). Os resultados demonstraram que há interferência direta da estação do ano sobre as características do produto. Observou-se que as própolis amostradas em períodos de maior precipitação apresentaram valores menores de ceras, e conseqüentemente, maiores para os compostos bioativos. Isso ocorre pois nesse período, as abelhas encontram menor disponibilidade de resinas nas plantas, e conseqüentemente, produzem mais ceras para vedar as colmeias.

Castro, Cury e Rosalen (2007) realizaram um estudo para caracterizar quimicamente a própolis coletada no interior da Bahia, e no interior de Minas Gerais. Concluíram que as duas própolis apresentaram constituição química diferente. Posteriormente, foram coletadas amostras destas própolis diferentes no verão e inverno, e realizada a análise para verificação da atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*. Para as duas amostras, observou-se aumento da atividade antimicrobiana nas amostras coletadas na estação seca em comparação as amostras coletadas na estação de chuvas. No entanto, a atividade antimicrobiana na amostra coletada no interior de Minas Gerais é atribuída a alta concentração de flavonoides, enquanto que a amostra coletada na Bahia apresentou baixa concentração destes compostos, mas mesmo assim uma atividade antimicrobiana aumentada.

### **2.6. Utilização de Produtos Naturais em Substituição aos Agrotóxicos**

Nos últimos anos, vem crescendo no Brasil e no mundo, a demanda por alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos (BARBOSA; SOUZA, 2012). O principal motivo, segundo Campanhola e Valarini (2001) é a preocupação do consumidor com a sua saúde, e com os riscos que a ingestão de alimentos contaminados com resíduos traz ao seu organismo. Outra preocupação

crescente dos consumidores é com relação a produção sustentável de alimentos, com o mínimo possível de agressão ao meio ambiente.

Na busca por novas alternativas aos agrotóxicos utilizados para combater a ação de fungos fitopatogênicos, o manejo integrado de doenças e a agricultura orgânica vem ganhando espaço. O uso de produtos naturais como óleos vegetais, óleos essenciais, extratos de plantas, produtos homeopáticos entre outros, vem crescendo e abrindo portas para a pesquisa de novas fontes naturais (CHANG *et al.*, 2008; NEGREIROS, 2010).

No entanto, uma consequência preocupante do aumento da demanda por produtos biológicos é o surgimento de grande número de pequenas empresas cujo intuito é colocar agentes de controle biológico no mercado, muitas vezes sem uma validação científica, regulamentação e controle de qualidade adequados para a comercialização, o que acaba colocando em cheque a credibilidade do produto. Por outro lado, essa vertente também gera grandes oportunidades de integração entre empresas, produtores e universidades, com o intuito de desenvolver novos produtos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Neste contexto, o Brasil se destaca pela riqueza de sua flora, fauna, diversidade climática e extensões territoriais. O país, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento sustentável e econômico diante dessa nova necessidade do mercado, com o apoio das instituições de pesquisa, que irão fomentar esse novo mercado.



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, Treforest, v. 1, n. 2, p. 23-28, 2009.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recente advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Les Ulis, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Les Ulis, v. 29, n. 4, p. 361-367, 1998.

BARBOSA, W. F.; SOUZA, E. P. Agricultura orgânica no Brasil: características e desafios. **Revista Economia e Tecnologia**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 67-74, 2012.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 69-101, 2001.

CARVALHO, L. A.; NOVAES, P. L.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R. MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Sistemas de Produção de Leite – Cerrado. **Sistemas de Produção**, n. 2. 2002. Online. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/introducao.html>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed., Florianópolis: Editora UFSC, 2010, p. 519-536.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHANG, H. T.; CHENG, Y. H.; WU, C. L.; CHANG, S. T.; CHANG, T. T.; SU, Y. C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Chalocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, s.l., v. 99, p. 6266-6270, 2008.

DARWISH, R.; FARES, R. A.; ZARGA, M. A.; NAZER, I. Antifungal activity of Jordanian propolis on different resistant and standard species of *Candida Mellifera*, Ankara, v. 9, n. 18, p. 23-32, 2009.

DOS SANTOS, C. R.; ARSENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Própolis: 100 anos de pesquisa e perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 13, supl., p. 71-74, 2003.

FARNESI, A. P. **Efeitos das própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microrganismos**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellífera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 171-178, 2006.

GAO, W.; WU, J.; WEI, J.; PU, L.; GUO, C.; YANG, J.; YANG, M.; LUO, H. Brazilian green própolis improves immune function in aged mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Kyoto, v. 55, n. 1, p. 7-10, 2014.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES, J. A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brasil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9 ed. Paris, Institute Pasteur, 2007. 167p.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganisms in Foods 5: Microbiological Specification of Food Pathogens**. London, Blackie Academic & Professional, 1996. 514p.

INFORME-NET DTA, 2003. *Listeria monocytogenes* / listeriose. **Manual das doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE, Secretária do Estado da Saúde de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1465p.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

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**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

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

MAIA FILHO E. M.; MAIA, C. C. R.; BASTOS, A. C. S. C.; NOVAIS, T. M. G. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 21-25, 2008.

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

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERES, 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**, s.l., v. 74, p. 105-112, 2001.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. 1. Ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 07-14.

NEGREIROS, R. J. Z. **Controle da antracnose na pós-colheita de bananas 'nanicão' e 'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais**. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–SP, 2010.

ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; JUNIOR, A. F.; BANKOVA, V. Sinergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella Typhi*. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 108-112, 2006.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

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

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 572-578, 2006.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. L.; PERREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 391-397, 2007.

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; DOS SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010. 624p.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 84-89, 2008.

SOUZA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

STRADIOTTI JUNIOR, D. S.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004.

TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 46-52. 2002.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 4, p. 519-529, 2008.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed., Florianópolis: Editora UFSC, 2010, p. 577-614.

#### 4. ARTIGO 1

### PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE

**RESUMO:** A própolis da *Apis mellifera* é um material resinoso e balsâmico, cujas propriedades terapêuticas são amplamente discutidas e pesquisadas. Seus efeitos biológicos estão relacionados a sua composição química, e esta sofre grande interferência da floração e da sazonalidade. Por isso própolis de regiões diferentes possuem composição diferente. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade sobre a constituição química, propriedades físicas e potencial antimicrobiano da própolis verde coletada em Campo Grande – MS, em diferentes épocas do ano. Foram realizadas as análises de umidade, ceras, cinzas, concentração de flavonoides e compostos fenólicos, e a atividade antimicrobiana pelos testes de Inibição por Difusão em Poço e Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos indicaram variação significativa na composição química da própolis relacionada ao mês de coleta. Também foi observado variação significativa nos testes antimicrobianos confirmando a hipótese inicial do efeito da sazonalidade sobre a constituição e efeito biológico.

**Palavras-chave:** atividade antibacteriana; perfil bromatológico; épocas de coleta.

## PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF GREEN PROPOLIS IN FUNCTION OF SEASONALITY

**ABSTRACT:** Propolis is a resinous material produced by bees from plant exudates and saliva. Propolis collected in different geographic regions and different times of the year have different constitution and therefore, different biological properties too. The aim of this study was to evaluate the chemical composition, the physical properties and the antimicrobial effect of green propolis collected in Campo Grande – MS, at different times of the year. Analyses of waxes, ash, moisture, flavonoid and phenolic compounds it was performed. We also made the antimicrobial activity tests by the methods “Inhibition by Diffusion in Well” and “Minimal Inhibitory Concentration” (MIC) against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The results indicated significant variation in chemical composition of propolis as the month of collection. In addition, significant variation was observed in antimicrobial tests. The results confirm the initial hypothesis that seasonality has an effect on the composition and biological effects of propolis.

**Keywords:** antibacterial activity; bromatological profile; time of collect.

#### 4.1. Introdução

A própolis de *Apis mellifera* L., é um produto resinoso, produzido a partir de material coletado de várias espécies de plantas. Possui um odor aromático agradável e coloração amarela esverdeada a marrom escura, dependendo de sua origem e época de coleta (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; GENÇAY; SALIH, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2010; TORETI *et al.*, 2013).

Diversos estudos relatam a variabilidade farmacológica e as diversas ações biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, antimicótica, antiespasmódica, anestésica e imunomodulatória (BANKOVA, 2009; GENÇAY; SALIH, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2010; TORETI *et al.* 2013). No intuito de caracterizar sua composição química, tanto orgânica quanto inorgânica, e encontrar os compostos ativos responsáveis pelas suas ações biológicas, muitas pesquisas com amostras de própolis são conduzidas (GONSALES *et al.*, 2006). Segundo Gençay e Salih (2009) alguns compostos da própolis podem ter efeitos sinérgicos sobre os outros.

As propriedades biológicas da própolis variam de acordo com a época do ano de sua produção, com o tipo de florada e com as condições climáticas. Amostras coletadas em diferentes regiões geográficas e em diferentes épocas do ano apresentam a composição química diferente (GONSALES *et al.*, 2006).

No Brasil, as própolis foram classificadas em 12 grupos distintos de acordo com suas características físico-químicas (PARK *et al.*, 2000a). Atualmente foi descoberto um novo grupo, classificado como grupo 13 (G13), encontrado na região Nordeste do Brasil (TORETI, 2011).

A própolis coletada nas regiões Sudeste e Centro-Sul do Brasil, chamada de própolis verde, é produzida principalmente a partir dos gomos do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* DC) (BANKOVA, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2010). Foi identificado que nesse tipo de própolis produzida em regiões tropicais, os principais metabólitos com ações biológicas são os flavonoides, ácidos c-cumáricos prenilados e lignanas. Ambos pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse como infecções, ferimento, radiações UV, dentre outras. Possuem anel aromático com um ou mais substituintes



hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Dentre os compostos fenólicos existentes destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (TORETI, 2011).

Atualmente, 30% dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais. Nesse sentido, grande número de plantas e produtos tem sido investigados em seu potencial farmacológico, principalmente na capacidade antimicrobiana, devido ao problema crescente de resistência aos medicamentos halopáticos já existentes (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Os métodos de *screening* mais utilizados para avaliar o potencial de atividade antimicrobiana de extratos vegetais são os testes de difusão em ágar, no qual o microrganismo é desafiado contra a substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada, e os testes de diluição em caldo no qual é determinada a menor quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo teste (OSTROSKY *et al.*, 2008, COS *et al.*, 2006). Esses testes são muito utilizados na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes (SILVEIRA *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008; COS *et al.*, 2006).

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar a influência da sazonalidade sobre a composição físico-química e o efeito antimicrobiano do extrato de própolis verde, coletado em região de Cerrado, em Campo Grande – MS, sobre microrganismos comumente causadores de patologias associadas ao consumo de alimentos.

## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Coleta da Própolis**

A própolis foi coletada na Fazenda Escola Três Barras da Universidade Anhanguera-UNIDERP em Campo Grande - MS (S 20° 34' 04" W 54° 32' 16"). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, situa-se na faixa de transição entre o sub-tipo Cfa – mesotérmico úmido sem estiagem, em que a

temperatura do mês quente é superior a 25°C, tendo o mês seco mais de 30 mm de precipitação, e o sub-tipo Aw – tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. Tendo como base o local da coleta, as amostras foram classificadas como própolis verde. A flora da área onde as amostras foram coletadas apresenta 44 espécies com potencial apícola, distribuídas em 13 famílias, sendo a família Asteraceae a mais representativa, com 13 espécies, entre as quais o Alecrim do Campo – *Baccharis dracunculifolia* D.C.- (SCHLEDER *et al.*, 2007).

Para observar o efeito da sazonalidade nas características da própolis verde, foram escolhidas amostras decorrentes de meses das quatro estações do ano – primavera (setembro), verão (fevereiro), outono (abril) e inverno (julho). Foram selecionadas as três colmeias mais produtivas observadas na área, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de Própolis Verde por colmeia em cada época de coleta.

Estação	Mês/Ano	Colmeia – Produção em gramas		
		Colmeia 2	Colmeia 4	Colmeia 5
Inverno	Julho/2013	19,78	23,61	57,36
Primavera	Setembro/2013	9,73	10,18	x*
Verão	Fevereiro/2014	86,66	76,99	38,85
Outono	Abril/2014	x*	16,81	59,91

\* Não houve produção no mês de coleta.

#### 4.2.2. Análises Físicas e Químicas

Foram realizadas as análises físicas e químicas descritas no Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade – RTIQ da Própolis (BRASIL, 2001), com o objetivo de caracterizar as amostras e verificar se as mesmas atendem aos requisitos da legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a comercialização e consumo.

O delineamento experimental utilizado para as seguintes avaliações foi o inteiramente casualizado e os tratamentos corresponderam as diferentes épocas de coleta da própolis. Os solventes e reagentes foram de grau analítico e quando necessário as soluções foram previamente padronizadas (BACCAN, 2001).

- Preparo do Extrato Etanólico

O extrato etanólico bruto foi preparado conforme metodologia descrita por Park *et al.* (2002). Inicialmente foram pesadas 2,0 g da própolis bruta em béquer de 50 mL, e a este foram adicionados 15 mL de etanol absoluto (99%). A mistura foi mantida em banho-maria por 30 minutos, a 60°C, sob agitação constante. Decorridos 30 minutos, a mistura foi coletada em tubos de centrífuga e centrifugado a 7.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em frasco protegido da luz, e mantido sob refrigeração. Ao resíduo no béquer foi adicionado mais 15 mL de etanol absoluto e repetido o procedimento de centrifugação para coleta do sobrenadante. A concentração obtida foi de 2,0 g 30 mL<sup>-1</sup>.

- Perda por Dessecação – Secagem em estufa a 105°C

Foi utilizada metodologia adaptada de Funari e Ferro (2006). Foram pesados 200 mg da própolis bruta em cápsulas de porcelana previamente aquecidas em estufa a 105°C por uma hora, resfriada em dessecador e pesada em balança analítica. As amostras foram colocadas em estufa durante uma hora e, posteriormente, pesadas. Essa operação se repetiu até obter-se peso constante das amostras. O teor de umidade foi calculado através da razão entre o número de gramas de umidade sobre o número de gramas da amostra, expresso em porcentagem. A análise foi realizada em duplicata.

- Cinzas – Resíduo mineral fixo

Foi utilizada metodologia adaptada de Funarri e Ferro (2006). Em cadinhos de porcelana previamente aquecidos em forno mufla e pesados, pesou-se 200 mg de amostra de própolis bruta. Os cadinhos com a amostra foram colocados em forno mufla aquecido a 600°C por 4 horas, resfriados em dessecador e pesados. A operação foi repetida até obter-se peso constante. A análise foi realizada em duplicata. O teor de cinzas, expresso em porcentagem, foi obtido dividindo-se o número de gramas das cinzas pelo número de gramas da amostra.

- Cera

Foram pesadas 1,0 g de amostra em cartucho de Soxhlet e extraída em extrator Soxhlet utilizando-se o solvente n-heptano a uma temperatura de 60 -

80°C. O balão com o resíduo de destilação foi levado a estufa a 105°C durante uma hora, para total evaporação do solvente, e pesado em balança analítica. A operação de evaporação do solvente em estufa e pesagem foi repetida até obter-se peso constante. Foram realizadas duas repetições. O teor de ceras foi dado pela razão entre a massa de ceras obtida na extração sobre a massa da amostra. O valor foi expresso em porcentagem. Para esta análise utilizou-se metodologia descrita por Chaillou, Herrera e Maidana (2004).

- Índice de Oxidação

Para verificar a atividade de oxidação das amostras de própolis, três alíquotas de 5,0 mL do extrato etanólico da própolis verde por tratamento, preparados conforme descrito anteriormente, foram pipetadas em erlenmeyers e adicionadas de 100 mL de água destilada. A mistura foi agitada em agitador magnético e filtrada em papel filtro. 1,0 mL do filtrado de cada amostra foi transferido, separadamente, para tubos de ensaio de 5,0 mL. Foi adicionado 1,0 mL de água destilada, e agitou-se em agitador de tubos tipo vortex. A cada tubo de ensaio, foi adicionado 1,0 mL de ácido sulfúrico a 20% e novamente agitado em agitador de tubos vortex durante um minuto. Adicionou-se a cada tubo, uma gota do oxidante permanganato de potássio a 0,1 N. O tempo decorrido para que ocorresse o desaparecimento da cor rosa foi cronometrado, e corresponde a atividade de oxidação.

- Compostos Fenólicos (Qualitativo)

Foram pipetados duas repetições de 2,5 mL do extrato etanólico por tratamento em tubos de ensaio, sendo em seguida adicionados 0,5 mL de acetato de chumbo a 10%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 24 horas. Após este período, pode-se observar a formação de precipitado em algumas amostras, que caracteriza a presença dos compostos fenólicos.

- Compostos Fenólicos Totais (Quantitativo)

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Chaillou, Herrera e Maidana (2004). Foram misturados 0,5 mL de extrato etanólico de própolis com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de carbonato de cálcio a 14%. A

absorbância da reação foi lida a 760 nm após duas horas de incubação a temperatura ambiente no escuro. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, utilizando-se água no lugar da amostra de própolis. Esta análise foi realizada em triplicata. Como padrão foi utilizado o ácido gálico para construir uma curva de calibração.

- Determinação de Flavonoides (Qualitativo)

Para realizar esta análise, 1,0 mL do extrato etanólico de própolis foi transferido para um erlenmeyer de 50 mL e adicionado 10 mL de álcool etílico a 80%. Desta solução, foi pipetado 1,0 mL em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo foi adicionado 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio a 20%. A solução foi agitada em agitador de tubos, colorindo-se rapidamente para tons de amarelo/laranja, no caso da presença de flavonoides. No segundo tubo, foi adicionado 0,5 mL de acetato de chumbo a 10% e agitado em agitador de tubos. A solução colore-se de amarelo esverdeado e forma-se um precipitado, no caso de presença de flavonoides. Esta análise foi realizada em duplicata.

- Determinação de Flavonoides (Quantitativo)

Para a determinação de flavonoides, 0,5 mL de extrato etanólico da própolis foram misturados com 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado a 2% em metanol. A absorbância foi lida a 415 nm após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente no escuro. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém utilizando-se água no lugar do extrato de própolis. Esta análise foi realizada em triplicata. Para construção da curva padrão foi utilizada solução de quercetina ( $0,4-11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

- Determinação do pH

O potencial hidrogênio-iônico dos extratos foi lido utilizando-se phmetro (Digimed, DM-20). Para a leitura do pH, foi utilizado 10mL do extrato, e realizada leitura em duplicata.

- Condutividade Elétrica

A leitura da condutividade dos extratos (10 mL) foi realizada em duplicata, em condutímetro (Digimed, CE DM3), e os resultados expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

- Teor de Sólidos Solúveis (TSS)

O TSS dos extratos (10 mL), expresso em °Brix foi medido em refratômetro portátil (refratômetro digital RTD-45, Refractometer), com correção do valor lido em função da temperatura da amostra para a temperatura de 20°C.

#### 4.2.3. Atividade Antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana, foi utilizado o extrato bruto da própolis verde previamente preparado. Foram testados os microrganismos Gram Positivos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e Gram negativos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC 14028, além da levedura *Candida albicans* ATCC 14053. Foram utilizados os microrganismos em fase estacionária.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições por colmeia em cada época de coleta.

- Teste de Difusão por Difusão em Poço

Foi utilizada metodologia adaptada descrita por Ostrosky *et al.* (2008). Neste método, inicialmente o ágar foi semeado com auxílio de um swab, espalhando o inóculo por toda a superfície do ágar. Então, o meio foi perfurado e retirado com auxílio de um cilindro de 6,0 mm de diâmetro, formando poços, nos quais foram depositados 50 µL do extrato etanólico da própolis. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para as bactérias e a 25°C por 24 horas para o fungo. Após esse período, efetuou-se a leitura dos halos de inibição. O teste foi realizado em triplicata, e como controle negativo utilizou-se álcool 70%.

Para o teste de inibição por difusão em poço foram utilizados controles positivos com antibióticos comercialmente disponíveis e um controle negativo em branco. Para o controle positivo utilizou-se a penicilina G na concentração de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> e o clorafenicol na concentração de 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. O controle negativo foi o álcool 70%.

- Teste de microdiluição em caldo – Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de própolis frente aos microrganismos previamente escolhidos, foi utilizada metodologia de microdiluição em caldo, descrito por Koneman *et al.* (2001). Inicialmente, uma placa com 96 micro poços foi inoculada com 100  $\mu\text{L}$  de caldo, posteriormente foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do extrato da própolis, realizada a homogeneização e prosseguiu-se com a diluição seriada. Foram então adicionadas alíquotas do microrganismo a ser testado em suspensão. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para as bactérias e a 25°C por 24 horas para o fungo. Após esse período, verificou-se a turvação do meio, que demonstra crescimento dos microrganismos. A concentração inibitória mínima é a maior diluição do extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

Para o teste de CIM, a maior concentração testada foi 66,66mg/mL, e a menor foi de 0,52 mg mL<sup>-1</sup>. Foram utilizados como controle positivo os antibióticos Penicilina G na concentração de 0,0004 mg mL<sup>-1</sup> para as bactérias Gram Positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e Clorafenicol, na concentração de 0,003 mg mL<sup>-1</sup> para as Gram negativas (*S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*). Como controle negativo foi utilizado o álcool 70%, e foi realizado um controle branco, para demonstrar que a inibição se dá exclusivamente pelos compostos do extrato da própolis, e não pelo seu diluente.

#### 4.2.4. Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e, quando significativas, a comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para as análises estatísticas utilizou-se o software Assistat (SILVA, 2014).

### 4.3. Resultados e Discussão

As amostras da própolis *in natura* coletadas na região de Campo Grande – MS, apresentaram variação em relação à coloração e textura. As amostras obtidas nos meses de fevereiro, julho e setembro apresentavam-se verdes amarronzadas com textura dura e seca. Já a amostra coletada no mês de abril apresentou coloração esverdeada e textura pegajosa. A diferença na coloração

permaneceu após a preparação do extrato, conforme é demonstrado na Figura 1.



Figura 1. Extratos etanólicos das própolis coletadas em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos ensaios de umidade, cinzas e ceras das amostras de própolis coletadas nos meses de fevereiro, abril, junho e setembro, além dos valores de referência (BRASIL, 2001).

Pode-se observar que houve diferenças significativas entre as médias das colmeias de acordo com o mês de coleta. As variáveis umidade e cinzas apresentaram o mesmo comportamento, foram estatisticamente iguais nos meses de fevereiro, julho e setembro e se diferenciaram estatisticamente do mês de abril. Apenas a umidade, no mês de julho, apresentou valores superiores aos padrões de referência (BRASIL, 2001). De acordo com Silva *et al.* (2006) esses



fatores não sofrem influência dos índices pluviométricos, e são decorrentes das plantas utilizadas pelas abelhas para a colheita de resinas durante o ano.

Tabela 2. Valores médios de umidade, cinzas e ceras da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Umidade (%)	Cinzas (%)	Ceras (%)
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	7,65 a	1,43 a	17,95 c
Abril	3,43 b	0,43 b	58,70 a
Julho	8,42 a	1,48 a	31,68 b
Setembro	7,33 a	1,48 a	27,45 b
Valor de Referência <sup>(1)</sup>	≤8	≤5	≤ 25
Teste F	12,05**	16,34**	63,47**
DMS	1,78	0,33	5,57
CV (%)	13,11	13,47	8,93

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> Valores de Referência estabelecidos pela Instrução Normativa nº 03/2001, pelo MAPA (BRASIL, 2001).

O teor de cera não teve o mesmo comportamento. As amostras de julho e setembro foram iguais estatisticamente e se diferenciaram das amostras dos meses de fevereiro e abril. Apenas a amostra de fevereiro atendeu a legislação vigente, as demais apresentaram valores superiores a 25%. Os menores teores de cera ocorreram em fevereiro, mês em que foram observadas a maior precipitação pluviométrica, temperatura média e umidade em relação aos demais meses.

Um elevado teor de cera ocorre normalmente no período de inverno em relação ao período de verão para vedação da colmeia. Isso se justifica pois nos períodos de inverno, geralmente períodos de estiagem, as abelhas encontram menos resinas nas plantas, sendo obrigadas a produzirem mais ceras para vedarem suas colmeias. Nos períodos de verão, com maior precipitação, a quantidade de resinas disponíveis nas plantas é novamente aumentado, e as abelhas diminuem a produção de ceras (FRANCO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2006).

Ainda com base na legislação brasileira, foram realizadas análises para a verificação da presença/ausência de flavonoides e compostos fenólicos, e no caso de presença, suas respectivas concentrações. A Tabela 3 demonstra que

com exceção das amostras coletadas no mês de abril, todas foram positivas para flavonoides e compostos fenólicos.

Tabela 3. Resultado da análise qualitativa de compostos fenólicos e flavonoides em própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

<b>Tratamentos</b>	<b>Grupos Fenólicos</b>	<b>Flavonoides (NaOH)</b>	<b>Flavonoides (Acetato de Chumbo)</b>
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	+	+	+
Abril	-	-	-
Julho	+	+	+
Setembro	+	+	+
Valor de Referência	+	+	+

Legenda: presença (+); ausência (-).

Na Tabela 4 estão os resultados da análise quantitativa para compostos fenólicos e flavonoides, e o índice de oxidação das amostras. As amostras dos meses de fevereiro e julho não diferem estatisticamente em relação a concentração de compostos fenólicos e estão dentro do padrão estabelecido na legislação. O mesmo pode-se afirmar da amostra do mês de setembro. Já na amostra do mês de abril, não foi detectada presença desses compostos.

As médias obtidas demonstram que, estatisticamente, a concentração de flavonoides das amostras de fevereiro e julho é igual, e juntamente com a amostra do mês de setembro, ficaram dentro do estabelecido pela legislação. A exceção é a amostra do mês de abril, que apresentou concentração de flavonoides bem abaixo das demais amostras, ficando fora do padrão estabelecido (BRASIL, 2001).

Tabela 4. Valores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides e índice de oxidação da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Compostos Fenólicos	Flavonoides	Índice de Oxidação
	%	%	Segundos
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	12,8 a	7,6 a	11,5 b
Abril	0,0 c	0,2 c	180,0 a
Julho	12,8 a	7,6 a	9,3 b
Setembro	8,8 b	5,1 b	15,7 b
Valor de Referência <sup>(1)</sup>	≥ 5,0%	≥ 0,5%	≤ 22,0
Teste F	11,49**	15,49**	335,54**
DMS	3,79	1,54	10,96
CV (%)	24,78	19,80	12,71

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> Valores de referência da legislação vigente (BRASIL, 2001).

Analisando estes resultados, é possível observar uma relação inversamente proporcional entre as concentrações de ceras e de flavonoides. As amostras com maiores concentrações de ceras são as que possuem menores teores de flavonoides. Franco *et al.* (2000) também observaram essa relação entre o teor de ceras e flavonoides. De acordo com Funari e Ferro (2006), a própolis é uma mistura complexa, e os seus principais componentes fenólicos não estão presentes na cera, logo um maior teor de cera implica em baixos teores dos princípios ativos, e conseqüentemente menor atividade biológica.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), a própolis é classificada quanto ao seu teor de flavonoides: baixo teor (até 1,0% m/m), médio teor (entre 1,0 e 2,0%) e alto teor (acima de 2,0%). Dessa maneira, as amostras obtidas nos meses de fevereiro, julho e setembro são consideradas de alto teor. Gonsales *et al.* (2006) obtiveram concentrações diferentes de flavonoides (0,05% – 0,63%) ao testar amostras provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo, o que são considerados valores baixos.

Sousa *et al.* (2007) determinaram o teor de flavonoides totais para amostras de própolis procedentes de São Paulo e Minas Gerais e os teores médios variaram entre 0,12 à 2,11%. Longhini *et al.* (2007) encontraram valores de 1,79% de flavonoides para própolis procedente do norte do Paraná, cujo

apiário está localizado no interior de uma reserva de eucaliptos e ao redor de uma mata nativa. Para Franco *et al.* (2000), que analisaram amostras da mesma região em diferentes épocas do ano, o teor de flavonoides foi de 1,72 à 5,52%.

Pode-se observar também que todas as amostras, com exceção das amostras do mês de abril, apresentaram índice de oxidação dentro do padrão estabelecido pela legislação. O índice de oxidação é o tempo em segundos de descoloração da solução de permanganato de potássio a 0,1 N pela ação dos compostos oxidantes presentes na própolis (CHAILLOU; HERRERA; MAIDANA, 2004), que é de até 22 segundos, de acordo com a legislação vigente, e indica a atividade antioxidante. Este tempo é inversamente proporcional a concentração de compostos fenólicos na amostra, ou seja, quanto maior a concentração desses compostos, menor será o índice. Estas informações estão em acordo com os valores obtidos para flavonoides e compostos fenólicos para os meses de fevereiro, junho e setembro.

A baixa atividade oxidante verificada no mês de abril também foi relatada nos estudos realizados por Sousa *et al.* (2007) ao avaliarem a própolis produzida na microrregião de Franca - SP e de Passos - MG que ficou entre 9,00 e 54,75 segundos, porém, inferiores ao valor obtido para o mês de abril neste trabalho, que foi de 180,0 segundos.

As diferenças significativas na composição das amostras coletadas nas diferentes épocas do ano podem ser justificadas pela sazonalidade. Conforme descrito na Tabela 5, houve variações nos volumes de chuvas, com precipitação elevada nos meses de fevereiro e setembro.

Tabela 5. Precipitações, temperaturas médias e umidades relativas do ar nos meses de coleta das amostras de própolis verde, em Campo Grande, MS.

<b>Tratamentos</b>	<b>Precipitação (mm/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>UR (%)</b>
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	110,80	26,00	71,93
Abril	49,40	25,10	68,03
Julho	51,00	20,76	57,65
Setembro	101,80	24,66	51,23

(FONTE: PCDs\_Inmet/Cemtec/Agraer/Seprotur - AGRAER, 2014).

Park *et al* (2000b), apontam que no Brasil há uma diversidade de própolis para cada região e esta diferença na composição química e no tipo de própolis decorre da precipitação pluviométrica de cada região, época da colheita e flora.

A diferença na composição química da própolis, como compostos fenólicos e flavonoides é explicada pelas diferentes planta da qual as abelhas coletaram o material resinoso que será utilizado para sua produção (CHAILLOU; HERRERA; MAIDANA, 2004). Nessas substâncias excretadas pelas plantas estão presentes seus metabólitos secundários, que são os responsáveis pela ação biológica da própolis (BANKOVA, 2005). Além disso, a sazonalidade também é um fator determinante, uma vez que fatores fenológicos, que são influenciados pelo ambiente, influenciam na biossíntese desses metabólitos secundários que são coletados pelas abelhas (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Há ainda o efeito que uma maior concentração de chuvas provoca na flora da região, lavando o néctar presente nas flores, alterando sua disponibilidade para a coleta das abelhas (SOUSA *et al.*, 2007).

Teixeira *et al.* (2010) estudaram a variação sazonal e composição química de amostras das própolis brasileiras de três localidades do Estado de Minas Gerais e observaram uma variação considerável no total de substâncias fenólicas nas amostras coletadas mensalmente no período de um ano, demonstrando o efeito da sazonalidade sobre sua composição química.

SOUZA *et al.* (2010a) avaliaram o efeito da sazonalidade sobre algumas características físico-químicas dos extratos alcoólicos da própolis obtida mensalmente, durante um ano, por diferentes técnicas em colmeias de abelhas *Apis mellifera* africanizada. Os resultados demonstraram que a variação na composição da própolis se deu pela florada utilizada pelas abelhas. Como o estudo foi realizado com apiários localizados em meio a florestas plantadas de eucalipto, fatores sazonais como chuvas e temperatura não alteraram a vegetação, portanto, não houve variação na composição química. Estes resultados indicam fortemente que a variação está condicionada diretamente a vegetação, e que a sazonalidade somente influencia quando provoca mudanças nesta.

Na Tabela 6 estão os valores médios encontrados para as análises de pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis, dos extratos de própolis preparados a

partir das própolis verdes coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho e setembro, para a realização dos ensaios *in vitro*.

Para o pH e para a condutividade elétrica não há um padrão estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001). Nas amostras avaliadas o pH ficou entre 5,2 a 5,5, resultados semelhantes foram registrados por Longhini *et al.* (2007) ao avaliarem extratos alcoólicos de amostras de própolis, na região de Iguatemi - PR, a 5 e 30%, o pH foi de 5,46 a 5,82. Os autores atribuem a acidez às características químicas da própolis e citam ainda que o pH ácido evita o ataque de alguns microrganismos nos extratos.

Tabela 6. Valores médios de pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis dos extratos da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Ph	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Sólidos solúveis (Brix)
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	5,7	64,9	19,0
Abril	5,2	44,3	18,3
Julho	5,5	46,8	18,5
Setembro	5,5	43,1	18,5

A condutividade elétrica neste experimento foi de 43,1 a 64,9  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , determinando que quanto maior a condutividade elétrica maior é a propriedade relativa da concentração de íons em uma solução em relação aos elementos presentes (BACCAN, 2001). Quanto maior a quantidade de sais minerais presentes na amostra maior será a condutividade elétrica, sendo esta uma característica muito utilizada para a determinação da origem botânica do mel de abelhas e está intimamente relacionada com o conteúdo de cinzas, pH, acidez, sais minerais, além da proteína e outras substâncias presentes no mel (SOUZA *et al.*, 2009). Com base nestas informações pode-se atribuir a amostras de própolis do mês de fevereiro maiores valores de pH em relação as demais amostras (menor acidez) e elevada concentração de íons dissolvidos em solução que pode ser de origem orgânica e/ou mineral.

Para a avaliação do efeito da sazonalidade sobre o potencial antimicrobiano da própolis, foram realizados dois testes: o teste da inibição por difusão em poço e o da concentração inibitória mínima (CIM) para cada extrato.

O teste de inibição por difusão em poço foi o escolhido entre os demais testes de difusão em ágar, pois foi demonstrado por Alves *et al.* (2008) e Silveira *et al.* (2009) ser o teste que possui resultados melhores, por propiciar maior facilidade de contato entre o microrganismo e a substância testada. Nas Tabelas 7 e 8 estão os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana da própolis.

Foram evidenciadas diferenças significativas entre as amostras dos diferentes meses. Foi possível demonstrar que as amostras dos meses de fevereiro, julho e setembro possuem uma inibição maior do que as amostras do mês de abril.

Tabela 7. Teste de inibição por difusão em poço para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Tamanho do halo de inibição (mm)				
	PA <sup>(1)</sup>	ST <sup>(2)</sup>	SA <sup>(3)</sup>	LM <sup>(4)</sup>	CA <sup>(5)</sup>
<b>Meses (M)</b>					
Fevereiro	12,9 Ac	20,2 Ab	18,3 Ab	25,1 Aa	11,1 Ac
Abril	6,5 Cb	10,3 Ba	6,7 Cb	6,0 Cb	6,3 Bb
Julho	12,2 Acd	19,9 Ab	13,3 Bc	23,8 Aa	10,4 Ad
Setembro	9,4 Bc	20,0 Aa	13,0 Bb	20,0 Ba	9,7 Ac
Branco	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Controle Positivo	25,0	20,0	27,0	29,0	20,0
Controle Negativo	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Teste F	6,06**	6,66*	17,71**	24,21**	6,27**
DMS	2,62	3,86	2,44	3,64	2,06
CV (%)	16,40	14,32	12,18	12,29	14,32

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> *Pseudomonas aeruginosa*; <sup>(2)</sup> *Salmonella Typhimurium*; <sup>(3)</sup> *Staphylococcus aureus*; <sup>(4)</sup> *Listeria monocytogenes*; <sup>(5)</sup> *Candida albicans*.

Alves *et al.* (2000) classifica o potencial antimicrobiano de extratos vegetais baseado no tamanho dos halos de inibição, em que, halos menores que 9 mm são considerados inativos; halos de 9 a 12 mm são ditos parcialmente ativos; halos de 13 a 18 mm, ativo; e finalmente, halos maiores que 18 mm, possuem potencial muito ativo. Assim, pode-se dizer que o potencial dos extratos testados variou de inativo a muito ativo. O extrato do mês de abril foi inativo para todos os microrganismos testados, com exceção da *S. Typhimurium* para a qual foi parcialmente ativo. Os extratos com maior potencial antimicrobiano foram aqueles coletados nos meses de fevereiro e julho.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Concentração inibitória mínima (mg mL <sup>-1</sup> )				
	PA <sup>(1)</sup>	ST <sup>(2)</sup>	AS <sup>(3)</sup>	LM <sup>(4)</sup>	CA <sup>(5)</sup>
<b>Meses (M)</b>					
Fevereiro	28,72 Ba	33,33 Ba	6,02 Bb	2,20 Bb	33,33 Ba
Abril	66,66 Aa	66,66 Aa	38,91 Ab	50,01 Aab	66,66 Aa
Julho	15,75 Cb	29,63 Ba	5,56 Bc	4,62 Bc	31,48 Ba
Setembro	22,93 BCb	27,78 Bab	6,94 Bc	3,13 Bc	38,89 Ba
Branco	> 66,66	> 66,66	> 66,66	> 66,66	> 66,66
Controle Positivo	0,003	0,003	0,0004	0,0004	0,0004
Controle Negativo	> 66,66	> 66,66	> 66,66	66,66	> 66,66
Teste F	58,24**	60,29**	34,81**	45,76**	33,74**
DMS	10,70	8,58	10,07	12,45	10,04
CV (%)	22,97	15,24	53,45	66,21	16,62

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> *Pseudomonas aeruginosa*; <sup>(2)</sup> *Salmonella Typhimurium*; <sup>(3)</sup> *Staphylococcus aureus*; <sup>(4)</sup> *Listeria monocytogenes*; <sup>(5)</sup> *Candida albicans*.

O tamanho do halo de inibição também variou de acordo com o microrganismo testado. Houve diferenças estatísticas entre os microrganismos testados, para cada concentração. No entanto, ao contrário do demonstrado por outros autores, não é possível relacionar a inibição com a característica da parede celular do microrganismo, pois bactérias do mesmo grupo (Gram Positivas e Gram negativas) apresentaram reações diferentes. O mesmo pode ser afirmado sobre a diferença entre as bactérias e a levedura testada. Fungos leveduriformes possuem a parede celular com constituição semelhante à das bactérias Gram positivas (KONEMANN *et al.*, 2001). No entanto, através deste teste, essa relação não foi observada.

Os extratos das amostras dos meses de fevereiro, julho e setembro demonstraram uma inibição significativamente maior do que os extratos do mês de abril, cuja inibição só ocorreu na maior concentração testada, com exceção dos microrganismos *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Também pode ser observado que a CIM é menor para os microrganismos Gram positivos (*S. aureus* e *L. monocytogenes*), demonstrando que a parede celular desses microrganismos é mais sensível ao efeito dos extratos testados. Foi observada diferença estatística entre os microrganismos Gram positivos e Gram negativos, e a levedura estudada apresentou resultados estatisticamente



semelhantes aos das bactérias Gram positivas. Temiz *et al.* (2011) observaram efeito semelhante analisando diferentes amostras de própolis sobre o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, e consideraram a inibição sobre a *Salmonella Enteritidis* (Gram negativo) como fraca, quando comparada a *Listeria monocytogenes* (Gram positivo). Em estudo realizado com amostras de própolis coletadas em Dourados-MS foi demonstrada atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *C. albicans* com CIM 3,1 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto o extrato não inibiu o crescimento da bactéria *E. coli* (CAMPOS *et al.*, 2014).

Segundo Valverde (2011) as bactérias Gram negativas são mais resistentes a ação do extrato da própolis, pois possuem uma menor permeabilidade da sua parede celular, o que é explicado pela sua composição. Bactérias Gram positivas possuem uma parede celular espessa, com várias camadas de peptídeoglicano, enquanto que bactérias Gram negativas possuem parede celular fina, mas muito mais complexa, com peptídeoglicano, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (KONEMANN *et al.*, 2001).

Os dois testes para avaliação do efeito antimicrobiano divergem pouco com relação a intensidade da reação sobre os diversos microrganismos testados, mas concordam com relação a não inibição das amostras dos meses de abril, demonstrando claramente que há influência da sazonalidade na atividade antimicrobiana da própolis.

Toreti (2011) demonstrou que as amostras de própolis que apresentaram as maiores atividades inibitórias quanto ao crescimento do microrganismo *S. aureus* foram aquelas que apresentaram maior concentração do composto fenólico artepelin C, o que foi demonstrado estatisticamente através da análise de correlação.

Sforcin *et al.* (2000) estudando o efeito da sazonalidade na atividade antibacteriana da própolis brasileira, observaram, nos testes *in vitro*, a atividade antimicrobiana das própolis coletadas nas quatro estações, sobre microrganismos isolados de infecções humanas, em que o crescimento de 13 bactérias Gram - positivas foi inibido em baixas concentrações da própolis enquanto bactérias Gram – negativas foram menos susceptíveis. Não foi observado efeito sazonal.

Em amostras da própolis brasileira coletadas em estação seca e estação chuvosa em um apiário localizado no Cerrado brasileiro não foram observadas

diferenças significativas no perfil de compostos fenólicos e nas concentrações de flavonoides totais nas amostras coletadas em diferentes estações (SANTOS *et al.* 2003). Os autores concluíram que não houve efeito da sazonalidade sobre a atividade inibitória da própolis.

A sazonalidade também alterou a composição de fenóis totais e conseqüentemente, a atividade bacteriana em amostras coletadas nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (CASTRO; CURY; ROSALEM, 2007). As amostras coletadas no período de inverno apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonoides, e conseqüentemente, maior atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana está diretamente ligada a concentração de compostos fenólicos e flavonoides nas amostras. Essa afirmação é embasada pelo fato de que foi demonstrado ausência desses compostos nas amostras colhidas nos meses de abril, que tiveram um efeito praticamente nulo sobre o crescimento dos microrganismos testados.

Os extratos metanólicos de própolis do trabalho realizado por Silva *et al.* (2006) obtiveram teor reduzido de flavonoides e conseqüentemente, não inibiram o crescimento de *C. albicans* e *S. aureus*. Isso demonstra que os demais compostos bioativos presentes nestas amostras não têm atuação antibiótica.

Gonsales *et al.* (2006) demonstraram uma correlação positiva entre a concentração de flavonoides e a atividade antibacteriana do extrato etanólico da própolis.

#### **4.4. Conclusões**

A sazonalidade oferece forte influência sobre a composição química da própolis, principalmente por modificar a vegetação que é utilizada pelas abelhas para a sua produção. Por alterar a composição química da própolis, a sazonalidade também possui efeito significativo sobre o efeito antimicrobiano sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras.

#### 4.5. Referências Bibliográficas

AGRAER. Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural. Centro de monitoramento de Tempo, do Clima, e dos Recursos Hídricos do Mato Grosso do Sul. **Boletins Meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.agraer.ms.gov.br/cemtec/index.php?inside=1&tp=3&show=2524>>. Acesso em: 06. maio 2014.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M. GRANT, T. S. M.; SMÔNIA, F. A.; SMÂNIA, J. A.; ZANCI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

BACCAN, N.; DE ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 250p.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, Treforest, v. 1, n. 2, p. 23-28, 2009.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recente advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Les Ulis, v. 31, p. 3-15, 2000.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº3 – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade dos outros Produtos Apícolas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. F.; BALESTIERI, J. B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidante and citotoxic activities of própolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, s.l., v. 65, p. 374-380, 2014.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudio del propoleos del Santiago del Estero, Argentina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 11-15, 2004.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, s.l., v. 106, p. 290-302, 2006.

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. Caracterização farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 9, n. 10 p. 1-10, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p.171-178, 2006.

GENÇAY, Ö.; SALIH, B. CG-MS analysis of propolis samples from 17 different regions of Turkey, four different regions of Brazil and one from Japan. **Mellifera**, Ankara, v. 9, n. 17, p.19-28, 2009.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES, J. A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brasil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Bacteriologia Básica, Conceitos de Virulência e Avanços Tecnológicos em Microbiologia Clínica: Generalidades. In: \_\_\_\_\_. **Diagnóstico microbiológico**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1465p.

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**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, Pelotas, n. 58, p. 2-7, 2000a.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; WANG, SH. K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Determinação das atividades citotóxica e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletados em diferentes regiões do Brasil. **Mensagem Doce**, Pelotas, v. 56, p. 2-5, 2000b.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; MAIA, A. B. R. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, s.l., v. 17, p. 285-289, 2003.

SCHLEDER, E. J. D.; BUENO, M. L.; SILVÉRIO, V. L.; AQUINO, G. N. R.; RIVABEN, R. C. Levantamento da diversidade da flora apícola na Fazenda Escola Três Barras/UNIDERP, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p.375-377, 2007.

SFORCIN, J. L.; FERNANDES J. R. A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, s.l., v. 73, n. 1 - 2, p. 243 - 249, 2000.

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. **ASSISTAT Software**: Statistical assistance, Versão 7.7 beta. 2014.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 17, p. 85-93, 2007.

SOUZA, E. A.; INOUE, H. T.; GOMES, S. M. A. FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Propriedade físico química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, s.l., v. 59, n. 228, p. 571-576, 2010.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C; ODA-ZOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O. A. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation , chemical composition and Antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v.7, n.3, p.307-315, 2010.

TEMIZ, A.; SENER, A.; OZKOK TUYLU, A.; SORKUN, K.; SALIH, B. Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 35, p. 503-511, 2011.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of Propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v. 2013, p.1-13, 2013.

TORETI, V. C. **Estudo da Influência da Sazonalidade sobre algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis de dois apiários do estado de São Paulo**. 2011. 126f. (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

VALVERDE, B. S. **Caracterização e avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de vidro bioativo dopado com própolis verde de *Apis mellifera***. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

## 5. ARTIGO 2

### POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE *Lasiodiplodia theobromae* EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE

**RESUMO:** A própolis da *Apis mellifera* L. é um material resinoso e balsâmico, cujas propriedades terapêuticas são amplamente discutidas e pesquisadas. Seus efeitos biológicos estão relacionados a sua composição química, e esta sofre grande interferência da florada e da sazonalidade. Por isso própolis de regiões diferentes possuem composição diferente. A busca crescente por opções naturais no controle de fungos que causam danos às culturas de alimentos, torna a própolis uma alternativa a ser pesquisada. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade sobre potencial antifúngico da própolis verde coletada em Campo Grande – MS sobre o fungo *Lasiodiplodia theobromae*, um importante patógeno que vem ganhando destaque na agricultura brasileira. Foram avaliados extratos etanólicos de própolis coletados em diferentes períodos do ano: inverno, primavera, verão e outono. A avaliação antifúngica foi realizada adicionando-se o extrato ao meio fundido e observando o índice de crescimento micelial. Também foram avaliadas as concentrações de flavonoides e compostos fenólicos das amostras. Os resultados demonstraram que os extratos possuem efeito fungistático sobre o fungo testado, pois alteraram o padrão de crescimento dos mesmos. No entanto, as concentrações testadas não foram suficientes para inibir o crescimento do fungo, tornando necessária a realização de novos estudos.

**Palavra-chave:** fitopatógenos, inibição do crescimento micelial, controle alternativo, época de coleta.

**ANTIFUNGAL POTENTIAL OF GREEN PROPOLIS IN THE CONTROL OF  
*Lasiodiplodia theobromae* IN FUNCTION OF SEASONALITY**

**ABSTRACT:** The *Apis mellifera* L. propolis is a resinous and balsamic material whose properties are widely discussed and researched. Its biological effects are related to its chemical composition. The chemical composition is largely influenced by seasonality, so propolis from different regions have different composition. The increasing search for natural options to control fungi that cause damage to food crops makes propolis an alternative to research. In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of seasonality on antifungal potential of propolis collected in Campo Grande - MS on the fungus *Lasiodiplodia theobromae*, an important pathogen that has been gaining attention in Brazilian agriculture. The study evaluated ethanol extracts of propolis collected in different seasons: winter, spring, summer and fall. The antifungal evaluation was performed by adding the extract to the melted medium and observing the mycelial growth index. In addition, the concentrations of flavonoids and phenolic compounds of the samples were evaluated. The results showed that the extracts have a fungistatic effect on the tested fungi, because there was change in its growth pattern. However, the concentrations tested were not sufficient to inhibit the growth of fungus, making it necessary to carry out further studies.

**Keywords:** phytopathogens, mycelial growth inhibition, alternative control, time of collect.



## 5.1. Introdução

Própolis é uma substância resinosa, produzida a partir de material coletado de várias espécies de plantas por abelhas de diversas espécies, entre elas a *Apis mellifera* L. Possui um odor aromático agradável e coloração amarela esverdeada a marrom escura, dependendo de sua origem e época de coleta (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; GENÇAY; SALIH, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2010; TORETI *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo que é utilizada como “material de construção” para vedar as colmeias, a própolis também é utilizada pelas abelhas por suas propriedades biológicas, protegendo-as contra ataques de fungos e bactérias e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1995; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; SILVA *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008; BANKOVA, 2009).

Mais de 300 substâncias já foram identificadas em diferentes amostras de própolis (KOC *et al.*, 2005; KUREK-GÓRECKA *et al.*, 2014) incluindo ácidos graxos, ácidos fenólicos, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, diidroflavonóis, chalconas) terpenos,  $\beta$ -esteróis, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos e naftalenos (MARCUCCI, 2001; KUREK-GÓRECKA *et al.*, 2014).

A própolis produzida nas regiões de cerrado brasileiro, que contém fragmentos da planta *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim do campo) é conhecida internacionalmente como própolis verde, e é reconhecida por suas atividades biológicas, principalmente antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (BANKOVA, 2005; FARNESI, 2007; BANKOVA, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2010). As atividades biológicas desse tipo de própolis são atribuídas principalmente à substâncias fenólicas como flavonoides, ácidos c-cumáricos prenilados e lignanas (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Devido ao clima tropical, no Brasil, a produção de própolis pelas abelhas ocorre durante o ano todo, diferentemente do que ocorre em regiões de clima temperado, onde as abelhas apenas produzem própolis no verão. Possivelmente, isso faz com que ocorra variação na composição química da própolis produzida nas diferentes estações do ano (BANKOVA *et al.*, 1998).

A própolis vem sendo amplamente utilizada na medicina popular há milênios, devido às suas características de panaceia (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2009; ABUBAKAR *et al.*, 2014) e cada vez mais pesquisas buscam trazer novos usos e desvendar seus mecanismos de defesa. O relato cada vez mais frequente de linhagens resistentes aos antifúngicos e antibióticos disponíveis no mercado torna necessária a investigação de outras substâncias (FARNESI, 2007).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais e aromáticas, obtidos a partir da flora nativa, têm indicado o potencial de controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas (ROZWALKA *et al.*, 2008).

O método mais utilizado para a avaliação antifúngica é o descrito por Auer e Bettioli (1986), na qual o extrato é adicionado ao meio de cultura específico para o cultivo de fungos. Após a solidificação do meio, este é semeado com um inóculo de 5,0 - 6,0 mm da colônia fúngica fresca. O meio é incubado, e o crescimento micelial é comparado com um teste controle, no qual o mesmo fungo é inoculado em meio sem o extrato a ser testado (MORAIS *et al.*, 2010; COSTA, 2011; LORENZETTI *et al.*, 2011; BRAGA, 2012).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno de grande importância para a fruticultura brasileira (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). É causador de cancos, pericídio e podridão radicular em mais de 500 espécies, incluindo culturas perenes, frutas, verduras e plantas ornamentais (ÚRBEZ-TORRES *et al.*, 2008). Tavares (2002) afirma que este fungo vem aumentando sua patogenicidade ao longo dos anos. Isso deve-se principalmente devido ao desmatamento e a destruição dos ambientes de monocultivo, que destroem a diversidade natural, restringindo as interações biológicas (ALTIERI, 2003).

Levando em consideração que a composição da própolis varia conforme a florada e época de coleta, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da sazonalidade sobre o crescimento de um importante fitopatógeno pós-colheita, o *Lasiodiplodia theobromae*, na busca por alternativas orgânicas de controle.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1. Coleta da Própolis

A própolis foi coletada na Fazenda Escola Três Barras da Universidade Anhanguera-UNIDERP em Campo Grande - MS (S 20° 34' 04" W 54° 32' 16"). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, situa-se na faixa de transição entre o sub-tipo Cfa – mesotérmico úmido sem estiagem, em que a temperatura do mês quente é superior a 25°C, tendo o mês seco mais de 30 mm de precipitação, e o sub-tipo Aw – tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. Para observar o efeito da sazonalidade nas características da própolis verde, foram escolhidas amostras decorrentes de meses das quatro estações do ano – primavera (setembro), verão (fevereiro), outono (abril) e inverno (julho). Foram selecionadas as três colmeias mais produtivas observadas na área, conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Quantidade de Própolis Verde por colmeia em cada época de coleta.

Estação	Mês/Ano	Colmeia – Produção em gramas		
		Colmeia 2	Colmeia 4	Colmeia 5
Inverno	Julho/2013	19,78	23,61	57,36
Primavera	Setembro/2013	9,73	10,18	x*
Verão	Fevereiro/2014	86,66	76,99	38,85
Outono	Abril/2014	x*	16,81	59,91

\* Não houve produção no mês de coleta.

### 5.2.2. Preparo do Extrato Etanólico

O extrato etanólico bruto foi preparado conforme metodologia descrita por Park *et al.* (2002). Inicialmente foram pesadas 2,0 g da própolis bruta em béquer de 50mL, e a este foram adicionados 15mL de etanol absoluto (99%). A mistura foi mantida em banho-maria por 30 minutos, a 60°C, sob agitação constante. Decorridos 30 minutos, a mistura foi coletada em tubos de centrífuga e centrifugado a 7.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em frasco protegido da luz, e mantido sob refrigeração. Ao resíduo no béquer foi adicionado mais 15mL de etanol absoluto e repetido o

procedimento de centrifugação para coleta do sobrenadante. A concentração obtida foi de 2,0 g 30 mL<sup>-1</sup>.

### 5.2.3. Atividade Antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica foi utilizado o extrato bruto da própolis verde, previamente preparado conforme metodologia descrita por Park *et al.* (2002). Utilizou-se o fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da podridão da haste. O fungo foi cedido pela Coleção de Culturas Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) contendo meio de cultivo, armazenado em tubos de ensaio na geladeira do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Anhanguera-Uniderp, onde foram previamente repicados para placa de Petri contendo meio de cultura BDA e incubado até atingir vigor máximo para realização dos testes.

#### • Preparo das diluições

Para o preparo das diluições, partiu-se do extrato bruto, com concentração de 2,0 g 30 mL<sup>-1</sup>. Foi preparada a solução 2, retirando-se 3,0 mL do extrato bruto, colocando-se em balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com etanol absoluto. A solução 2 possui uma concentração de 200.000 µg 100 mL<sup>-1</sup>. A partir da solução 2, preparou-se a solução 3: retirou-se 25 mL da solução 2, colocando-se em balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume com 5,0 µL de DMSO e o restante com a solução água destilada – etanol. Este é o extrato de trabalho, estando a uma concentração de 50 µg 100 mL<sup>-1</sup>.

A partir desta solução de trabalho, foram preparadas as demais concentrações:

- 500 µg 100 mL<sup>-1</sup> – 1,0 mL do extrato de trabalho em 99,0 mL de ágar BDA.
- 750 µg 100 mL<sup>-1</sup> – 1,5 mL do extrato de trabalho em 98,5 mL de ágar BDA.
- 1000 µg 100 mL<sup>-1</sup> – 2,0 mL do extrato de trabalho em 98,0 mL de ágar BDA.
- 1250 µg 100 mL<sup>-1</sup> – 2,5 mL do extrato de trabalho em 97,5 mL de ágar BDA.

Para avaliar a atividade antifúngica foram testados 20 tratamentos, em esquema fatorial 4 x 5, quatro épocas de coleta (fevereiro, abril, julho e setembro)

e cinco concentrações do extrato etanólico da própolis (500, 750, 1000 e 1250 µg 100 mL<sup>-1</sup>, mais controle sem o extrato).

- Inoculação do fungo

Com o ágar suplementado com o extrato, foram preparadas placas de Petri com 10 mL de ágar em cada. Para cada concentração, foram realizadas quadriplicatas. O fungo *Lasiodiplodia theobromae* foi inoculado sobre a superfície do ágar, e as placas incubadas em incubadora BOD a 25±1°C.

Também foram preparadas duas testemunhas: uma testemunha DMSO (dimetilsufóxido), e um testemunha pura, ou branco.

Diariamente foram realizadas as medições da superfície de crescimento do fungo, até que a testemunha alcançasse a borda das placas de Petri.

A avaliação do crescimento micelial foi feita pela média de duas medidas perpendiculares do diâmetro da fronteira micelial realizadas diariamente. A quantificação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada com base no percentual de inibição do crescimento (PIC), que mede a atividade de cada extrato sobre o avanço da fronteira micelial, conforme a equação abaixo, na qual  $D_c$  é o diâmetro da colônia na placa controle e  $D_t$  é o diâmetro da colônia na placa teste.

$$PIC(\%) = \frac{D_c - D_t}{D_c} * 100$$

Determinou-se a porcentagem da taxa de crescimento diário (TX), por meio da fórmula apresentadas a seguir:

$$TX = \frac{\text{Diâmetro Final da Colônia}}{\text{Número de Dias para Incubação}}$$

Os valores da porcentagem de crescimento médio dos patógenos de cada tratamento foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) conforme procedimento proposto por Campbell e Madden (1990).

#### 5.2.4. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonóides

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Chaillou, Herrera e Maidana

(2004). Para as análises de flavonóides foi utilizada metodologia adaptada de Funari e Ferro (2006).

### **5.2.5. Análises Estatísticas**

Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e, quando significativas, a comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e análise de regressão para as diferentes concentrações dos extratos. Para as análises estatísticas utilizou-se o software Assistat (SILVA, 2014).

### **5.3. Resultados e Discussão**

Os resultados dos ensaios demonstram que houve interação significativa entre os meses de coleta da própolis e as concentrações dos extratos testadas para a inibição do crescimento micelial de *L. theobromae* nos primeiros dias de crescimento (Tabela 10) e os desdobramentos das interações são apresentados a seguir.

Na Tabela 11 e Figura 2, verifica-se, para o primeiro dia de avaliação, que para as maiores concentrações (1000 e 1250 mg mL<sup>-1</sup>) a menor inibição do crescimento fúngico foi observada nos extratos oriundos da própolis coletada no mês de julho. Já na menor concentração do extrato, nos meses de fevereiro e setembro houve maior inibição do crescimento deste fungo. Para os meses de fevereiro e abril, a medida que as concentrações do extrato aumentam, tende a aumentar a inibição do crescimento micelial do fungo.

Tabela 10. Valores médios do diâmetro da colônia em ensaio "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (cm)		
	1º dia <sup>(1)</sup>	2º dia	3º dia
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	2,23	6,05	7,94
Abril	2,54	6,75	8,19
Julho	2,51	6,21	8,04
Setembro	2,33	6,40	8,09
Teste F	1,81 <sup>ns</sup>	3,77*	0,94 <sup>ns</sup>
DMS	0,35	0,49	0,29
<b>Concentrações da própolis (mg mL<sup>-1</sup>) (C)</b>			
0	2,84	7,34	8,04
500	2,53	6,39	8,24
750	2,37	6,23	8,04
1000	2,23	6,23	8,02
1250	2,28	5,98	7,91
Teste F	3,28*	8,64**	1,84 <sup>ns</sup>
DMS	0,50	0,68	0,42
<b>M x C</b>	1,95*	2,97**	1,43 <sup>ns</sup>
CV (%)	24,41	11,85	47,49

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo. <sup>(1)</sup> Dias após a instalação do teste.

Tabela 11. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no primeiro dia de avaliação do ensaio "*in vitro*" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Concentrações da própolis (mg mL <sup>-1</sup> ) (C)	Meses (M)			
	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro
0	2,84 a	2,84 a	2,84 a	2,84 a
500	2,34 b	2,64 a	2,80 a	2,30 b
750	2,50 b	2,79 a	2,07 d	2,23 c
1000	2,15 b	2,18 b	2,32 a	2,26 ab
1250	1,74 c	2,43 b	2,73 a	2,26 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se à comparação de tratamentos nas linhas.

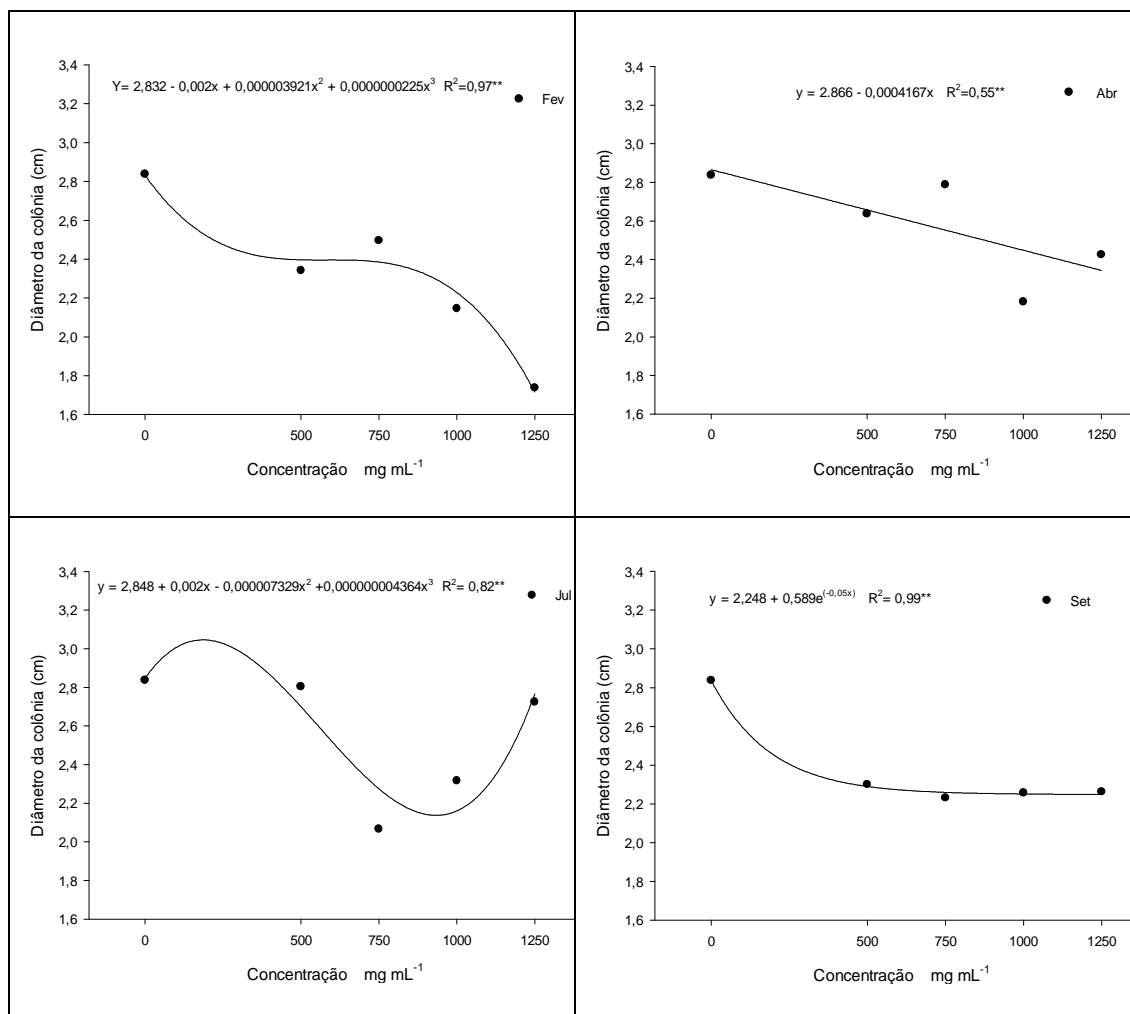


Figura 2. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no primeiro dia de avaliação do ensaio "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Tabela 12. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no segundo dia de avaliação do ensaio "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Concentrações da própolis (mg mL <sup>-1</sup> ) (C)	Meses (M)			
	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro
0	7,34 a	7,34 a	7,34 a	7,34 a
500	6,31 a	6,55 a	6,26 a	6,53 a
750	6,33 b	7,20 a	5,63 c	6,02 b
1000	6,11 a	6,50 b	6,16 a	6,24 a
1250	5,02 b	6,46 a	6,40 a	6,32 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se à comparação de tratamentos nas linhas.



Já no segundo dia de avaliação, Tabela 12 e Figura 3, no tratamento controle e concentração de 500 mg mL<sup>-1</sup> não foram observadas diferenças entre os meses de coleta na ação antifúngica do extrato da própolis, e, novamente, para os meses de fevereiro e abril, foram verificadas tendências de aumento da atividade antifúngica dos extratos com o aumento das concentrações. Pela análise de regressão, nos meses de julho e setembro os melhores resultados com relação a inibição do crescimento fúngico estariam em torno das concentrações de 750 e 1000 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

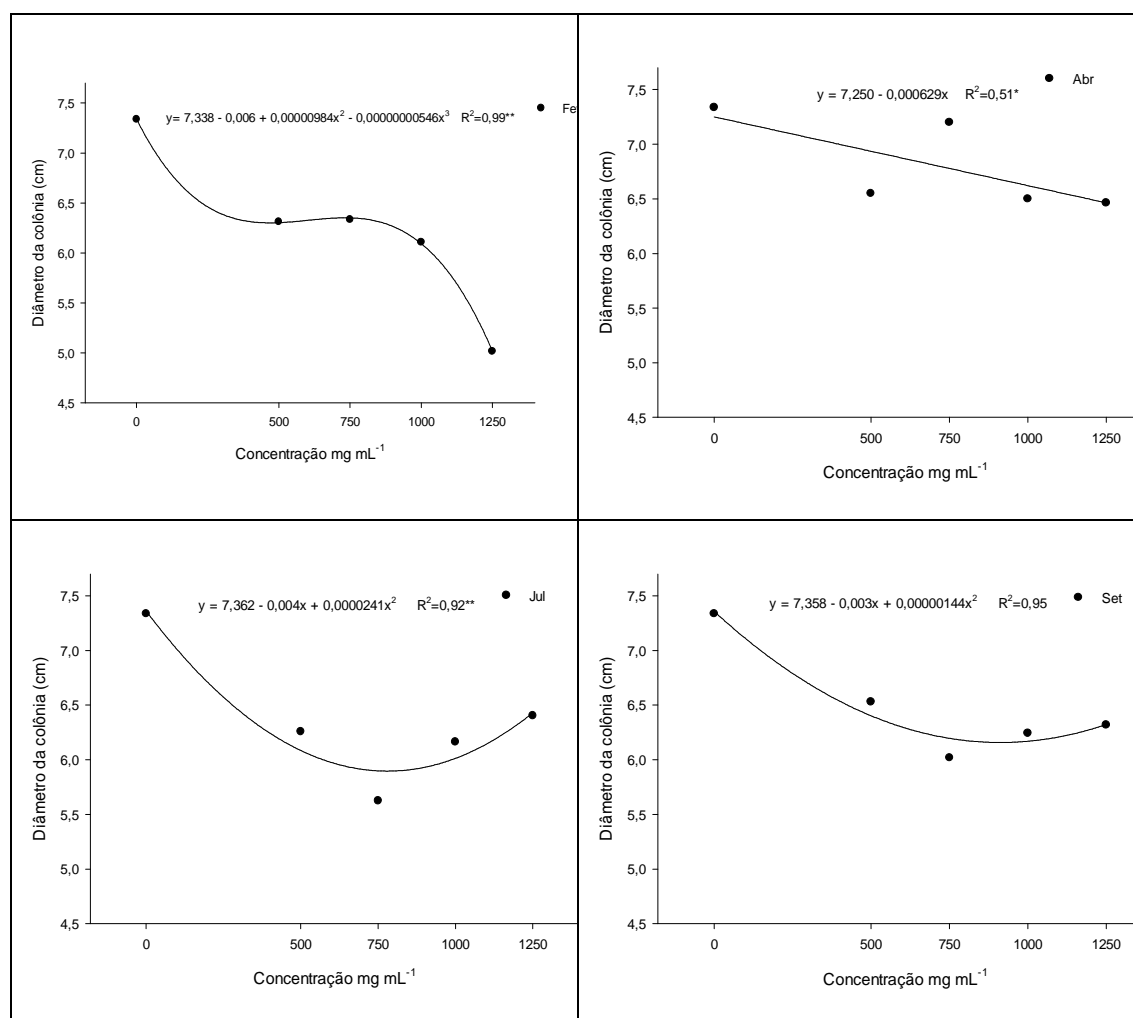


Figura 3. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para o diâmetro da colônia no segundo dia de avaliação do ensaio "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Nas Tabelas 13 e 14 e a Figura 4 estão outros resultados obtidos para a avaliar a ação das diferentes concentrações e extratos da própolis no

crescimento micelial de *L. theobromae*, porcentagem de inibição do crescimento (PIC), taxa de crescimento diário (TX) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Observa-se que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas e a sazonalidade sobre as variáveis PIC e TX.

Para a AACPD houve interação significativa entre concentrações e meses de coleta da própolis e o desdobramento dessa interação encontra-se na Tabela 13 e Figura 4. Para as concentrações de 500 e 1250 mg mL<sup>-1</sup> verifica-se para o mês de fevereiro o maior controle do crescimento micelial do fungo *L. theobromae*. Com o aumento das concentrações dos extratos, para os meses de fevereiro e abril, há uma tendência de redução do crescimento fúngico.

Tabela 13. Valores médios da porcentagem de inibição do crescimento (PIC), taxa de crescimento micelial (TX) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em ensaios "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	PIC (%)	TX (cm/dia)	AACPD
<b>Meses (M)</b>			
Fevereiro	4,32	2,67	134,17
Abril	1,34	2,76	146,00
Julho	3,12	2,71	138,32
Setembro	2,52	2,73	139,81
Teste F	0,94 <sup>ns</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	2,98*
DMS	3,51	0,10	8,65
<b>Concentrações da própolis (mg mL<sup>-1</sup>) (C)</b>			
0	3,15	2,70	153,90
500	0,68	2,78	141,88
750	3,14	2,71	137,79
1000	3,37	2,70	136,78
1250	4,69	2,66	133,46
Teste F	1,84 <sup>ns</sup>	1,88 <sup>ns</sup>	6,28**
DMS	5,05	0,14	12,21
<b>M x C</b>	1,43 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>	2,96**
CV (%)	203,08	6,42	9,69

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo. <sup>(1)</sup> Dias após a instalação do teste.

Tabela 14. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no ensaio "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Concentrações da própolis (mg mL <sup>-1</sup> ) (C)	Meses (M)			
	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro
0	153,90 a	153,90 a	135,90 a	153,90 a
500	139,28 b	144,80 a	142,22 a	142,34 a
750	140,46 b	153,53 a	127,41 c	133,63 cb
1000	134,50 a	139,25 a	136,51 a	138,14 a
1250	115,85 b	142,48 a	141,95 a	138,11 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas referem-se à comparação de tratamentos nas linhas.

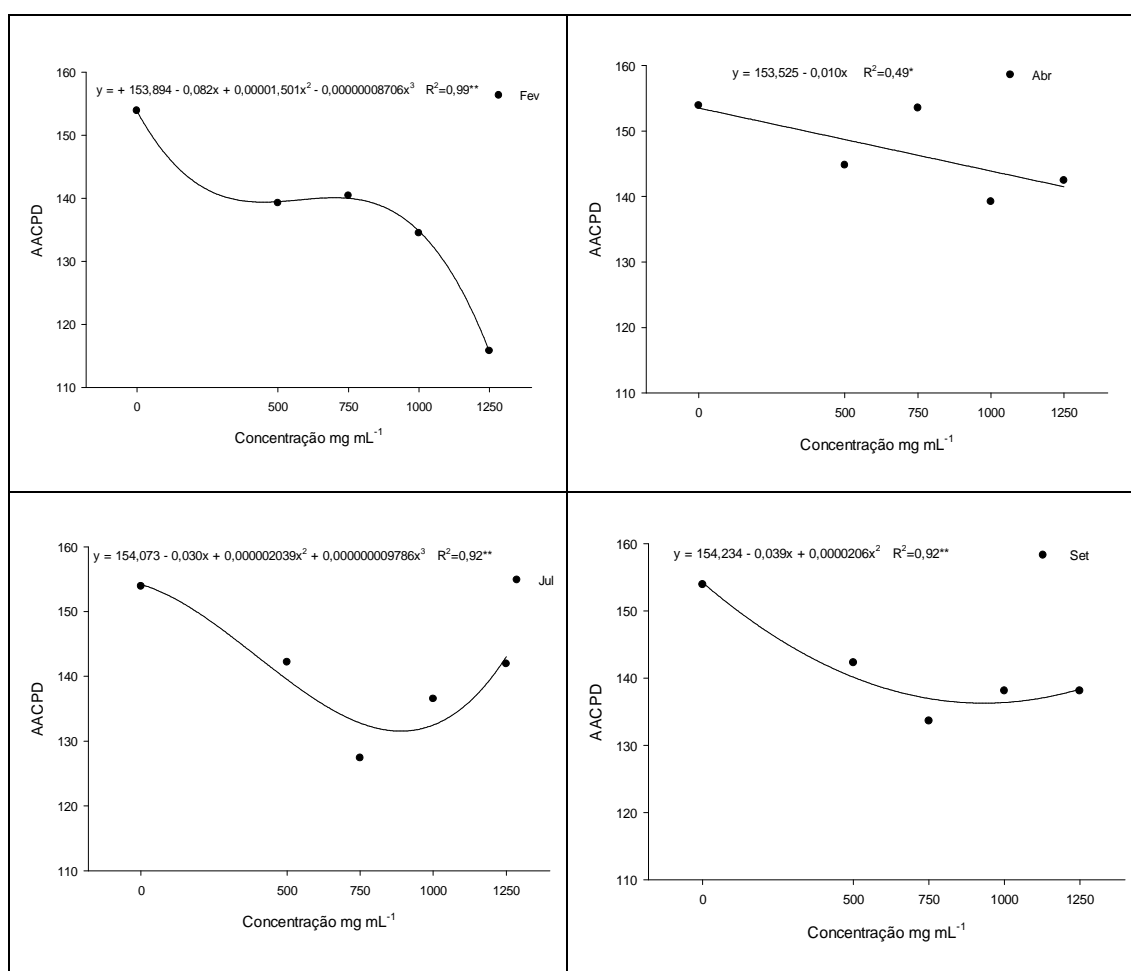


Figura 4. Desdobramento da interação meses x concentrações da própolis para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no ensaio "in vitro" da atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato da própolis verde, coletada em diferentes meses do ano, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Campo Grande, MS, 2014.

Analisando as figuras, é possível observar que cada extrato proporcionou uma curva padrão diferenciada no crescimento micelial e na AACPD. Estima-se

que essas diferenças possam ser melhor observadas através da utilização de concentrações mais elevadas dos extratos. Assim, extrapolando-se os dados, pode-se inferir que houve interferência dos extratos no padrão de crescimento do *Lasiodiplodia theobromae*.

Não foram encontradas na literatura, no entanto, referências bibliográficas que demonstrem o efeito do extrato da própolis sobre o crescimento de fungos, através desta metodologia de ensaio, portanto, não é possível a realização de comparações.

De um modo geral, o controle de infecções fúngicas depende inicialmente dos complexos e mecanismos de defesa de cada hospedeiro. Se a doença se instalar quando ocorrer falha destes, será necessário utilizar drogas fungicidas ou fungistáticas que atuem contra o patógeno, evitando danos ao hospedeiro (FARNESI, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados na busca de controle alternativo de fungos fitopatogênicos, utilizando-se extratos brutos e óleos essenciais de diversas plantas. Feitosa *et al.* (2000) verificaram a eficiência de plantas medicinais no controle de *Lasiodiplodia theobromae* “*in vitro*”. Foram testadas tinturas de juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.), e romã (*Punica granatum* L.) e o extrato bruto de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e sumo de babosa (*Haloé vera* L.) a 5%, 10% e 15%. A eficiência foi avaliada pela determinação da percentagem de inibição do crescimento micelial “*in vitro*” em BDA. O juá a 20% inibiu em 62% o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae*. O mecanismo de atividade antifúngica dos óleos essenciais e extratos de plantas está relacionada principalmente a presença de compostos fenólicos que são capazes de dissolver a membrana microbiana e penetrar no interior da célula (BRAGA, 2012).

Conforme demonstrado na Tabela 15, os extratos de própolis testados possuem elevada concentração de compostos fenólicos e flavonoides, com exceção do extrato coletado no mês de abril, o que pode ter causado a diferença no padrão de crescimento nos testes.

Tabela 15. Valores médios de compostos fenólicos totais, flavonoides da própolis verde coletada em diferentes meses do ano. Campo Grande, MS, 2014.

Tratamentos	Compostos Fenólicos	Flavonoides
	%	%
<b>Meses (M)</b>		
Fevereiro	12,8 a	7,6 a
Abril	0,0 c	0,2 c
Julho	12,8 a	7,6 a
Setembro	8,8 b	5,1 b
Valor de Referência <sup>(1)</sup>	≥ 5,0%	≥ 0,5%
Teste F	11,49**	15,49**
DMS	3,79	1,54
CV (%)	24,78	19,80

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> Valores de referência da legislação vigente (BRASIL, 2001).

Muitas atividades terapêuticas de fitoquímicos são creditadas aos compostos fenólicos biologicamente ativos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e outros. Além da bastante conhecida atividade antioxidante, os compostos fenólicos destacam-se também pela habilidade de se ligarem aos receptores celulares e a transportadores de membrana, de influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular, entre outras funções. Além da função antioxidante, existem muitos indícios que comprovam a ação antifúngica de compostos fenólicos e um dos mecanismos pela qual essa ação pode ocorrer é a inativação dos sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de compostos naturais (COSTA, 2011; CHEN, 2006).

A ação fungitóxica/fungicida dos extratos de própolis são atribuídos à presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres (KOC *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana da própolis pode ser resultado da atividade sinérgica de vários dos seus componentes (SIQUEIRA *et al.*, 2009; KUREK-GÓRECKA *et al.*, 2014).

O mecanismo sobre o qual os flavonoides agem sobre os microrganismos não é totalmente elucidado, sabe-se apenas que eles agem através da perturbação metabólica, desestabilizando os canais de íons da membrana plasmática (FARNESI, 2007).

#### 5.4. Conclusões

Pode-se concluir que os extratos testados possuem um potencial fungistático sobre essa espécie de fungo, pois alterou o padrão de crescimento. Também é possível afirmar que houve diferentes padrões de crescimento em cada extrato testado, demonstrando que a sazonalidade exerceu algum efeito. No entanto, os efeitos demonstrados foram pequenos e torna-se portanto necessário realizar outros testes com concentrações mais elevadas dos extratos, e também utilizar outras espécies fúngicas, para obter dados mais consistentes.

#### 5.5. Referências Bibliográficas

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

ALTIERI, A. M.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226p.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, Treforest, v. 1, n. 2, p. 23-28, 2009.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recente advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Les Ulis, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Les Ulis, v. 29, n. 4, p. 361-367, 1998.

BRAGA, D. O. **Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudio del propoleos del Santiago del Estero, Argentina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 11-15, 2004.

CHEN, X.; CUI, L.; DUAN, X.; MA, B.; ZHONG, D. Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral

administration. **Drug Metabolism and Disposition**, s.l., v. 34, n. 8, p. 1345-1352, 2006.

COSTA, M. A. L. **Extração de compostos com ação antifúngica de folhas secas de *Senna reticulada***. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

FARNESI, A. P. **Efeitos das própolis de abelhas africanizadas e meliponíneas em microrganismos**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FEITOSA, V. S.; PESSOA, M. N. G.; ALMEIDA, J. L.; SILVA, M. G. V. Efeito da tintura, extrato bruto e sumo de plantas medicinais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Macrophomina phaseolina* “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25 (Suplemento), p. 374-381, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 171-178, 2006.

GENÇAY, Ö.; SALIH, B. CG-MS analysis of propolis samples from 17 different regions of Turkey, four different regions of Brazil and one from Japan. **Mellifera**, Ankara, v. 9, n. 17, p.19-28, 2009.

KOC, A. N.; SILICI, S.; AYANGIL, D.; FERAHBAŞ, A.; ÇANKAIA, S. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Tricophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses**, s.l., v. 48, p. 205-210, 2005.

KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M.; STOJKO, J.; SOSADA, M.; SWIRCZEK-ZIEBA, G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 78-101, 2014.

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**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; JUNIOR, R. D.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerae* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 13 (especial), p. 619-627, 2011).

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

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

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERES, 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**, s.l., v. 74. p. 105-112, 2001.

MORAIS, M. S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A. C.; BELÉM, L. F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 5, n. 2, p. 89-98, 2010.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. **ASSISTAT Software**: statistical assistance, Versão 7.7 beta. 2014.

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; ABREU, S.; MAIA, R.; SOUZA-MOTTA, C. M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. Tricophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, s.l., v. 48, p. 90-96, 2009.

TAVARES, S. C. C. de H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.46-52. 2002.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and Antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v.7, n.3, p.307-315, 2010.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of Propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, s.l., v. 2013, p.1-13, 2013.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 4, p. 519-529, 2008.