



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos**



**REJANE PINA DANTAS SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS  
VERMELHA, VERDE E MARROM DO BRASIL OBTIDOS POR  
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E EXTRAÇÃO CONVENCIONAL**

**SALVADOR**

**2016**

**REJANE PINA DANTAS SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS  
VERMELHA, VERDE E MARROM DO BRASIL OBTIDOS POR  
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E EXTRAÇÃO CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez  
Coorientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Bruna A. Souza Machado

**Salvador**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada por: Rita de Cássia M. da Silva, CRB-5: BA-001697/O.

S581c Silva, Rejane Pina Dantas

Caracterização biológica de extratos de própolis vermelha, verde e marrom do Brasil obtidos por extração supercrítica e extração convencional/ Rejane Pina Dantas Silva. – Salvador, 2016.

89 f.: il. color.

Orientadora: Prof.º Dr.º Marcelo Andrés Umsza Guez

Co-orientadora: Prof. Dr.ª Bruna Aparecida Souza Machado

Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

Inclui referências.

1. Própolis. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. *T. cruzi*. 4. Potencial citotóxico. I. Faculdade de Farmácia. II. Guez, Marcelo Andrés Umsza. III. Machado, Bruna Aparecida Souza. VI. Título.

CDD: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

REJANE PINA DANTAS SILVA

### CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, VERDE E MARROM DO BRASIL OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E EXTRAÇÃO CONVENCIONAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 31 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez  
Universidade Federal da Bahia  
Orientador

Dr.ª Ana Leonor Pardo Campos Godoy  
Universidade Federal da Bahia

Dr. Ricardo Wagner Dias Portela  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o seu amor, por me conceder a sabedoria e coragem para acreditar, e por toda proteção para obter mais esta conquista.

Ao meu orientador Dr. Marcelo pela confiança e incentivo, e a minha coorientadora, Dra. Bruna Machado pela dedicação, por todo apoio prestado e pela orientação constante durante todo o trajeto para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao SENAI, na pessoa de Cleide Guedes, pelo suporte e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

A UFBA e ao PGAlí, pela oportunidade de me tornar mestre em Ciência de Alimentos.

Aos amigos do SENAI que tenho certeza serão para a vida inteira, Verônica, Samantha, Aline, Luana, Tainan, Leandro e Álvaro por todo o apoio e por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Às amigas mais que queridas Roseane Oliveira e Gabriele Abreu por toda ajuda prestada, vocês foram fundamentais para este trabalho se concretizar.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa de Alimentos e Bebidas do Cimatec.

Ao meu noivo Thiago Pinto pela compreensão dos momentos de estresse e ausência.

À minha irmã que acompanhou de perto minha caminhada, pelo suporte e incentivo durante todo o trajeto para concretização de mais um projeto em minha vida.

À minha querida mãe pelo amor incondicional, pelas palavras de carinho e por todas as orações para que eu alcance o sucesso sempre.

## RESUMO

A própolis é conhecida por suas distintas características biológicas e vem sendo extensivamente investigada na tentativa de resolver o problema da sua padronização, o que limita seu uso em indústrias de alimentos e farmacêuticas. O Brasil sempre foi evidenciado pela composição da sua própolis verde, porém a recente descoberta de um novo tipo de própolis, que apresenta uma coloração vermelha intensa e uma composição química distinta dos outros 12 tipos de própolis encontrados no país tem obtido destaque. A composição química da própolis depende de vários fatores, como origem geográfica, fontes de vegetais, estação do ano e clima de coleta. A biodiversidade encontrada no Brasil reflete a grande diversidade de composição das própolis brasileiras. Além disso, os processos de extração utilizados para obtenção dos extratos de própolis influenciam diretamente na composição final e na atividade biológica dos mesmos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico e citotóxico de extratos de própolis vermelha, verde e marrom de oito regiões geográficas do Brasil, obtidos por dois diferentes métodos de extração. As amostras de própolis foram extraídas pelo método convencional utilizando o etanol e também pelo método de extração supercrítica utilizando dióxido de carbono como fluido extrator. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto a sua atividade antioxidante pelo método ABTS, a atividade antimicrobiana frente a quatro bactérias e um fungo foi testada através do método de microdiluição em placas de 96 poços, a atividade antiparasitária foi medida pela inibição de células de *T. cruzi* após 24 e 96 horas de incubação e duas concentrações de extratos e por fim o potencial citotóxico foi avaliado frente à quatro linhagens celulares de tumores humanos pelo método MTT. Os resultados obtidos evidenciaram o potencial biológico dos extratos de própolis. Os extratos de própolis vermelha apresentaram as mais altas porcentagens de atividade antioxidante. Na avaliação da atividade antimicrobiana estes extratos demonstraram maior atividade antimicrobiana, para as bactérias *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, e *Klebsiella sp.*. Não foi observada atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* e para o fungo por nenhum dos extratos testados. Para ambos os ensaios, antioxidante e antimicrobiano, foi observado uma maior atividade dos extratos obtidos por extração convencional. Os resultados dos ensaios de atividade *in vitro* frente à cepa Y do *T. cruzi* mostraram que os extratos etanólicos inibiram as células nas primeiras 24 horas de incubação. O ensaio de *citotoxicidade in vitro* apresentou potencial citotóxico contra as quatro linhagens de células tumorais apenas para os extratos etanólicos da própolis vermelha. Apesar de todo este potencial biológico, ainda é incipiente a aplicação da própolis em produtos alimentícios e trabalhos tecnológicos (patentes) e científicos (artigos) comprovam esta afirmação. Assim, os resultados obtidos são bastante promissores e sugerem futuras pesquisas de aplicação dos extratos de própolis na indústria de alimentos e farmacêutica.

**Palavras-chave:** própolis, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, *T. cruzi*, potencial citotóxico.

## ABSTRACT

Propolis is well known for its biological properties, and has been extensively investigated to address the problem of standardization, which limits its use in food and pharmaceutical industry. Brazil is known for its green propolis, however a recent discovery of a novel type of propolis, which has an intense red color and a distinct chemical composition is obtained highlighted. The chemical composition of propolis depends on various factors, such as its botanical origin and collection time. The great biodiversity of Brazil reflects the great diversity of the Brazilian propolis composition. In addition, the extraction processes used for obtaining propolis extracts directly influence the final composition and thus the biological activity. The aim of this study was to evaluate the biological and cytotoxic potential of the red, green and brown propolis extracts from eight geographic regions of Brazil, obtained by two different extraction methods. The propolis samples were extracted by the conventional method using ethanol as a solvent and also by supercritical extraction method. Subsequently, *in vitro* antioxidant activity was determined by the ABTS method, the antimicrobial activity against four bacteria and one pathogen fungi was tested using the microdilution 96-wells plates method, the antiparasitic activity was measured by inhibition of *T. cruzi* cell after 24 and 96 hours of incubation and two concentrations of extracts. Finally the cytotoxic potential was evaluated against four human tumor cell lines by MTT method. The results show the biological potential of propolis. The red propolis extracts showed the highest percentages of antioxidant activity. In the evaluation of the antimicrobial activity, red propolis extracts also showed higher antimicrobial activity for the bacteria *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella sp.* There was no antimicrobial activity showed for the extracts against gram-negative bacterium *Escherichia coli*. For both assays, antioxidant and antimicrobial activity, it was observed a higher activity of the extracts obtained by conventional extraction. The results of activity assays *in vitro* against *T. cruzi* Y strain demonstrated that the ethanolic extracts inhibited the cells during the first 24 hours of incubation. The *in vitro* cytotoxicity assay showed potential cytotoxic against four tumor cell lines only for the ethanolic extracts of red propolis. Despite all this biological potential is still incipient the application of propolis in food products, patent deposits and scientific papers prove this statement. Thus, the results suggest future research of propolis extracts application in the food industry.

**Keywords:** propolis, antioxidant activity, antimicrobial activity, *T. cruzi*, cytotoxic potential.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I

<b>Figura 1 -</b>	Estágios do Processo de Extração Convencional.	22
<b>Figura 2 -</b>	Diagrama de pressão e temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso.	24
<b>Figura 3 -</b>	Estágios do Processo de Extração Supercrítica	25
<b>Figura 4 -</b>	Unidade de Extração Supercrítica. Equipamento Piloto utilizado neste trabalho, SFT-110.	26

### Capítulo II

<b>Figura 1 -</b>	Fluxograma de Prospecção Tecnológica	48
<b>Figura 2 -</b>	Evolução anual do depósito de patentes relacionadas ao uso de própolis em produtos alimentícios (1982 - 2014)	50
<b>Figura 3 -</b>	Distribuição dos depósitos de patentes por país de origem/região relacionados à utilização de própolis em produtos alimentícios (PCT: <i>Patent Cooperation Treaty</i> )	52
<b>Figura 4 -</b>	Maiores depositantes de patentes referentes à tecnologia estudada	53
<b>Figura 5 -</b>	Distribuição por incidência nas subclasses	54

### Capítulo III

<b>Figure 1 -</b>	Determination of antioxidant activity of the propolis extracts from different regions of Brazil by the ABTS method, using four different concentrations	66
<b>Figure 1A -</b>	Extracts obtained by ethanolic extraction	67
<b>Figure 1B -</b>	Extracts obtained by Supercritical extraction	67
<b>Figure 1C -</b>	Comparison between red propolis extracts	68



<b>Figure 1D</b> -	Comparison between green propolis extracts	68
<b>Figure 1E</b> -	Comparison between brown propolis extracts	69
<b>Figure 2</b> -	Activity of the EtOH extracts of different Brazilian propolis against <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotes Y strains after 24 h (A) and 96 h (B) of incubation with both tested concentrations (75 and 300 mg.mL <sup>-1</sup> )	74

## APÊNDICE A

<b>Figura 1</b> -	Imagem da Própolis Vermelha de origem do Estado de Sergipe - (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	87
<b>Figura 2</b> -	Imagem da Própolis Vermelha de origem do Estado de Alagoas - (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	87
<b>Figura 3</b> -	Imagem da Própolis Verde (01) de origem de Minas Gerais, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	87
<b>Figura 4</b> -	Imagem da Própolis Verde (02) de origem de Minas Gerais, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	88
<b>Figura 5</b> -	Imagem da Própolis Verde de origem do Paraná, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	88
<b>Figura 6</b> -	Imagem da Própolis Marrom de origem de Santa Catarina, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	88
<b>Figura 7</b> -	Imagem da Própolis Marrom de origem de Rio Grande do Sul, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	89
<b>Figura 8</b> -	Imagem da Própolis Marrom de origem de Paraná, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia	89

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

**Tabela 1** - Palavras-chave em bancos de dados INPI 49

**Tabela 2** - Total de documentos obtidos por busca no Espacenet Worldwide database 49

### Capítulo III

**Table 1** - Propolis sample identification by the color, region, and state of origin 62

**Table 2** - Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of extracts from different samples of Brazilian propolis obtained by ethanolic extraction (Et) and by supercritical fluid extraction (SC) 71

**Table 3** - *In vitro* cytotoxicity of the EtOH red extracts on tumor cell lines 77

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
Capítulo I.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 A PRÓPOLIS .....	17
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	19
3.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO .....	20
3.3.1 Extração Etanólica.....	21
3.3.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction).....	22
3.4 PROPRIEDADES DA PRÓPOLIS .....	26
3.5 PERSPECTIVA DE APLICAÇÕES PARA A PRÓPOLIS .....	30
Capítulo II .....	42
Artigo I: Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: uma prospecção baseada em documentos de patentes.....	42
1 INTRODUÇÃO .....	45
2 METODOLOGIA .....	47
2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	47
2.2 ESCOPO .....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4 CONCLUSÃO .....	55
Capítulo III.....	58
Artigo II: Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts .....	58
1 INTRODUCTION.....	60
2 MATERIAL AND METHODS .....	62
2.1 REAGENTS .....	62
2.2 SAMPLE PREPARATION.....	62
2.3 ETHANOLIC EXTRACT PRODUCTION.....	62
2.4 SUPERCRITICAL EXTRACT PRODUCTION.....	63
2.5 DETERMINATION OF <i>IN VITRO</i> ANTIOXIDANT ACTIVITY .....	63
2.6 ANTIMICROBIAL ACTIVITY .....	64

2.7 <i>IN VITRO</i> ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS AGAINST <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> ( <i>T. CRUZI</i> ) EPIMASTIGOTES Y STRAINS .....	65
2.8 <i>IN VITRO</i> CYTOTOXICITY .....	65
2.9 STATISTICAL ANALYSIS .....	66
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	66
3.1 ANTIOXIDANT ACTIVITY <i>IN VITRO</i> .....	66
3.2 ANTIMICROBIAL ACTIVITY .....	70
3.3 <i>IN VITRO</i> ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS AGAINST <i>T. CRUZI</i> EPIMASTIGOTES .....	73
3.4 CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i> .....	76
4 CONCLUSIONS .....	78
Capítulo IV .....	85
1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
APÊNDICE A – AMOSTRAS DE PRÓPOLIS UTILIZADAS E SUAS MICROSCOPIAS .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas melíferas de diferentes fontes vegetais e tem sido utilizada pelo homem desde a antiguidade devido ao seu amplo espectro de atividade biológica como propriedades antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral e antifúngico. O uso de extratos de própolis na medicina popular data de períodos muito antigos, a.C. (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI et al., 2001; SILVA et al., 2006), mas foi somente nas últimas décadas que cientistas iniciaram as investigações sobre seus constituintes e propriedades biológicas (SFORCIN, 2007).

Atualmente, mais de 300 compostos já foram identificados em amostras de própolis de diferentes origens. Compostos como ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides, terpenos, b-esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (MARCUCCI et al., 2001; BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002; HATA et al., 2012, CASTALDO E CAPASSO, 2002; HU et al., 2005). Estudos realizados demonstram que a composição da própolis depende de vários fatores, como sua origem geográfica, as fontes de vegetais coletadas pelas abelhas, a estação do ano e o clima do local de coleta (BANKOVA et al., 2005; PARK et al., 2002; BANKOVA e MARCUCCI, 2000; AHN et al., 2007; GRAIKOU et al., 2016).

Diferentes processos são utilizados para obtenção de extratos da própolis. O processo mais comum utiliza o etanol como solvente, uma vez que a maioria dos compostos bioativos presentes na própolis são bastante lipofílicos, solúveis em etanol (ROCHA et al., 2012). O uso de metanol também já foi utilizado para extração e apresentou um extrato com elevadas concentrações de flavonoides e fenólicos comparadas ao uso de etanol, porém os efeitos tóxicos de metanol limitam a sua utilização (MIGUEL et al., 2010). A água também tem sido utilizada como solvente para extração (GUO et al., 2011; NAGAI et al, 2003), no entanto a água dissolve apenas uma pequena parte dos constituintes da própolis, cerca de 10% do seu peso (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

A extração de própolis por ultrassom assistida demonstrou bons resultados com a aceleração do processo de extração independente do solvente extrator (TRUSHEVA et al., 2007). Uma tecnologia caracterizada como limpa e

promissora que tem sido aplicada para a obtenção de extratos de própolis é a extração com fluidos supercríticos. Esse tipo de extração vem sendo utilizado principalmente com o objetivo de redução de resíduos orgânicos dispensados no meio ambiente após o processo final da extração e tem revelado grande potencial para a obtenção de constituintes específicos, porém tem apresentado rendimentos de extração mais baixos em relação ao convencional (MACHADO et al., 2015; BISCAIA e FERREIRA, 2009).

As propriedades biológicas da própolis têm sido evidenciadas por diversas pesquisas. A sua atividade antioxidante é uma das características mais investigadas e a elevada presença de compostos fenólicos na matriz contribui significativamente para essa propriedade da própolis (AHN et al., 2007; OSÉS et al., 2016; WANG et al., 2015; MOREIRA et al., 2008). As propriedades antimicrobianas e antitumorais (NEDJI e AYAD, 2014; GRAIKOU et al., 2016; TOSI et al., 2007; DUMAN e EMINE, 2015; OSÉS et al., 2015) e atividade citotóxica (NOVAK et al., 2014; CARVALHO et al., 2011; BURIOL et al., 2009) têm sido cada dia mais investigadas. Além disso, um número crescente de estudos têm sido observado para investigar a propriedade antiparasitária da própolis de diferentes origens geográficas (DANTAS et al., 2006; SALOMÃO et al., 2010; PRYTZYK et al., 2003).

Diante de todas suas características, a própolis é cada dia mais avaliada para aplicações industriais de acesso à população. Ao longo dos últimos anos os extratos de própolis têm sido utilizados em produtos alimentícios, cosméticos e produtos de higiene, produtos farmacêuticos e principalmente preparações para finalidades médicas e odontológicas como pode ser evidenciado em estudos prospectivos envolvendo a própolis (SFORCIN, 2007; PEREIRA et al., 2002; LUIS-VILLAROYA, 2015; DUMAN et al., 2014; CASTALDO e CAPASSO, 2002; NASCIMENTO et al., 2009; LIBÉRIO et al., 2009).

Na área de alimentos, a própolis tem sido aplicada em testes e formulações tais como salsichas, manteigas, méis, sucos e peixes (ALI et al., 2010; NARBONA et al., 2010; OZCAN e AYAR, 2003). A adição de própolis nas formulações melhora o *shelf-life* (vida de prateleira), impede a oxidação lipídica e tem o objetivo de promover benefícios de saúde para o consumidor (ALI et al., 2010). No entanto, o sabor da própolis é bastante intenso o que limita sua

utilização em alimentos com perfil aromático suaves, tais como leites ou produtos lácteos (NARBONA et al., 2010).

Atualmente, o desafio para a indústria de alimentos na aplicação do extrato de própolis é reduzir ou mascarar o sabor da própolis em formulações alimentares, mantendo simultaneamente as suas características benéficas para a saúde humana e a conservação dos alimentos em questão (COTTICA et al., 2015). Porém, para isso ainda será necessário que os diversos estudos envolvendo a aplicação de própolis em produtos alimentícios definam a concentração de própolis a ser ingerida pelos indivíduos que não lhe tragam efeitos maléficos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o potencial biológico e citotóxico de extratos de própolis vermelha, verde e marrom de oito regiões geográficas do Brasil, obtidos por dois diferentes métodos de extração, extração supercrítica e extração etanólica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Realizar uma prospecção baseada em documentos de patentes depositadas no mundo sobre a aplicação de extratos de própolis no desenvolvimento de produtos alimentícios;
- (2) Obter extratos de diferentes amostras de própolis pelo método de extração convencional utilizando etanol como solvente extrator;
- (3) Obter extratos de diferentes amostras de própolis por tecnologia de extração supercrítica utilizando dióxido de carbono como fluido extrator;
- (4) Avaliar e comparar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos das diferentes amostras obtidos pelos dois métodos de extração;
- (5) Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana dos extratos das diferentes amostras obtidos pelos dois métodos de extração frente a diferentes microrganismos (bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos);
- (6) Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* dos extratos etanólicos das diferentes amostras frente ao *Trypanosoma cruzi*;
- (7) Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos etanólicos das diferentes amostras frente a diferentes células tumorais.



## Capítulo I

---

### Revisão Bibliográfica

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A PRÓPOLIS

Própolis é o nome dado para a substância resinosa coletada pelas abelhas operárias (*Apis mellifera*) de diversas fontes de plantas como o videeiro, choupo, pinho, amieiro, salgueiro e palma e são utilizadas pelas abelhas para proteção de suas colmeias contra insetos e micro-organismos, para vedação de buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colmeia, além de ser usada no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (BANKOVA et al., 2000; GHISALBERTI, 1979; CASTALDO e CAPASSO, 2002). O termo própolis deriva do grego pro (por 'em frente', 'na entrada') e polis ("comunidade" ou "cidade") e significa uma substância em defesa da colmeia (CASTALDO e CAPASSO, 2002). O primeiro relato sobre a utilização da própolis como um remédio da medicina popular remonta a 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979).

Park et al., (2000), classificaram a própolis brasileira em doze grupos principais, de acordo com a sua composição química básica e também com a atividade biológica apresentada. Dos doze grupos classificados, cinco grupos de própolis foram encontrados na região sul, seis grupos na região nordeste e um grupo na região sudeste, o que destacou a existência de uma maior diversidade de própolis nas regiões sul e nordeste do Brasil, regiões estas onde a vegetação também possui uma maior variedade. As própolis apresentavam colorações diferenciadas, variando desde amarelo, amarelo escuro, castanho claro e escuro, marrom esverdeado e avermelhado e verde. Os pesquisadores também observaram outros tipos de própolis as quais não apresentaram propriedades biológicas e, portanto não foram incluídos na classificação. Posteriormente foram analisadas as origens botânicas das principais própolis. A própolis do grupo 3 (três) foi identificada como sendo resina do botão floral de *Populus* (*Salicaceae*). A origem botânica da própolis do grupo 6 e 12 foi identificada sendo resina de folhas jovens de *Hyptis divaricata* (*Lamiaceae*) e *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*), respectivamente (PARK et al., 2002).

Recentemente foi encontrada uma nova própolis em colmeias localizadas ao longo do litoral e manguezais no nordeste brasileiro. Esse novo tipo de

própolis foi classificada como própolis do grupo 13, denominada de própolis vermelha e tem como origem botânica a *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (*Fabaceae*) (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008). A própolis vermelha brasileira apresenta uma coloração vermelha intensa, além de uma composição química diferenciada comparada aos outros 12 tipos de própolis brasileira (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009), apresentando teores de compostos fenólicos mais elevados do que todas as outras própolis já caracterizadas no Brasil (CABRAL et al., 2009).

A coloração da própolis depende da sua procedência e conseqüentemente do vegetal coletado para sua elaboração. A própolis possui um odor característico, também podendo variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996). A análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal é o melhor indicador da origem botânica da própolis. Para um controle de qualidade e possível padronização das amostras de própolis, a determinação da origem geográfica e botânica é de extrema importância (ALENCAR et al., 2005), assim como a determinação das diversas atividades biológicas de diferentes amostras de própolis é essencial para as aplicações terapêuticas.

No Brasil a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 dispõe o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Extrato de própolis. Por definição desta IN 03, entende-se por Extrato de Própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da Própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado. Além disso, a Instrução classifica a própolis quanto ao seu teor de flavonoides, define a composição e requisitos para a produção do extrato de própolis, entre outros prosseguimentos (BRASIL, 2001).

As pesquisas envolvendo a própolis como matriz de estudo vêm crescendo consideravelmente. No início das décadas de 80 e 90, as publicações de estudos sobre suas propriedades tiveram um crescimento significativo e um grande número de patentes sobre o tema foi também observado (PEREIRA et al., 2002).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de própolis. A produção é cerca de 50 a 150 toneladas por ano, sendo aproximadamente 75% desse total exportado, principalmente para o Japão (97% das exportações)

(LIMA, 2015), o que significa 80% da demanda japonesa (PEREIRA et al., 2002). O aumento do interesse pelo extrato da própolis brasileira, inserido no contexto do comércio internacional de alimentos, tem gerado como consequência o aumento do valor agregado do produto (SEBRAE, 2015). A Federação de Apicultores de Minas Gerais demonstrou que a própolis produzida no Estado é considerada uma das melhores do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos. Dessa forma, todas as características panaceias da própolis e o fato de a mesma possuir um alto valor agregado, justificam o grande interesse global de pesquisas envolvendo essa matriz (PEREIRA et al., 2002).

### 3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A própolis possui uma composição química bastante complexa e variada e dependente de diversos fatores, como a origem geográfica, fontes vegetais de onde as abelhas coletam a matéria prima para sua elaboração, época de coleta e estação do ano (BANKOVA et al., 2005; MASSARO et al., 2013), essa variação é evidenciada devido a grande biodiversidade brasileira. As secreções metabólicas adicionadas pelas abelhas na produção da resina também podem influenciar na sua composição (MARCUCCI, 1995). A própolis é basicamente constituída de 50-60% de resinas e balsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen e por microelementos como alumínio, ferro, cobre, cálcio, vitaminas entre outros (GHISALBERTI, 1979).

Atualmente mais de 300 constituintes foram identificados em amostras de própolis, incluindo os derivados do ácido cinâmico, como por exemplo, ácido p-cumárico e Artepillin C, ácidos aromáticos e ésteres, ácidos benzoicos, ácidos fenólicos, flavonoides e aminoácidos, aldeídos e cetonas, esteroides, polissacarídeos, ácidos graxos e outros componentes em pequenas quantidades (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002; HATA et al., 2012, CASTALDO e CAPASSO, 2002, HU et al., 2005). Em sua composição também foram identificados elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio, potássio, sódio, lítio e silício (MARCUCCI, 1996; MACHADO et al., 2016). Flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos diterpenóides e

compostos fenólicos são indicados como os principais constituintes responsáveis pela atividade biológica da própolis (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, outros estão somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas (VARGAS et al., 2004). Trusheva et al., (2006) isolou 14 compostos da própolis vermelha, incluindo compostos fenólicos simples, triterpenos, isoflavonas e epóxidos de naftoquinona. Recentemente, os compostos benzofenonas poliisopreniladas, humol e formononetina foram também identificados em amostras de própolis vermelha (PICCINELLI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2014). Os dois compostos, humol e formononetina tem demonstrado atividade antitumoral quando avaliados isoladamente (CUESTA-RUBIO et al., 2002; YE et al., 2012; ZHANG, et al., 2014, NOVAK et al., 2014).

Uma menor variação de composição química é observada em própolis de origem de regiões de zonas temperadas como a Europa, onde os principais compostos bioativos identificados nessas própolis são os flavonoides (SAWAYA et al., 2004; MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 2002). Porém, uma grande quantidade de flavonoides presentes na própolis brasileira não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES et al., 2004) e por isso a própolis brasileira tem despertado grande interesse em pesquisadores ao redor do mundo, devido a sua composição química diferenciada das própolis de regiões de zona tropical (TRUSHEVA et al., 2006).

A padronização química universal da própolis é uma tarefa muito difícil, e por esta razão, uma investigação detalhada da sua composição química e das suas propriedades biológicas é de extrema importância para a aplicação devida da própolis (BANKOVA, 2005).

### 3.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

O procedimento de extração de uma matriz é determinado pelos compostos a serem extraídos e pelo objetivo final da extração, se o mesmo será quantitativo ou qualitativo (TSAO e DENG, 2004). Os extratos de própolis podem ser obtidos por diversos métodos de extração. A extração por solventes orgânicos como o etanol é a mais comumente utilizada. O método tradicional, a

maceração, é um método demorado, requerendo períodos de tempo de até 10 dias para obtenção dos extratos (CUNHA et al., 2004; WOISKY e SALATINO, 1998).

Métodos mais rápidos e eficientes de extração de compostos orgânicos a partir de matrizes sólidas como a própolis também são utilizados como, por exemplo, a extração por micro-ondas assistida, e a extração por ultrassom (HUIE, 2002; KAUFMANN e CHRISTEN, 2002). Ambos os métodos demonstram potencial de reduzir os tempos de extração de forma significativa (LIU e WANG, 2004).

Também são utilizados a extração aquosa ou por Soxhlet (ALENCAR et al., 2007; BARROS et al., 2007) e nos últimos anos diferentes estudos apresentaram a extração de própolis com fluido supercrítico (BISCAIA e FERREIRA, 2009; MACHADO et al., 2015). Os processos de extração estão diretamente relacionados com as atividades apresentadas pelos extratos obtidos, apresentando assim diferentes resultados biológicos e de composição química a depender do método de extração utilizado para uma mesma amostra (MACHADO et al., 2015; COTTICA et al., 2011; CHRISTOV et al., 2005; TRUSHEVA et al., 2007).

### 3.3.1 EXTRAÇÃO ETANÓLICA

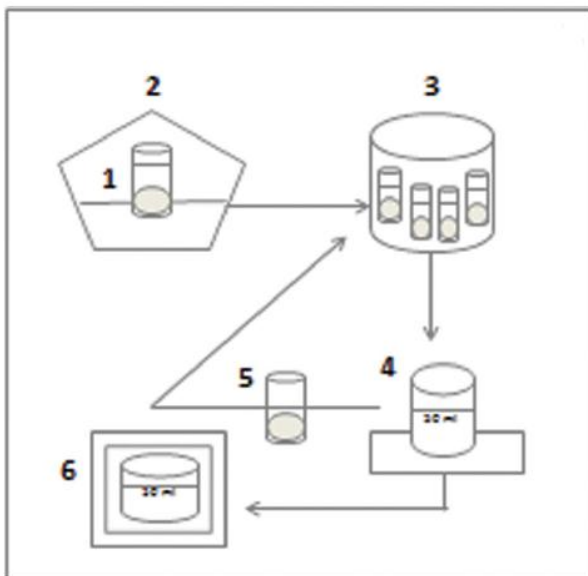
O método mais comumente utilizado para obtenção de extratos de própolis é a extração com etanol, e por isso, a grande maioria dos produtos disponíveis no mercado para comercialização tem a extração com este solvente (PARK et al., 1998; CUNHA et al., 2004).

Normalmente, os extratos de própolis que são utilizados para a produção de alimentos e cosméticos são obtidos a partir da extração etanólica. Alguns estudos tem demonstrado que a extração etanólica é bastante eficiente no que se refere à composição final dos extratos gerados. Park et al., (1998) avaliaram os métodos de extração utilizando água e etanol, e demonstrou que os extratos com 60 a 80% de etanol tiveram os melhores resultados para extração de flavonoides da própolis. Sawaya et al., (2004) relataram que o número de componentes em extratos de própolis aumentou proporcionalmente com a concentração de etanol no solvente utilizado para a extração. Porém, os processos de extração utilizando

etanol geram um grande volume de resíduo orgânico descartados no meio ambiente, além de necessitar de processos pós-extração para finalização do extrato (REVERCHON E MARCO, 2006; MENDIOLA et al., 2007).

O processo de extração utilizando etanol como solvente é simples. O extrato é obtido através da adição de uma quantidade de própolis em etanol a uma porcentagem pré-estabelecida. A mistura é levada para extração em shaker e após é centrifugada para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante é homogeneizado e levado à secagem em estufa a temperatura aproximada de 50°C (Park et al., 1998). Na Figura 1 é apresentada a sequência do processo de extração convencional (Etanólico):

**Figura 1** - Estágios do Processo de Extração Convencional: 1 – Amostra de própolis em etanol; 2 – Extração em shaker; 3 – Centrifugação; 4 – Retirada do sobrenadante e centrifugação; 5 – Homogeneização do sobrenadante e secagem; 6 – Extrato de própolis.



**Fonte:** MACHADO et al., 2016.

### 3.3.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE – SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION)

Estudos vêm demonstrando o aumento do uso de fluidos supercríticos para realização de extrações de diferentes compostos como um método alternativo aos convencionais. Compostos estes principalmente de matrizes de

origem natural, como a própolis (BISCAIA E FERREIRA, 2009; MACHADO et al., 2015; GARMUS, et al., 2015; PARDO-CASTAÑO et al., 2015). A SFE tem sido utilizada para a extração de aromas, fragrâncias, bem como, para a obtenção de constituintes ativos, principalmente a partir de matrizes vegetais (CAPUZZO et al., 2013).

O processo de extração com fluidos supercríticos apresenta vantagens e desvantagens quando comparados aos métodos convencionais de extração. As vantagens sobre os convencionais estão principalmente ligados à seletividade dos compostos, a redução do uso de solventes orgânicos e consequentemente redução de impactos ao meio ambiente, a obtenção de extratos de alto valor biológico e pela utilização do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como solvente extrator (REVERCHON E MARCO, 2006; MENDIOLA et al., 2007). Extratos obtidos por SFE apresentam uma seletividade em compostos específicos, o que é de grande interesse em pesquisas (REVERCHON e DE MARCO, 2006; MACHADO et al., 2013; MACHADO et al., 2015). A seletividade na SFE pode ser trabalhada pela escolha do fluido supercrítico e pelo controle de parâmetros de extração como temperatura, pressão, tempo de extração, vazão do solvente e o uso de modificadores ou co-solventes (AGHEL et al., 2004).

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o solvente supercrítico mais utilizado e se comporta como um solvente lipofílico (não polar). Este solvente é facilmente disponível em alta pureza, tem um baixo custo, não apresenta toxicidade na forma utilizada e é seguro, além de permitir operações a pressões relativamente baixas e em temperaturas próximas à ambiente. Outra vantagem apresentada pelo dióxido de carbono é de ser um gás à temperatura e pressão ambiente, sendo, portanto facilmente removido após o processo de extração (MENDIOLA et al., 2007; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

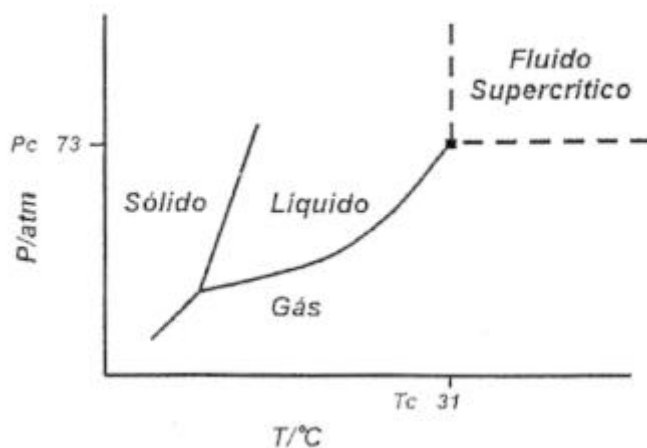
Uma grande vantagem do processo de extração supercrítica é a separação na sequencia dos estágios de extração entre a temperatura e a pressão. Dessa forma, diferentes famílias de compostos podem ser obtidas a partir de uma mesma matriz (REVERCHON & DE MARCO, 2006).

Os fluidos supercríticos apresentam propriedades físico-químicas intermediárias àquelas dos líquidos ou dos gases, e muitas vezes se aproximam às melhores características dos mesmos, apresentam, por exemplo, uma baixa



viscosidade como de um gás, um alto poder de solvatação como um líquido e uma difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade (CARRILHO et al., 2001; HAJIMIRSADEGHI, 2007; GOMES et al., 2007). Os fluidos supercríticos são facilmente adaptáveis aos processos de separação envolvendo diferentes níveis de temperatura e pressão e essa característica permite que sejam utilizados para separar diversos materiais instáveis como óleos e gorduras, compostos antioxidantes, etc., a baixas temperaturas (BRUNNER, 2005). A Figura 2 apresenta o diagrama de fases do CO<sub>2</sub> supercrítico.

**Figura 2** - Diagrama de pressão e temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO<sub>2</sub>; T<sub>c</sub>: temperatura crítica; P<sub>c</sub>: pressão crítica.



**Fonte:** CARRILHO et al., 2001.

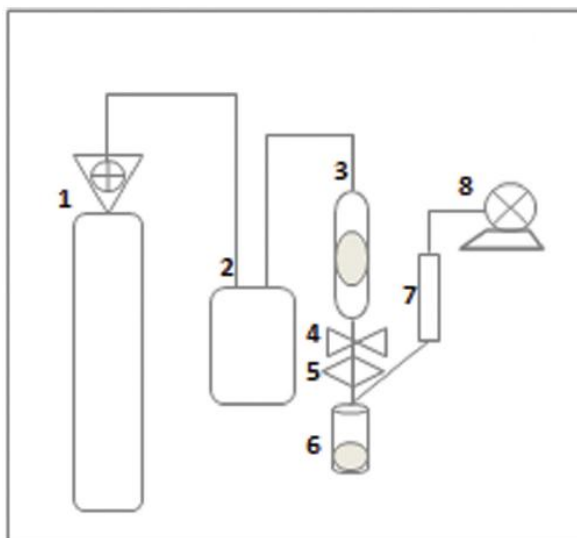
Como desvantagem, a SFE possui muitas vezes um rendimento de extração mais baixo do que o processo de extração convencional (CATCHPOLE et al., 2004; WANG e YU et al., 2004; PAVIANI et al., 2012). Além disso, os elevados preços dos equipamentos de extração supercrítica torna o processo acessível apenas para produtos que possuem alto valor agregado.

A Extração Supercrítica pode ser facilitada pela adição de quantidades reduzidas de outros compostos, denominados por co-solventes ou modificadores, que modificam o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico (HERRERO et al., 2006; LEAL et al., 2003). Um co-solvente líquido podem ser adicionados para

aumentar o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> supercrítico, uma vez que o mesmo é um bom solvente para compostos não polares, tendo uma afinidade baixa com compostos polares. Alguns autores tem relatado a adição de pequenas quantidades de solventes líquidos (por exemplo, álcool etílico) que são rapidamente solubilizados por CO<sub>2</sub> supercrítico (REVERCHON & DE MARCO, 2006).

Esta flexibilidade permite que as condições de extração sejam adequadas conforme as necessidades específicas do produto a ser extraído e para o produto final desejado (MACHADO et al., 2013). Biscaia e Ferreira (2009) demonstraram que o uso de etanol como co-solvente no processo de extração com fluido supercrítico aumentou o rendimento em cerca de três vezes, em comparação com a extração usando apenas o CO<sub>2</sub>. Da mesma forma Paviani et al., (2012) evidenciaram que o rendimento global do processo de extração de própolis obtido sem a adição de co-solvente foi muito menor quando comparado ao rendimento do processo onde o etanol foi utilizado como co-solvente. A Figura 3 apresenta o processo de extração com fluido supercrítico, enquanto que a Figura 4 apresenta o equipamento utilizado nesse estudo.

**Figura 3** - Estágios do Processo de Extração Supercrítica: 1 – cilindro de CO<sub>2</sub> com tubo pescador; 2 – bomba de alta pressão; 3 – Célula de extração; 4 – Válvula dinâmica/estática; 5 – Válvula de restrição; 6 – Vial coletor de amostra; 7 – Medidor de fluxo; 8- Medidor de gás.



**Fonte:** MACHADO et al., 2016.

O processo tem início quando o CO<sub>2</sub> sai do cilindro em direção à bomba, onde o solvente líquido será comprimido para dentro da célula de extração até a pressão programada no experimento. A célula de extração é acoplada dentro do forno controlando-se a temperatura de operação. O solvente fluido percola a matéria-prima extraíndo os compostos solúveis e ao atingir a válvula de expansão tem sua pressão reduzida até pressão ambiente voltando à fase gasosa. Os compostos solúveis no fluido supercrítico precipitam no frasco coletor e o solvente na fase gasosa passa por um rotâmetro e depois por um totalímetro, onde sua vazão é quantificada. As condições para o processo de extração supercrítica são previamente estabelecidas de acordo com a matriz estudada. O leito de extração é composto por uma camada de lã de vidro em sua base, a matéria-prima triturada, e outra camada de lã de vidro por cima da matéria-prima (BISCAIA E FERREIRA, 2009; MACHADO et al., 2015).

**Figura 4** - Unidade de Extração Supercrítica. Equipamento Piloto utilizado neste trabalho, SFT-110.



**Fonte:** Autoria própria.

### 3.4 PROPRIEDADES DA PRÓPOLIS

A atividade antioxidante é uma das principais características da própolis e varia conforme a amostra analisada. A presença de compostos fenólicos na matriz contribui significativamente para sua atividade antioxidante. A quantidade total de compostos fenólicos em amostras de extratos de própolis tem

sido correlacionada com sua atividade antioxidante por diferentes autores (AHN et al., 2007; OSÉS et al., 2016; WANG et al., 2015; MOREIRA et al., 2008). Da Silva et al., (2006) sugeriram que os flavonoides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas concluíram que outros fatores podem estar envolvidos.

Nos últimos anos ensaios espectrofotométricos têm sido utilizados para determinar a capacidade antioxidante de diferentes produtos alimentícios e matrizes naturais. Os métodos mais convencionais são os ensaios de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), entretanto, outros métodos também usados como o ORAC, que determina a capacidade de absorção dos radicais do oxigênio e FRAP, que mede a capacidade de redução do íon de ferro em plasma (KIM et al., 2002; VAN DEN BERG et al., 1999; THAIPONG et al., 2006). Estes métodos se baseiam no mesmo princípio, onde um radical ou redox-ativo é gerado a partir de um composto sintético colorido e a capacidade da amostra biológica para eliminar esse radical ou para reduzir o composto redox-ativo é monitorado por espectrofotometria, com aplicação de um padrão adequado para quantificar a capacidade antioxidante. Os padrões mais utilizados são o Trolox (TEAC) ou vitamina C (VCEAC). Alguns desses métodos se baseiam na transferência de elétrons e redução de um oxidante colorido (ABTS, DPPH e FRAP), outros se baseiam na transferência de átomo de hidrogênio (ORAC) (DIEUDONNE' et al., 2009;. RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; FLOEGEL et al., 2011). Floegel et al., (2011), analisaram mais de 50 frutas e legumes pelos métodos DPPH e ABTS e concluíram que o ensaio de ABTS apresentou melhores estimativas da capacidade antioxidante dos alimentos analisados.

A atividade antioxidante da própolis tem sido amplamente estudada também com o objetivo de possibilitar outras aplicações dessa matriz, como aplicação tópica para prevenir e tratar a pele danificada (MARQUELE et al., 2006). A cada estudo publicado sobre suas características biológicas a própolis ganha mais reconhecimento pelas suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (TOSI et al., 2007). A própolis tem em sua composição uma ampla variedade de substâncias tais como polifenóis, quinonas, cumarinas, esteróides, ácidos aminados e compostos inorgânicos e em sua grande maioria compostos

fenólicos, que são em sua grande maioria, reconhecidas com agentes antimicrobianos ativos (COWAN, 1999; TOSI et al., 2007).

Choudhari et al., (2012) apresentaram o potencial antimicrobiano da própolis Indiana frente a seis cepas de bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*) e ainda contra sete bactérias resistentes à drogas e clinicamente isoladas (*Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus aureus* 1, 2 e 3, *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*). Tosi et al., (2007) relataram que extratos de própolis inibiram o desenvolvimento de *Escherichia coli* em carnes frescas, onde os extratos utilizados estavam em níveis de concentrações seguros para consumo humano e consequentemente o extrato poderia ser utilizado como conservante natural ou como antibacteriano na produção de alimentos.

Os efeitos bactericidas ou bacteriostáticos da própolis dependem da concentração dos extratos utilizados nos ensaios e podem ser influenciadas pelo método de extração (PAVIANI et al., 2012). Esses efeitos podem acontecer através de uma ação direta sobre os microrganismos ou indiretamente através da estimulação do sistema imunitário (SFORCIN, 2007). Luis-Villaroya et al., (2015) relataram fortes efeitos sinérgicos, letais contra *E. coli* usando aplicação de calor suave e extratos de própolis em sucos de maçãs.

Alguns pesquisadores relataram que as atividades antimicrobianas da própolis são maiores contra bactérias Gram-positivas do que contra as bactérias Gram-negativas (CHOUDHARI et al., 2012;. LU et al., 2005;. SILICI e KUTLUCA, 2005;. MARCUCCI et al., 2001; REZENDE et al., 2006; PACKER e LUZ, 2007). Isto pode ser explicado porque a parede celular de bactérias Gram-negativas é quimicamente mais complexa e apresenta um teor de lipídeos maior, o que pode melhorar a sua força e resistência contra os extratos de matrizes naturais como a própolis (SILICI e KUTLUCA, 2005; MOHAMMADZADEH et al., 2007). Semelhante à atividade antioxidante, alguns autores relataram que a atividade antimicrobiana da própolis é dependente de efeitos sinérgicos de flavonoides, ácidos fenólicos e derivados, que são um dos principais constituintes na própolis (SAWAYA et al., 2004; MELLIYOU et al., 2007;. KASOTE et al., 2015).

Dentre os diversos produtos naturais estudados, a própolis tem sido considerada uma possível alternativa para auxiliar no tratamento ou prevenção de muitas doenças infecciosas (LIBERIO et al., 2009). Além disso, um número crescente de estudos tem sido realizado para investigar a propriedade antiparasitária da própolis (DANTAS et al., 2006; SALOMÃO et al., 2010; PRYTZYK et al., 2003). Ayres et al., (2007) relataram que os extratos etanólicos de própolis vermelha brasileira foram ativos em reduzir as infecções de macrófagos por *Leishmania amazonensis*. Salomão et al., (2011) analisaram a inibição de cepas de *Trypanosoma cruzi* quando tratadas com extratos de própolis verde em diferentes concentrações, confirmando a atividade antiparasitária da própolis.

A própolis e seus componentes isolados têm sido também estudados como agentes antitumorais e imunomoduladores em testes *in vitro* e *in vivo* (FROZZA et al., 2013; ORSOLIC' et al., 2006; ORSOLIC' et al., 2005; VALENÇA et al., 2013). Barbari et al., (2011) demonstraram a atividade citotóxica *in vitro* de extratos etanólicos de própolis em células HeLa, enquanto que Novak et al., (2014) identificaram uma fração altamente ativa em amostras de própolis vermelha do Brasil, com atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*.

As atividades antitumorais e câncer-terapêutico da própolis são justificadas por meio de mecanismos que incluem a interrupção do ciclo celular, indução de apoptose e inibição da proliferação de células de cancro e o crescimento do tumor (AWALE et al., 2008;. CUESTA-RUBIO et al., 2002; FROZZA et al., 2013; KAMIYA et al., 2012; VALENÇA et al., 2013), porém os estudos *in vivo* ainda precisam ser reforçados. A própolis também é considerada por estimular o aumento da produção de anticorpos, sugerindo a sua utilização em vacinas como um adjuvante (SFORCIN, 2007).

É evidente que a própolis apresenta propriedades antitumorais promissoras, mas os mecanismos envolvidos na quimioprevenção utilizando a própolis ainda não estão bem compreendidos. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados pelos diversos estudos são úteis para compreender alguns mecanismos de ação e precisam ser continuados para garantir a segurança de utilização da própolis (SFORCIN, 2007).

### 3.5 PERSPECTIVA DE APLICAÇÕES PARA A PRÓPOLIS

Atualmente, a própolis tem sido inserida como um ingrediente em produtos de diferentes indústrias, incluindo os produtos alimentícios. Muitos consumidores estão à procura de alimentos naturais e funcionais, e, neste contexto é possível encontrar alimentos adicionados de própolis como um conservante natural e fonte de compostos bioativos (DUMAN e ÖZPOLAT, 2015; GUTIÉRREZ-CORTÉS e SUAREZ MAHECHA, 2014; BANSKOTA et al., 2001; OSÉS et al., 2016).

Ainda, a crescente diminuição da aceitabilidade de conservantes sintéticos pela população, gerou um interesse por parte das indústrias de introduzir na produção de alimentos, aditivos naturais que têm a capacidade de agir como conservante. A própolis tem sido considerada uma alternativa muito interessante para novas aplicações tecnológicas em alimentos e está a cada dia sendo inserida na produção de alimentos e bebidas também como uma fonte de compostos bioativos para melhorar o produto e fornecer benefícios à saúde do consumidor (MISHIMA et al., 2005; MOREIRA et al., 2008; TOSI et al., 2007).

Dentro do contexto, há aplicações de própolis já testadas em alguns tipos de produtos alimentícios tais como salsichas, torrão e em manteiga (ALI et al., 2010; NARBONA et al., 2010; OZCAN e AYAR, 2003). Morsy et al. (2013), relatou o uso de própolis como aditivo alimentar por administração oral para ovelhas, e demonstrou uma melhoria na saúde dos animais. Recentemente, Osés et al. (2016) mostraram um aumento nas atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do mel adicionado de própolis em baixas concentrações. Luis-Villarroya et al. (2015), evidenciaram que níveis baixos de própolis incorporados no suco de maçã melhorou a conservação do produto e criou um novo alimento funcional. A adição de própolis nos alimentos pode ampliar seu *shelf-life*, impede a oxidação lipídica e também fornece muitos benefícios à saúde do consumidor (ALI et al., 2010).

O sabor bastante intenso da própolis (NARBONA et al., 2010) limita sua aplicação em alimentos com perfil aromático suave, tais como leites ou produtos lácteos. Essa limitação segue como um desafio para as empresas de alimentos, para reduzir ou mascarar o sabor da própolis nessas formulações, mantendo suas

características benéficas para saúde humana e de conservação para os alimentos (COTTICA et al., 2015).

Em outras áreas a própolis também tem sido bastante aplicada, como na produção de filmes de colágeno para melhorar o processo de cicatrização de feridas (ALMEIDA et al., 2013), na produção de condicionador, xampu, sabonete, batom, protetor solar, gel pós barba, cremes, pomadas, dentre outras (LUTOSA et al., 2008).

A partir de um estudo de revisão com as utilizações da própolis *in vivo*, Burdock, (1998) sugeriu uma dose de própolis segura para o consumo humano que pode ser de 1,4 mg/kg de peso corporal no dia, ou aproximadamente 70 mg/dia em adultos. Porém, pesquisadores indicam que novos ensaios devem ser realizados com seres humanos para estabelecer níveis de dosagem e período de ingestão segura à saúde humana (SFORCIN, 2007).

Diante, do elevado potencial biotecnológico apresentado pela própolis brasileira associada às variações químicas e biológicas apresentadas pelos diferentes tipos e origem geográficas dessa matriz natural, bem como, pelo método de extração utilizado, o desenvolvimento deste trabalho justifica-se pela necessidade de contribuição para um maior entendimento da própolis brasileira e conseqüentemente a ampliação de suas possíveis aplicações para uso com finalidade alimentícia e farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-411, 2004.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUZMÁN, J. P.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological



activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.

ALI, F. H.; KASSEM, G. M.; ATTA-ALLA, O. A. Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. **Veterinaria Italiana**, v. 46, p. 167-172, 2010.

ALMEIDA, E. B.; CARDOSO, J. C.; LIMA, A. K.; OLIVEIRA, N. L.; PONTES-FILHO, N. T.; et al. The incorporation of Brazilian propolis in to collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 419–425, 2013.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 16, p. 181–189, 2008.

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

BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114–117, 2005.

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

BANKOVA, V. S; MARCUCCI, M.C. Standardization of propolis: Present Status and Perspectives. **Bee World**, v. 81, p. 182-188, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561–571, 2001.

BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ, K.; BOJIĆ, M.; LONČAR, M. B.; SMOLČIĆ-BUBALO, A.; DEBELJAK, Z.; et al. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 772-778, 2011.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 17-23, 2009.

BRASIL, **Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento ñ DIPOA - Regulamento Técnico de Identidade e qualidade da própolis, Anexo VI.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering** ., v. 67, p. 21–33, 2007..

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

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V. ; PEDROSA, R. C. ; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology** , v. 99, p. 8413–8420, 2008.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002.

CAPUZZO, A.; MAFFEI, M. E., OCCHIPINTI, A. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. **Molecules**, v. 18, p. 7194-7238, 2013.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: thermodynamic definitions. **Química Nova**, v. 24, p. 509-515, 2001.

CARVALHO, A. A.; FINGER, D.; MACHADO, C.S.; COSTA, P. M.; ALVES, A. P. N. N.; et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1239-1245, 2011.

CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; MITCHELL, K. A.; LAN, J. S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 97–106, 2004.

CHRISTOV, R.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BERTRAND, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, v. 19, p. 673-678, 2005.

CHOUDHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p 363-367, 2012.

COTTICA, S. M.; SABIK, H.; ANTOINE, C.; FORTIN, J.; GRAVELINE, N.; VISENTAINER, J. V.; et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. **Lebenson Wiss Technol**, v. 60, p. 609-614, 2015.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B. A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 57, p. 372–378, 2002.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. O. Factors that

influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 964–970, 2004.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; DE CASTRO, S. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 103, p. 187-193, 2006.

DA SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. Á.; PARK, Y. K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, 2006.

DUDONNE', S.; VITRAC, X.; COUTIERE, P.; WOILLEZ, M.; MERILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768–1774, 2009.

DUMAN, M.; OZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80-85, 2015.

FLOEGEL, A.; DAE-OK, K.; CHUNG, S. J.; KOO, S.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FROZZA, C. O. S.; RIBEIRO, T. S.; GAMBATO, G.; MENTI, C.; MOURA, S.; PINTO, P. M.; et al. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food Chem. Toxicol**, v. 63, p. 195-204, 2014.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, p. 59-83, 1979.

GOMES, P. B.; MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 50–60, 2007.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINOU, I. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 261-267, 2016.

GUO, X. L.; CHEN, B.; LUO, L. P.; ZHANG, X.; DAI, X. M.; GONG, S. J. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.12610-12616, 2011.

GUTIERREZ-CORTES, C.; SUAREZ MAHECHA, H. Actividad antimicrobiana del propóleo y efecto en las características fisicoquímicas y sensoriales en chorizos. *Vitae [online]*, v. 21, p. 90-96, 2014.

HAJIMIRSADEGHI, S. S.; POURMORTAZAVI, S. M. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography*, v. 1162, p. 2–24, 2007.

HATA, T., TAZAWA, S.; OHTA, S.; RHYU, M-R.; MISAKA, T.; et al. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. *PLoS ONE*, v.7, 2012.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANES, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, v. 98, p. 136–148, 2006.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 276-283, 2005.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*, v. 373, p. 23–30, 2002.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2520–2525, 2003.

LIMA, G. **Estudo sobre Mel, Cera e Própolis**. Disponível em: [http://gestaportal.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca/estudo\\_mel\\_cera\\_propolis.pdf](http://gestaportal.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca/estudo_mel_cera_propolis.pdf)> Acesso em: 15 de janeiro de 2015

LIBÉRIO, S. A.; PEREIRA, A. L.; ARAÚJO, M. J. A. M.; DUTRAD, R. P.; et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 1-9, 2009.

LIU, W.; WANG, X. Extraction of flavone analogues from propolis with ultrasound. *Food Science*, v. 25, p.35–39, 2004.

LÓPEZ, B. C. G.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, v. 146, p. 174–180, 2014.

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

LUIS-VILLAROYA, A.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; BAYARRI, S.; PÉREZ, C.; PAGÁN, R. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 205, p. 90-97, 2015.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM-NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 18, p. 447-454, 2008.

KAMIYA, T.; NISHIHARA, H.; HARA, H.; ADACHI, T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11065– 11070, 2012.

KASOTE, D.; AHMAD, A.; CHEN, W.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. **Phytochem Letters**, v. 11, p. 326-331, 2015.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. **Phytochem Analysis**, v. 13, p. 105-113, 2002.

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

MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; COSTA, A. S.; COSTA, S. S.; SILVA, R. P. D. et al. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS ONE**, 2015.

MACHADO, B. A. S.; PEREIRA, C. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. P.; UMSZAGUEZ, M. A. Supercritical Fluid Extraction Using CO<sub>2</sub>: Main Applications and Future Perspectives. **Separation Science and Technology**, v. 48, p. 2741–2760, 2013.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, 2016.

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

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

MARCUCCI, M. C.; Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. **Apidologie**, v.26, p. 83-89, 1995.

MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 461-468, 2006.

MASSARO, F. C.; BROOKS, P. R.; WALLACE, H. M.; NSENGIYUMVA, V.; NAROKAI, L.; et al. Effect of Australian Propolis from Stingless Bees (*Tetragonula carbonaria*) on Pre-Contracted Human and Porcine Isolated Arteries. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; Chinou, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 103, p 375-380, 2007.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; ILBANEZ, E. Review Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 234–246, 2007.

MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3418-3423, 2010.

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, S.; YOSHIDA, C.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; SUZUKI, K. M.; NOZAWA, Y. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 5-11, 2005.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAH, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1097-1103, 2007.

MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, p. 3482-3485, 2008;

MORSY, A. S.; ABDALLA, A. L.; SOLTAN, Y. A.; SALLAM, S. M.; EL-AZRAK KEL, D.; LOUVANDINI, H.; ALENCAR, S. M. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Trop Anim Health Prod**, v. 5, p. 1609–1618, 2013.

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

NARBONA, E.; GARCÍA-GARCÍA, E.; VAZQUEZ-ARAÚJO, L.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A. Volatile composition of functional “a la Piedra” turrón with propolis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 569-577, 2010.

NASCIMENTO, C. S.; NUNES, L. C. C.; LIMA, A. A. N.; GRANJEIRO-JUNIOR, S.; ROLIM-NETO, P. J. Improving of FPS in sunscreen formulation using green and red propolis extracts **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 334-339, 2009.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 433-437, 2014.

NOVAK, E. M.; SILVA, M. S. C.; MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; LÓPEZ, B. G. C.; FORTES, M. A. H. Z.; et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction

enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 91-102, 2014.

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

ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A. B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, p. 20–27, 2006.

OSÉS, S. M.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; SANCHO, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1215–1223, 2016;

OZCAN, M.; AYAR, A. Effect of propolis extracts on butter stability. **Journal of Food Quality**, v. 26, p. 65-73, 2003.

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

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Sci**, v. 21, p. 85-90, 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 2230-2232, 1998.

PARDO-CASTAÑO, C.; VELÁSQUEZ, M.; BOLANOS, G. Simple models for supercritical extraction of natural matter., v. 97, p. 165–173, 2015.

PAVIANI, L. C.; SAITO, E.; DARIVA, C.; MARCUCCI, M. C.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; CABRAL, F. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**., v. 29, 2012.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, 2002.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by highperformance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PRYTZYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; AQUINO NETO, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 189-193, 2003.

REZENDE, G. P. S. R.; PIMENTA, F. C.; COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, v. 5, p. 967-970, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.

ROCHA, B. A.; RODRIGUES, M. R.; BUENO, P. C. P.; COSTA-MACHADO, A. R. D. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 87-94, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 726–740, 2010.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. M.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. In Vitro and In Vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megazol against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2023-2031, 2010.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; HENRIQUE-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; CASTRO, S. L. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 0-11, 2011.

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

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 113-114, 2007.

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

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

SIMÕES, L. M. C.; GREGORIO, L. E.; DA SILVA, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIN, Y. M.; Effect of Brazilian green propolis



on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669–675, 2006.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1025-1029, 2007

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMONA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 249-254, 2006.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, p. 1-13, 2007.

TSAO e DENG, 2004 TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85–99, 2004.

Sítio do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Disponível em: [http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013\\_09\\_20\\_BO\\_Agosto\\_Agronegocio\\_Propolis2.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf) Acesso em: 04 de Abril de 2015.

VALENÇA, I.; MORAIS-SANTOS, F.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; FERREIRA, A. M.; ALMEIDA-AGUIAR, C.; BALTAZAR, F. Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNANDEZ-LOPEZ, F., PEREZ-ALVAREZ, J.A. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 117-124, 2008.

WANG, K.; HU, L.; JIN, X-L.; MA, Q-X.; MARCUCCI, M. C.; et al. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- $\kappa$  B. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 464–478, 2015.

WHANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, p. 237-243, 2004.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apicult Res**, v. 37, p. 99–105, 1998.

YE, Y.; HOU, R.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; MO, Z. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, p. 263–267, 2012.

ZHANG, X.; BI, L.; YE, Y.; CHEN, J. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway. **Nutrition and Cancer**, v. 66, p. 656–661, (2014).

## **Capítulo II**

---

**Artigo I: Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: uma  
prospecção baseada em documentos de patentes**

Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: uma prospecção baseada em documentos de patentes

Silva, R. P. D.\*; Machado, B. A. S.; Costa, S. S.; Barreto, G. A.; Padilha, F. F.; Umsza-Guez, M. A.

## **Application of propolis extract in food products: a prospecting based in patents documents**

### **Abstract**

Due to the characteristics of propolis, their extracts have been used in various products which has its technology developed and protected by patent documents. The aim of the study was to perform a technological forecasting of the application of propolis extracts in food products. The search was conducted in the online base of Espacenet and INPI. The results showed that Japan stands out as the largest holder of technology researched despite import almost the totality of propolis from Brazil. The Brazil despite being third in the world production of propolis, does not have a domain protection of this technology.

**Keywords:** propolis, food, industrial property, patents, technology prospecting.

### **Resumo**

Devido às características da própolis, seus extratos têm sido utilizados em diversos produtos, que tem sua tecnologia desenvolvida e protegida por documentos de patentes. O objetivo do estudo foi realizar uma prospecção tecnológica sobre a aplicação de extratos de própolis em produtos alimentícios. A busca foi realizada na base online do Espacenet e do INPI. Os resultados demonstraram que o Japão destaca-se como o maior detentor da tecnologia pesquisada apesar de importar quase a totalidade do produto do Brasil. O Brasil mesmo estando em terceiro lugar na produção mundial de própolis, não possui ainda um domínio de proteção dessa tecnologia.

**Palavras-Chave:** própolis, alimentos, propriedade industrial, patentes, prospecção tecnológica.

\*Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Campus Universitário de Ondina, 40.170-290, Salvador-BA, Brasil.  
repinna@yahoo.com.br

## **Aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios: uma prospecção baseada em documentos de patentes**

Rejane Pina Dantas Silva,<sup>a,b</sup> Bruna Aparecida Souza Machado,<sup>b,c</sup> Samantha Serra Costa,<sup>b</sup> Gabriele de Abreu Barreto,<sup>b</sup> Francine Ferreira Padilha,<sup>c</sup> Marcelo Andrés Umsza-Guez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Campus Universitário de Ondina, 40.170-290, Salvador-BA, Brasil.

<sup>b</sup>Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Avenida Orlando Gomes, 1845, Piatã, CEP 41650-010, Salvador, BA, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Tiradentes - UNIT, Avenida Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-971, Aracaju, SE, Brasil.

repinna@yahoo.com.br

- 1. Introdução**
- 2. Metodologia**
  - 2.1 Estratégia de Busca**
  - 2.2 Escopo**
- 3. Resultados e Discussão**
- 4. Conclusão**

## 1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas melíferas de diferentes fontes vegetais (MARCUCCI et al., 2001). A própolis vem sendo utilizada na medicina tradicional desde os tempos antigos, devido a suas propriedades biológicas (MARCUCCI et al., 2001; SILVA et al., 2006). O Brasil é um dos principais produtores mundiais de própolis, com uma produção de aproximadamente 50 a 150 toneladas por ano, sendo 75% desse total é exportado, principalmente para o Japão (97% das exportações) (LIMA, 2015) o que significa 80% da demanda japonesa (PEREIRA et al., 2002). O aumento do interesse pelo extrato de própolis brasileira, já inserido no contexto do comércio internacional de alimentos, tem gerado o aumento do valor agregado do produto, e esse incremento é significativamente positivo para a economia do país (SEBRAE, 2015). A Federação de Apicultores de Minas Gerais apontam que a própolis produzida no Estado é muito valorizada pela sua alta qualidade no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos. Todas essas características panaceias e agregado ao fato de a própolis possuir um alto valor agregado justificam o grande interesse global de pesquisas envolvendo a própolis (PEREIRA et al., 2002).

Mais de 200 componentes diferentes já foram identificados e/ou caracterizados em amostras de própolis, como ácidos graxos, fenólicos, ésteres e flavonoides, além de terpenos, aldeídos e álcoois aromáticos (MARCUCCI et al., 2001; SILVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2002; AGA et al., 1994). O sabor, a cor, o odor, a consistência, a composição química e a atividade biológica da própolis dependem diretamente das espécies vegetais que lhe deram origem e da época do ano em que foram produzidas (MARCUCCI et al., 2001; PAULINO, 2007). Essa complexa composição dificulta a padronização da própolis para comercialização, uma vez que, os diferentes componentes biologicamente ativos da própolis podem variar (NUNES et al., 2009). Porém, essa também é uma das principais justificativas para a grande diversidade e quantidade de estudos com diferentes amostras dessa matriz natural (COSTA et al., 2013).

Devido as suas importantes características, a própolis é cada dia mais usada em aplicações industriais. Os extratos de própolis têm sido utilizados em produtos alimentícios, preservação de diversos produtos, cosméticos e produtos

de higiene, produtos fármacos, e preparações para finalidades médicas e odontológicas como pode ser evidenciado em diferentes estudos prospectivos envolvendo a própolis. Pereira et al., (2002) avaliaram os avanços dos estudos envolvendo a própolis, os autores levantaram o número de trabalhos publicados e também os pedidos de patentes, onde percebeu que há um crescimento quase exponencial do número de publicações bem como nos depósitos de patentes. Da mesma forma Lutosa et al., (2008) evidenciou que de 2003 até o início de 2008 houve um maior aprofundamento nos estudos relativos a própolis com um exponencial interesse pela matriz, sua composição química e atividade biológica. Recentemente, Machado et al., (2012) realizaram um estudo prospectivo da própolis e suas tecnologias correlatadas dentro do cenário brasileiro, onde foi identificado o panorama nacional atual da proteção de processos e produtos relacionados a essa matriz, relacionando os documentos de patentes depositados no Brasil.

De acordo com o Codex Alimentarius, (2011) alimento é qualquer substância, tanto processada, semi-processada ou crua, utilizada na intenção de consumo humano, incluindo bebidas, gomas de mascar e qualquer substância que seja usada em manufatura, preparação, conservação ou tratamento de alimentos. A cada dia, as pesquisas envolvendo a aplicação de própolis em alimentos se destacam e tendem a se tornarem frequentes diante do cenário favorável para aplicação dessa matriz natural nos mais diferenciados processos de alimentos levando em consideração suas excelentes propriedades biológicas que este produto apresenta (WANG et al., 2009; LACERDA et al., 2008).

Com isso, o objetivo do estudo foi realizar uma prospecção tecnológica baseada em documentos de patentes depositados no mundo sobre a aplicação de extrato de própolis em produtos alimentícios. A prospecção foi realizada utilizando a ferramenta de busca de anterioridade, através da qual é possível avaliar se a tecnologia em questão já foi desenvolvida e apropriada, realizar um levantamento de todas as tecnologias existentes, identificar as tecnologias concorrentes e lacunas a serem preenchidas. Além disso, é possível identificar os inventores, os países de origem dos depósitos, as principais empresas depositantes e a classificação dos depositantes (QUINTELLA et al., 2011).

## 2 METODOLOGIA

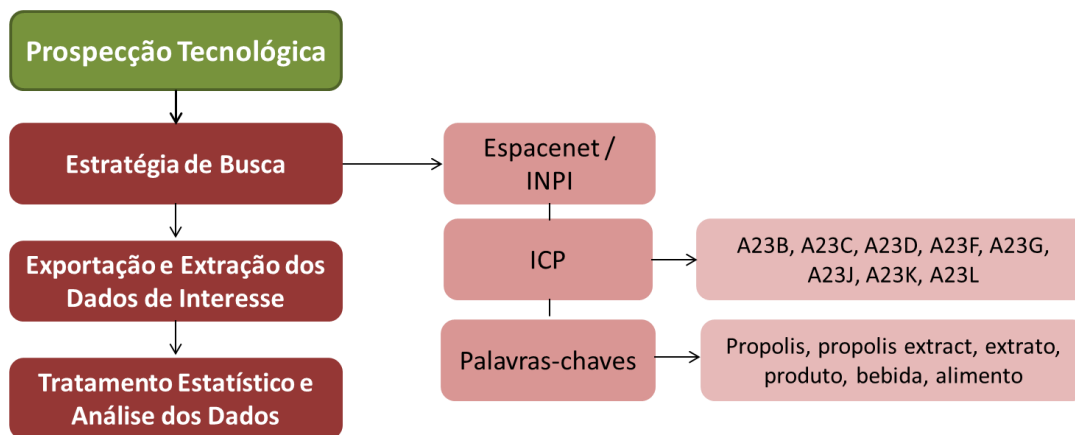
### 2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA

A busca foi realizada na base online do Escritório Europeu de Patentes (Espacenet), uma base de acesso livre para prospecção e buscas de anterioridade, e que, compila mais de oitenta milhões de documentos de patentes depositados em mais de 90 países, e na base de dados online do escritório nacional, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), que compila o acervo de patentes depositadas no Brasil. A metodologia adotada para a busca da tecnologia descrita em documentos de patentes (Figura 1) foi à combinação do campo da Classificação Internacional de Patentes (IPC) que especifica a categoria que o assunto de interesse está classificado, associado a uma combinação de palavras-chave contidas no título ou resumo do documento protegido para identificação da matriz estudada. Neste caso o ICP foi limitado a utilização dessa tecnologia em alimentos, inseridos nas classificações: A23B, A23C, A23D, A23F, A23G, A23J, A23K e A23L; associados a palavras-chave (propolis, propolis extract, extrato, produto, bebida, alimento).

Através do editor CSVed.exe foi possível exportar e extrair os dados para uma planilha do Microsoft Excel e analisa-las conforme sua data de depósito e de publicação, tipo de depositante, país de origem, inventores e classificação do documento. Em seguida, os dados extraídos foram tratados, analisados e representados em gráficos que apresentam as informações referentes à tecnologia patenteada, ou seja, a aplicação do extrato de própolis em produtos alimentícios, depositadas em todo o mundo. A Figura 1 apresenta um fluxograma dos passos utilizados para desenvolvimento da prospecção tecnológica a partir das bases de dados utilizadas.



**Figura 1** – Fluxograma de Prospecção Tecnológica.



**Fonte:** Autoria própria

## 2.2 ESCOPO

A pesquisa realizada na base de dados do Escritório Europeu de Patentes com a palavra-chave geral (própolis) resultou em um universo de registros de mais de 2.700 documentos. Ao combinar a palavra-chave com diferentes códigos de classificação definidos previamente (Tabelas 1 e 2) foi possível reduzir a quantidade de documentos identificados refinando a pesquisa de interesse. Após análise dos dados através das diferentes combinações de códigos com a palavra-chave própolis, identificou-se que a melhor pesquisa era representada pela associação do código A23L com as palavras-chave propolis and extract, que resultou em uma identificação de 358 documentos de patentes referentes à tecnologia estudada no Espacenet Worldwide database (Tabela 2).

Após uma análise detalhada dos resumos dos documentos identificados foram selecionados um total de 257 documentos das bases de dados os quais estavam diretamente relacionados com a tecnologia em questão, bem como, excluídos os documentos semelhantes identificados nas duas bases. Destes documentos foram extraídas as informações que deram origem aos dados apresentados e discutidos neste trabalho.

Na Tabela 1 são demonstrados os resultados obtidos após a busca na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e a Tabela 2 apresenta o levantamento realizado na base de dados Europeia (Espacenet) para

os códigos de classificação internacional que abrangem a tecnologia estudada. Assim, foi possível constatar que o maior número de patentes depositadas envolvendo a utilização do extrato de própolis, possui maior concentração na classificação A23L que descreve Alimentos, produtos alimentícios, bebida não alcoólicas, não abrangidas pela subclasse A23B a A23J; seus métodos de preparo; preservação de alimentos em geral.

**Tabela 1** - Palavras-chave em bancos de dados INPI.

Própolis	Extrato	Produto	Bebida	Alimento	INPI
x					104
x	X				49
x		x			31
x			X		5
x				X	2

**Fonte:** A autoria própria

**Tabela 2** - Total de documentos obtidos por busca no Espacenet Worldwide database.

propolis and extract*	A23B	A23C	A23D	A23F	A23G	A23J	A23K	A23L	A23P	EP
x	x									11
x		x								8
x			X							1
x				x						3
x					x					22
x						x				1
x							X			16
x								X		358
x									x	9

A23B: Preservação, carne, peixe, ovos, frutas, legumes, sementes comestíveis; amadurecimento químico de frutas ou legumes; Produtos preservados, amadurecidos, ou enlatados; A23C: Produtos lácteos, por exemplo Leite, manteiga, queijos; Substitutos do leite ou queijo; Método de preparação; A23D: Óleo alimentares, por exemplo margarinas, gorduras, óleos de cozinha; A23F: Café, chá; Seus substitutos; Fabricação, preparação, ou infusão da mesma; A23G: Cacau; Produtos derivados do cacau, por exemplo, chocolate; Substitutos para cacau ou produtos de cacau; confeitaria; Goma de mascar; Sorvete; Método de preparação; A23J: composições de proteínas para o gênero alimentício; Composição de Fosfatidíio; A23K: Forragem; A23L: alimentos; produtos alimentícios, ou não alcoólicos, não abrangidos pela subclasse A23B a A23J; Método de preparação ou tratamento; conservação dos alimentos ou gêneros alimentícios em geral; A23P: Molde ou trabalho de produto alimentício não totalmente cobertos por uma outra subclasse.

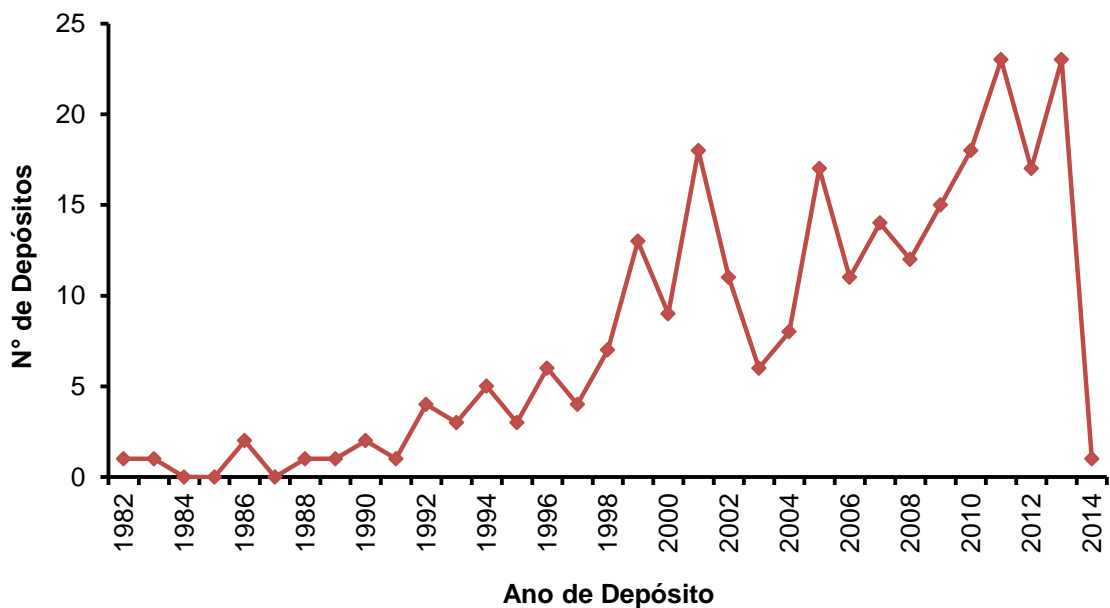
**Fonte:** A autoria própria.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução anual do depósito de patentes encontra-se representada na Figura 2. A primeira patente depositada foi em 1982 e se trata de um tônico com propriedades antibióticas, antibacterianas e viricida para ser utilizado na medicina humana e veterinária e se caracteriza pela composição de extrato de própolis, xarope de açúcar de beterraba, água e aromas. A patente foi depositada por Peter Glienk na Alemanha.

Desde então a produção de depósitos de patentes sobre a utilização extrato de própolis aplicado a produtos alimentícios se manteve baixa até o início dos anos 90. A partir de 1997 houve um crescimento acentuado dos depósitos de patentes.

**Figura 2** - Evolução anual do depósito de patentes relacionadas ao uso de própolis em produtos alimentícios (1982 - 2014)



**Fonte:** Autoria própria.

Nas décadas de 80 e 90 os principais países do mundo em número de publicações (Rússia, Japão, Itália, Bulgária e Polônia) tiveram um crescimento significativo em números de publicações sobre própolis. O Japão em destaque apresentou um aumento de 660% nas suas publicações (PEREIRA et al., 2002). Consequentemente esse maior aprofundamento nos estudos relativos a própolis

refletiu no crescimento de depósitos de patentes a partir dos anos 90, com destaque para o ano de 1999 que registrou o depósito de 13 patentes associadas a tecnologia pesquisada. Vale ressaltar que anteriormente a esta década, o depósito de patentes já era observado, porém com base nas propriedades farmacológicas do extrato de própolis, principalmente relacionadas com sua atividade antimicrobiana (PEREIRA et al., 2002).

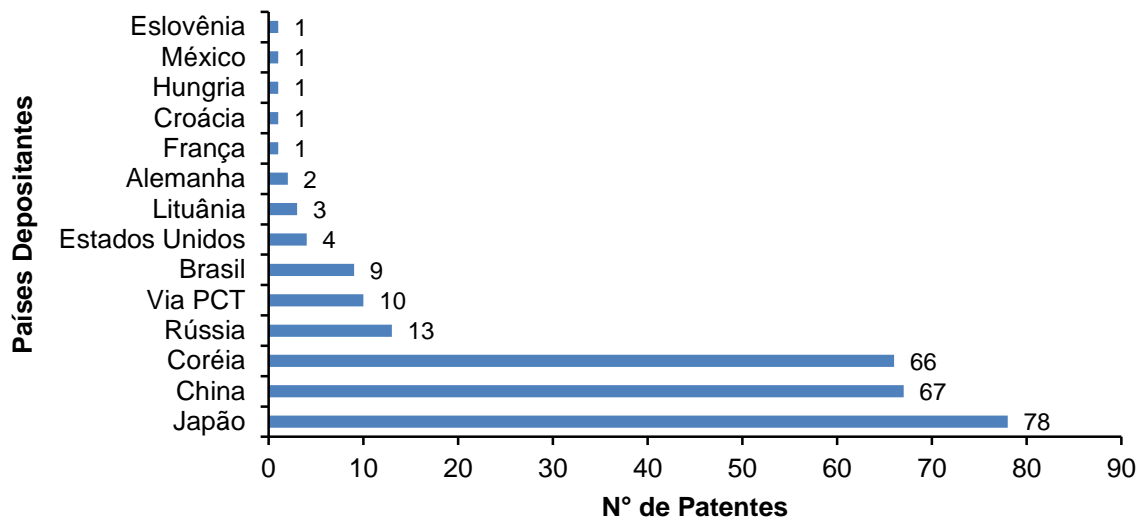
A partir de 2008 nota-se um crescimento mais estável dos depósitos de patentes na tecnologia estudada. Esta tendência pode estar relacionada ao crescimento do mercado de produtos naturais nos últimos 6 anos, observando-se uma aumento acima de 20% por ano (HAYACIBARA et al., 2005; FRANCHISE HELP, 2014).

Com a procura e o consumo de produtos naturais aumentados significativamente, o número de novos produtos inseridos no mercado também cresceu. Neste cenário o uso do extrato de própolis tem destaque por atribuir a um produto alimentício suas características antioxidantes, antimicrobianas, antifúngica e antiviral, substituindo as substâncias sintéticas comumente utilizadas. No ano de 2014 o total de invenções identificadas não representa o valor real, tendo em vista o período de sigilo proposto na legislação patentária, onde os documentos de patentes só são publicados após 18 meses da data do depósito.

Outra pesquisa realizada foi relativa aos principais países depositantes. Dentro do cenário apresentado, o Japão destaca-se como o maior detentor da tecnologia pesquisada. Conforme a Figura 3, o país possui um número de 78 patentes depositadas, o que representa 30% dos documentos de patente identificados. Em segundo e terceiro lugar aparecem a China e a Coréia do Sul com 26% e 25% dos depósitos, respectivamente. Estes dois países também são grandes pesquisadores na área da tecnologia em questão.

O Brasil juntamente com a Rússia e depósitos via o tratado de cooperação de patentes PCT (Patent Cooperation Treaty) não possui um número expressivo de depósitos, porém demonstram atividade em pesquisas com a aplicação de própolis em produtos com fins alimentícios. Os demais 8 países somados representam apenas 5% dos depósitos encontrados.

**Figura 3** - Distribuição dos depósitos de patentes por país de origem/região relacionados à utilização de própolis em produtos alimentícios (PCT: *Patent Cooperation Treaty*).



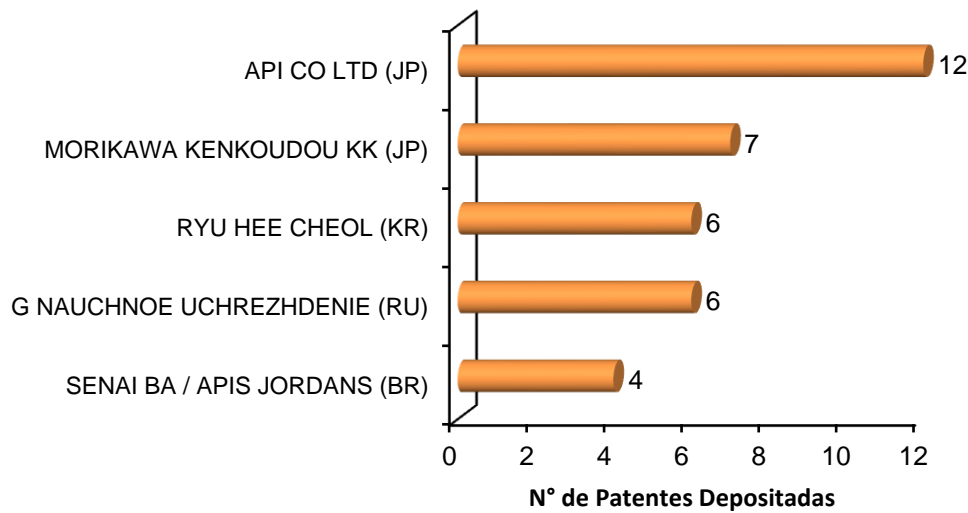
**Fonte:** Autoria própria.

Atualmente o Brasil está em terceiro lugar na produção de própolis mundial, atrás somente da Rússia e da China e, sendo que cerca de 80% da demanda de própolis do Japão é atendida pelas exportações Brasileiras (PEREIRA et al., 2002).

Machado et al., (2012) avaliaram o depósito de patentes relacionadas a própolis no Brasil em toda sua extensão de possibilidades de aplicações e observou que o país não é uma área de interesse para proteção, uma vez que o número de patentes de não residentes é pequeno, refletindo assim a falta de competitividade tecnológica e a necessidade de mais incentivos que aumentem o cenário inovativo do país.

Conforme apresentado na Figura 4, os países produziram suas patentes individualmente, sem associações entre si. Os depositantes que mais produziram foram às empresas japonesas multinacionais de pesquisa e desenvolvimento API CO e MORIKAWA KENKOU DOU KK, com 12 e 7 patentes depositadas respectivamente. A RYU HEE CHEOL da Coreia e a G NAUCHNOE UCHREZH DENIE NII russa depositaram 6 documentos de patentes cada. No Brasil, o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI BA) em conjunto com a empresa Apis Jordans depositou 4 patentes referente a tecnologia estudada.

**Figura 4** - Maiores depositantes de patentes referentes à tecnologia estudada.



**Fonte:** Autoria própria.

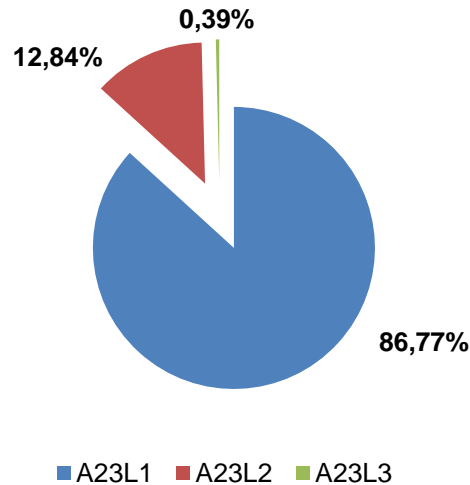
O Brasil possui apenas 9 patentes depositadas referente a utilização de extrato própolis aplicados a produtos alimentícios. Dados de depósitos de patentes indicam que o país possui principal interesse na área relacionada às propriedades médicas, odontológicas e higiênicas da própolis (MACHADO et al., 2012).

As patentes envolvem a produção de bebida energética, água aromatizada e suplemento/complemento alimentar. A primeira patente foi depositada em 1999, e compreendeu a formulação de um suplemento alimentar apiterápico, composto por geleia real, pólen e própolis. Dentro da tecnologia em questão, o Estado da Bahia se destaca com o depósito de 6 patentes das 9 depositadas.

Dentro do código de classificação internacional analisado (A23L), percebe-se uma concentração de depósitos de patentes na subclasse A23L1, que contempla de modo geral os alimentos ou produtos alimentícios e suas preparações, representando 233 das patentes depositadas. Com uma porcentagem bem menor de incidência, 33 patentes depositadas, aparece a subclasse A23L2 que especifica a categoria das bebidas não alcoólicas, composições em pó ou concentradas e seus métodos de preparação. Por fim, aparece a categoria A23L3, com apenas 1 patente depositada. Esta última subclasse compreende produtos

para preservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral. A distribuição por incidência nas subclasses é apresentada na Figura 5.

**Figura 5** - Distribuição por incidência nas subclasses.



**Fonte:** Autoria própria.

Sendo assim, percebe-se que a grande maioria dos produtos alimentares adicionados de própolis existentes hoje no mercado tem o objetivo de conferir características benéficas à saúde, considerados como alimentos funcionais, como leite em pó, chá e bebidas fermentadas. Também são encontrados produtos que possuem a adição de própolis para prevenção da alteração da qualidade microbiológica dos mesmos, agindo como conservante do produto.

As publicações referentes à aplicação de própolis em produtos para fins alimentícios têm avançado. Várias são as pesquisas recentemente relatadas nesta área, como por exemplo, estudos sobre a possibilidade de utilização de própolis como aditivo natural em sucos de maçã (LUIS-VILLAROYA et al., 2015) e utilização de própolis como preservação natural de filés frescos de peixes (DUMAN & OZPOLAT, 2014). Além disso, novas áreas também tem sido exploradas para a aplicação de própolis, como na alimentação animal. Estudos relatam a aplicação da própolis em dietas de frangos (MAHMOUD et al., 2015), avaliação do efeito de produtos à base de própolis na produção de leite, na composição de ácidos do leite e na capacidade antioxidante do leite de vacas leiteiras em lactação média (AGUIAR et al., 2014).

Dessa forma, percebe-se que o campo de aplicação da própolis é bastante vasto, e que esse potencial vem sendo explorado cada dia mais.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir da busca de dados foi possível concluir que o Japão é o país detentor da aplicação da tecnologia estudada, apesar de o país importar a maior parte da matéria-prima em questão, a própolis. O Brasil apesar de estar em terceiro lugar na produção mundial de própolis, não possui ainda um domínio de proteção dessa tecnologia, apresentando apenas um total de 9 depósitos dentro de um universo de 257 patentes depositadas no período estudado. Portanto, se faz necessário o entendimento por parte das indústrias, centros de pesquisas e desenvolvimento e academias de que o hábito de proteger suas atividades por meio do depósito de patentes é essencial para a competitividade, notoriedade e desenvolvimento do país.

#### REFERÊNCIAS

- AGA, H.; SHIBUTA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 945-946, 1994. [[CrossRef](#)]
- AGUIAR, S. C.; COTTICA, S. M.; BOEING, J. S.; SAMENSARI, R. B.; SANTOS, G. T.; VISENTAINER, J. V.; et al. Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. **Animal Feed Science and Technology**, v. 193, p. 148-154, 2014. [[CrossRef](#)]
- COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2013. [[CrossRef](#)]
- DUMAN, M.; OZPOLAT, E.; Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) filets during chilled storage. **Food Chemistry**, in press, 2014. [[CrossRef](#)]
- Franchise Help Page. Disponível em: <<https://www.franchisehelp.com/industry-reports/green-industry-report/>>. Acesso em: 26 de novembro de 2014.



HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BROWN, W. H.; et al. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 110-115, 2005. [\[CrossRef\]](#)

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; ALENCAR, S. M. Própolis e segurança alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, p. 99-106, 2008. [\[Link\]](#)

LUIS-VILLARROYA, A.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; BAYARRI, S.; PÉREZ, C.; PAGÁN, R. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 90-97, 2015. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

LIMA, G., Estudo sobre Mel, Cera e Própolis. Disponível em: <[http://gestaoportal.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca/estudo\\_mel\\_cera\\_propolis.pdf](http://gestaoportal.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca/estudo_mel_cera_propolis.pdf)> Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

LUTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008. [\[CrossRef\]](#)

MACHADO, B. A. S.; CRUZ, L. S.; NUNES, S. B.; UMSZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista Geintec**, v. 2, p. 221-235, 2012. [\[CrossRef\]](#)

MAHMOUD, U. T.; ABDEL-RAHMAN, M. A. M.; DARWISH, M. H. A.; APPLGATE, T. J.; CHENG, H.; Behavioral changes and feathering score in heat stressed broiler chickens fed diets containing different levels of propolis. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 166, p. 98-105, 2015. [\[CrossRef\]](#)

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; DANTAS, A. P.; et al. Phenolic compound from brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001. [\[CrossRef\]](#)

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha em bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009. [\[CrossRef\]](#)

PAULINO, F. D. G. Em *Produtos da Colmeia em Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural*; Souza D. C., ed.; SEBRAE: Brasília, 2004, cap. 18.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Revista Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002. [\[CrossRef\]](#)

QUINTELLA, C. M.; MEIRA, M.; KAMEI, A. G.; TANAJURA, A. S.; SILVA, H. R. G. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 406-415, 2011. [\[CrossRef\]](#)

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.99, p. 431-435, 2006. [[CrossRef](#)]

Sítio do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Disponível em: <[http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013\\_09\\_20\\_BO\\_Agosto\\_Agronegocio\\_Propolis2.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf)> Acesso em: 04 de Abril de 2015.

WANG, L.; LIN, Y.; LIANG, Y.; YANG, Y.; LEE, J.; YU, H.; et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. **BMC Immunology**, v. 10, p. 1-13, 2009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

World Health Organization/Food and Agriculture Organization. *Codex Alimentarius Commission*. Procedural Manual. 20th ed., Rome, 2011.

## **Capítulo III**

---

**Artigo II: Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts**

# **Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts**

Rejane Pina Dantas Silva<sup>1,2¶\*</sup>, Bruna Aparecida Souza Machado<sup>2¶</sup>, Gabriele de Abreu Barreto<sup>2&</sup>, Samantha Serra Costa<sup>1&</sup>, Luciana Nalone Andrade<sup>3&</sup>, Ricardo Guimarães Amaral<sup>3&</sup>, Adriana Andrade Carvalho<sup>4&</sup>, Francine Ferreira Padilha<sup>5&</sup>, Marcelo Andres Umsza-Guez<sup>1¶</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup>Faculty of Technology, SENAI/CIMATEC, National Service of Industrial Learning – SENAI, Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristovão, Sergipe, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, Lagarto, Sergipe, Brazil;

<sup>5</sup>Institute of Research and Technology, Tiradentes University, Aracaju, Sergipe, Brazil.

\*Corresponding author:

E-mail: [repinna@yahoo.com.br](mailto:repinna@yahoo.com.br)

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

## **ABSTRACT**

Propolis is known for its biological properties, and has been continuously investigated in an attempt to solve the problem of standardization, which limits the propolis use in food and pharmaceutical industry. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant, antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic properties of red, green, and brown propolis extracts from different regions of Brazil, obtained by the ethanolic and the supercritical extraction methods. From the assays, the results showed that the antioxidant activity of ethanolic and supercritical propolis extracts increase as the extracts concentration increased. The extracts obtained by the ethanolic extraction showed higher antioxidant activity than the supercritical extracts. The ethanolic extracts of red propolis presented the best results, with 98% of

antioxidant activity in the high extract concentration. When it was evaluated the antimicrobial activity, the red propolis extract obtained by the ethanolic and supercritical methods showed the highest antimicrobial activity against the bacteria tested. Most extracts demonstrated antimicrobial activity against *S. aureus*, a food-related microorganism. No activity against *E. Coli* or *C. albicans* was found for any extracts analyzed. The inhibition effect on *T. cruzi* epimastigotes Y strain growth was observed in all ethanolic extracts tested in the first 24 h, however just the red propolis extract kept the inhibition after 96 h. Only the ethanolic extracts of red propolis (R01Et and R02Et) showed cytotoxic effect against all four cancer cell lines tested (HL-60, HCT-116, OVCAR-8 and SF-295), and the results for both extracts indicate that the red propolis extracts have greater cytotoxic potential. The results suggest that propolis extracts may be useful as a preservative and a bioactive food supplement or additive in the food industry. Also, the results demonstrated by ethanolic extracts of red propolis suggest it's as a potential alternative therapeutic treatment against Chagas disease and some types of cancer, after further investigations *in vivo*.

**Key words:** ethanolic extracts, supercritical extracts, *T. cruzi*, cytotoxic, red propolis.

## 1 INTRODUCTION

The use of propolis has been reported since ancient times, dating back to periods BC, using for skin treatments and wounds and ulcers healing (GHISALBERTI, 1979) but, the propolis constituents and biological properties first have been studied in the recent decades (SFORCIN, 2007).

Due to the great biodiversity of Brazil, propolis from different geographic regions may vary in their composition, and because of that different types of propolis are found in Brazil (MARCUCCI et al., 2001; SAWAYA et al., 2004). Currently, Brazil has 13 different groups of propolis along its entire length. The group 13 of propolis, recently found in the Northeastern region found is characterized by a strong red color and by a different characteristics from the other propolis groups found in the country (DAUGSCH et al., 2008; PARK et al., 2002) and in 2012, red propolis from Alagoas and its extract were given the certificate of Geographical Indication (GI) by the Brazilian National Institute of Industrial Property (INPI) (MAPA, 2012).

Propolis has been extensively investigated, since this matrix has several properties of interest for the scientific community. The biological activity of propolis has been reported, mainly in relation to propolis antioxidant activity (AHN et al., 2007; CHOI et al., 2006; MOREIRA et al., 2008), antimicrobial and cytotoxic properties (NEDJI et al., 2014; GRAIKOU et al., 2016; TOSI, et al., 2007; DUMAN & OZPOLAT, 2015; OSÉS et al., 2016). Additionally, an increasing number of studies are being performed to investigate the antiparasitic properties of propolis (DANTAS et al., 2016; SALOMÃO et al., 2011; PRYTZYK et al., 2003).

The propolis chemical composition depends on various factors, such as its botanical origin, geographical origin and collection time and others (BANKOVA, 2015; MARCUCCI, 1995). Bankova (2015) reported that the process of standardization of propolis have good results when it is based on the classification according to the plant source used by the bees for collect, but there is still need for further research to achieve a reliable results. The standardization problem limits the application of propolis in the food and pharmaceutical industry (GRAIKOU et al., 2016).

Propolis extracts are obtained by different extraction methods as a conventional technique using ethanol for the solvent of extraction and alternative methods such as supercritical fluid extraction (SFE) (BISCAIA & FERREIRA, 2009). It is noted that the extraction method also influences the obtaining extracts. Different results can be shown for different extracts from the same propolis sample used. The yield and the selectivity for some compounds is directly affected depending of the extraction method (MACHADO et al., 2015; COTTICA et al., 2011; CHRISTOV et al., 2005).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of red, green, and brown propolis extracts from different regions of Brazil obtained by two different extraction methods, the ethanolic and the supercritical extraction method.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 REAGENTS

Ethanol (HPLC grade) was obtained from Merck Co. (Darmstadt, Germany). Doxorubicin (> 98% purity), resazurin, and potassium persulfate were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) 99.9% purity, was bought from White Martins Gases Industriais – São Paulo, Brazil. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS) and (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.2 SAMPLE PREPARATION

The propolis samples were donated by Apis Nativa Produtos Naturais LTDA Company and were obtained from different regions in Brazil. Table 1 below shows the sample propolis identification.

**Table 1.** Propolis sample identification by the color, region, and state of origin.

Identification	Color	Region	State of Origin
R01	Red	Northeast	Sergipe
R02	Red	Northeast	Alagoas
G01	Green	Southeast	Minas Gerais
G02	Green	Southeast	Minas Gerais
G03	Green	South	Paraná
B01	Brown	South	Santa Catarina
B02	Brown	South	Rio Grande do Sul
B03	Brown	South	Paraná

### 2.3 ETHANOLIC EXTRACT PRODUCTION

Tritured propolis (2 g) was extracted with ethanol (15 mL, 80%) by mixing the samples for 30 min under constant agitation (Incubation Shaker MA 420/MARCONI – Brazil) at 70°C and 710 rpm. The extract was recovered by centrifugation (Centrifuge SIGMA 2-16 KL) at 8800 rpm and 5°C for 11 min. An

additional centrifugation step was performed with 10 mL ethanol (80%). The supernatant was collected, homogenized, and kept at 50°C until completely dry. Afterwards, the extracts were stored in tubes, covered with aluminum foil and in inert atmospheric conditions (N<sub>2</sub>) to avoid degradation. All extracts were kept at 5°C until use (PARK et al., 2002).

## 2.4 SUPERCRITICAL EXTRACT PRODUCTION

To obtain the propolis extracts, a Supercritical Fluid Extractor SFT-110 (Supercritical Fluid Technologies, Inc.) pilot unity was used. In each experiment, the extraction cell was composed of 7.5 g of triturated propolis sample with 1% ethanol co-solvent (m/m), wool and glass pearls. The extraction conditions were as follows: pressure of 350 bar, temperature of 50°C, 1% co-solvent (ethanol m/m), CO<sub>2</sub> flow of 6 g/min. The extraction time is about 2 h 30 min (MACHADO et al., 2015). The extracts collected in a vial were stored covered in aluminum foil and inert atmospheric conditions (N<sub>2</sub>) to avoid degradation. The extracts were kept at 5°C until use (PARK et al., 2002; MACHADO et al., 2015).

## 2.5 DETERMINATION OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY

The *in vitro* antioxidant activity was determined by the ABTS method. ABTS analysis was performed according to Van der Berg et al. method (VAN DEN BERG et al., 1999), modified by Kim et al. (2003). First, 7 mM ABTS solution was prepared in distilled water and from that, an aliquot of 5 mL was removed and 88 µL of 2.45 mM potassium persulphate was added to produce the ABTS<sup>•+</sup> radical. The final product was incubated for 16 h in the absence of light in order to enable production of the ABTS<sup>•+</sup> radical cation. The solution of ABTS<sup>•+</sup> radical was diluted in ethanol until it reached  $0.70 \pm 0.500$  absorbance as read at 734 nm.

The extract samples were diluted at 1 mg.ml<sup>-1</sup>, 0.75 mg.ml<sup>-1</sup>, 0.5 mg.ml<sup>-1</sup>, and 0.1 mg.ml<sup>-1</sup>. In a dark place, an aliquot of 20 µL of each sample was transferred to a test tube containing 2 mL of the ABTS<sup>•+</sup> final solution. After 6 min of incubation, the absorbance of the samples was read at 734 nm. The results



were expressed in TEAC (antioxidant activity equivalent to Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchromo-2-carboxylic acid)).

## 2.6 ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) and *Enterococcus sp* (ATCC 29712), the gram-negative bacteria *Klebsiella sp* (ATCC 1706 / 700603), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and the pathogen fungi *Candida albicans* (ATCC 18804) were used for the antimicrobial test. The strains were supplied by the Bacteria Cultures Collection of the Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Manguinhos - Rio de Janeiro - Brazil).

Tested bacteria were activated in liquid BHI (Brain Heart Infusion) (Sigma-Aldrich Chemical Co. - St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 24 h. Sequentially they were grown in BHI agar plates for inoculum preparation and adjusted to 0.5 McFarland standard scale turbidity equivalent in a concentration of  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL. It was performed 1:10 dilutions in broth to yield a suspension of  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL (pre-inoculum), which was used in the tests. The fungal inoculum was determined from a subculture on Potato Dextrose Agar (PDA - Sigma-Aldrich Chemical Co. - St. Louis, MO, USA) for 24 h at 35 °C, in order to ensure its purity and viability. Then, five strains of the fungal culture were suspended in sterile saline solution and vortexed for 15 seconds. The concentration of cells were adjusted to a standard liquid suspension with RPMI 1640 medium containing  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the EtOH and SO<sub>2</sub> extracts were determined by the 96-well plate microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS , 2000; KOO eta al., 2000). In determining the MIC, the initial inoculum was  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL for bacteria tested and  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL for fungi tested, and the concentrations of the extracts decreased from 1000 to 31.3 µg.ml<sup>-1</sup>. Resazurin (0.01% m/v) (Sigma, ST. Louis, MO, USA) was used for results read. The MIC was defined as the lowest concentration inhibiting bacterial growth (without visible growth).

## 2.7 *IN VITRO* ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI* (*T. CRUZI*) EPIMASTIGOTES Y STRAINS

Assays were performed with the epimastigotes Y strain of *T. cruzi* donated by FIOCRUZ (Salvador-Bahia-Brazil). Epimastigotes were cultivated in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS - Sigma-Aldrich) and 1% hemin e 1% R9 (Sigma-Aldrich) at 26°C and harvested during the exponential phase of growth. Then, the cell suspension was centrifuged at 2500 rpm for 12 min until parasites reached a cell density of  $3 \times 10^6$  epimastigotes/mL. The susceptibility of *T. cruzi* to propolis was assessed at concentrations of  $75 \text{ mg.ml}^{-1}$  and  $300 \text{ mg.ml}^{-1}$ , and the assay plates were subsequently incubated at 26°C. After 24 h and 96 h, the epimastigotes that remained alive were counted using a Neubauer chamber (DA SILVA et al., 2009; VEIGA-SANTOS et al., 2010).

## 2.8 *IN VITRO* CYTOTOXICITY

The cytotoxicity of propolis extracts against four human tumor cell lines was evaluated. The cell lines used were OVCAR-8 (ovarian cancer cells), HCT-116 (colon cancer cells), HL-60 (leukemia), and SF-295 (glioblastoma); all were donated by the National Cancer Institute (USA). Cytotoxicity was determined by the capacity of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT assay) to a purple formazan (MOSSMAN, 1983). Cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®) and 1% antibiotic penicillin at 37°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>. All cell lines were seeded at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL in 96-well plates. After 24 h, the extracts ( $50 \text{ µg/mL}$ ) dissolved in DMSO (1%) were added to each well.

The plates were incubated for 72 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. As a negative control (untreated cells), cells treated with pure and sterile DMSO (1%) alone (without propolis sample) were used. The positive control used was  $100 \text{ µg.mL}^{-1}$  doxorubicin (purity > 98%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Positive controls were maintained under the same conditions as the treated cells

(AMARAL et al., 2015). Then, the plates were centrifuged and the medium was replaced by fresh medium (150  $\mu\text{L}$ ) containing  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT. The plates were incubated for additional 3 h. The absorbance was measured with a spectrophotometric plate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc.) at 595 nm. The propolis extracts were assessed for their median inhibitory concentration able to induce 50% of maximal effect ( $\text{IC}_{50}$ ).

## 2.9 STATISTICAL ANALYSIS

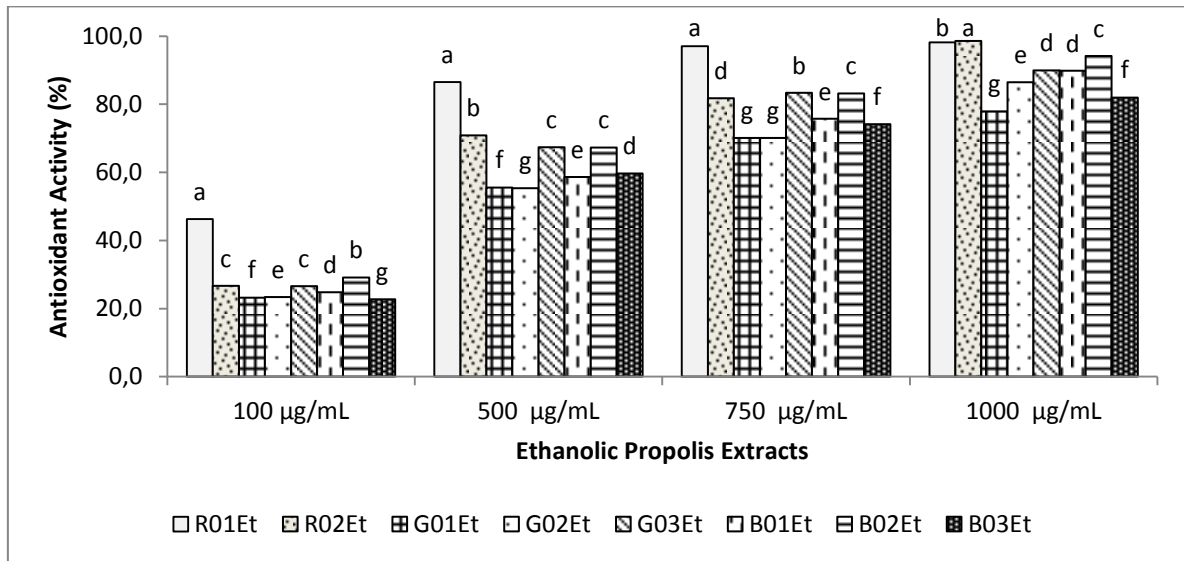
Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean or the half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values. The 95% confidence intervals were obtained through nonlinear regression. Statistical significance was evaluated using analysis of variance (ANOVA) with the program Statistica® 6.0 from StatSoft (Tulsa, USA), and the Tukey test was used to determine the significant differences among the means ( $p < 0.05$ ) of each different group.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

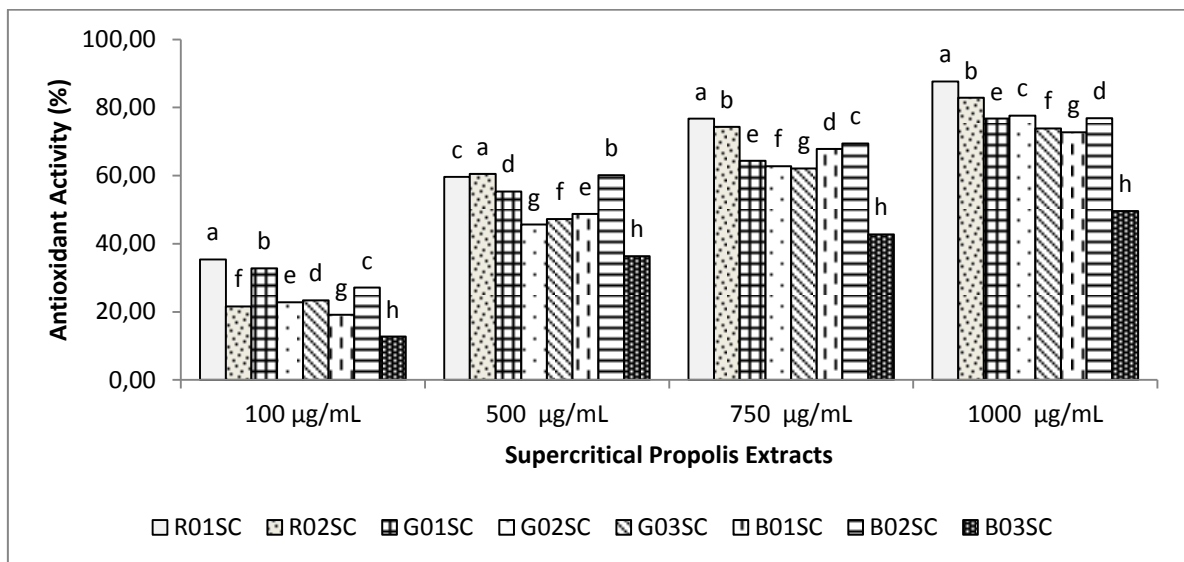
### 3.1 ANTIOXIDANT ACTIVITY *IN VITRO*

The antioxidant activity of the ethanolic and supercritical extracts analyzed in this study is presented in Fig 1.

**Fig 1** - Determination of antioxidant activity of the propolis extracts from different regions of Brazil by the ABTS method, using four different concentrations (100, 500, 750, and 1000  $\mu\text{m}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), expressed as a percentage of antioxidant activity.

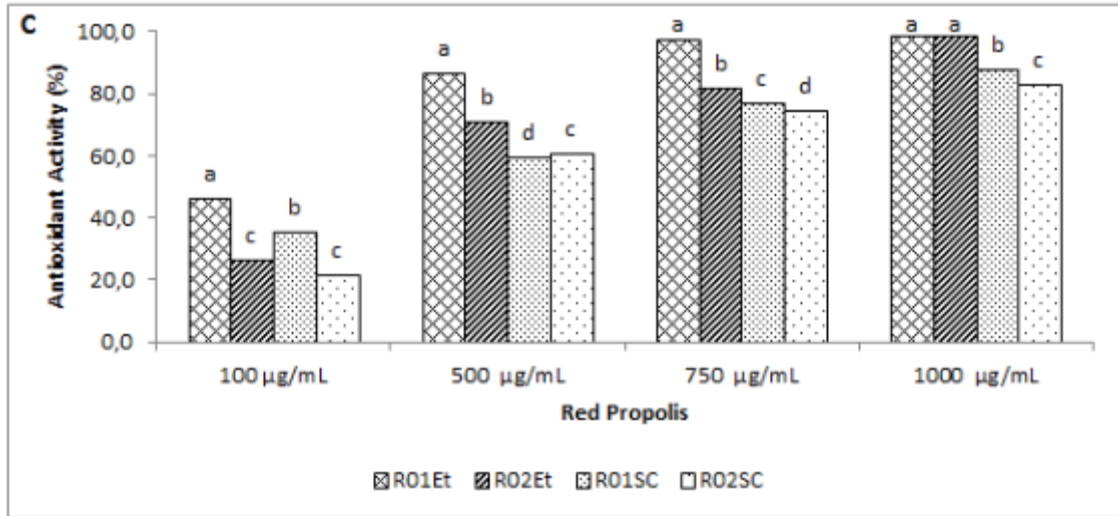
**Fig 1A** – Extracts obtained by ethanolic extraction.

Values showing different letter on the same concentration for different propolis extracts show significant difference ( $p > 0.05$ ) through the Tukey test at 95% confidence level. Et – Extracts obtained by ethanolic extraction. Average of analysis obtained in triplicate ( $n = 3$ ).

**Fig 1B** – Extracts obtained by Supercritical extraction.

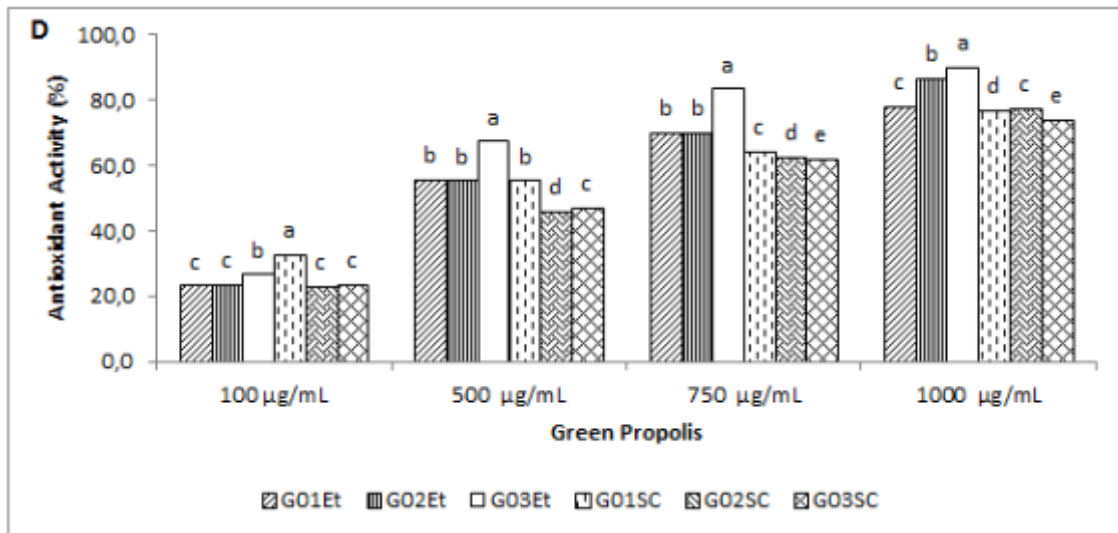
Values showing different letter on the same concentration for different propolis extracts show significant difference ( $p > 0.05$ ) through the Tukey test at 95% confidence level. SC – Extracts obtained by Supercritical extraction. Average of analysis obtained in triplicate ( $n = 3$ ).

**Fig 1C** – Comparison between red propolis extracts.



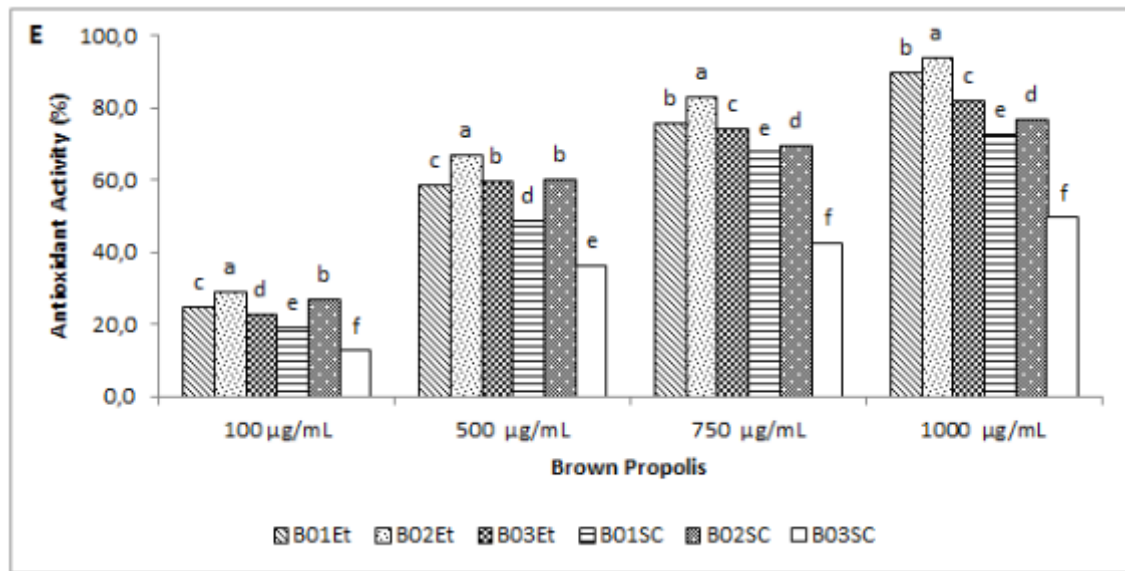
Values showing different letter on the same concentration for different red propolis extracts show significant difference ( $p > 0.05$ ) through the Tukey test at 95% confidence level. Et – Extracts obtained by ethanolic extraction; SC – Extracts obtained by Supercritical extraction.

**Fig 1D** - Comparison between green propolis extracts.



Values showing different letter on the same concentration for different green propolis extracts show significant difference ( $p > 0.05$ ) through the Tukey test at 95% confidence level. Et – Extracts obtained by ethanolic extraction; SC – Extracts obtained by Supercritical extraction.

**Fig 1E** - Comparison between brown propolis extracts.



Values showing different letter on the same concentration for different brown propolis extracts show significant difference ( $p > 0.05$ ) through the Tukey test at 95% confidence level. Et – Extracts obtained by ethanolic extraction; SC – Extracts obtained by Supercritical extraction.

The propolis extracts analyzed in this study showed antioxidant activity (expressed as percentage of antioxidant activity) in four different concentrations (100, 500, 750, and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As shown in Fig 1, the antioxidant effect of ethanolic and supercritical propolis extracts increased in a concentration-dependent manner, the percentage (%) values were very high in a higher concentration of the extract.

All ethanolic extracts at a concentration of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  had high antioxidant activity, with a percentage over 50% and from that, the next two ethanolic extracts concentration showed antioxidant activity above 70%. At a concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , all samples showed weak antioxidant activity (less than 50%). The red propolis ethanolic extract (R01Et) showed strong antioxidant activity of more than 95% when extract concentration was 750 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The supercritical propolis extracts exhibited high antioxidant activity at concentrations above 750  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (over 60%), except for the B03SC samples, which exhibited weak antioxidant activity.

Comparing between the ethanolic and supercritical extraction methods the results presented in Fig 1C, 1D and 1E showed significant differences in most of

the samples analyzed ( $p > 0.05$ ). Only the green extracts did not showed significant difference ( $p < 0.05$ ) between G01Et, G02Et, G01SC and G02SC when the extracts were at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The results confirmed the interference of the extraction method in the composition of the final extract formed.

The propolis antioxidant activity has been attributed to the high content of phenolic compounds and flavonoids existing in this natural matrix (AHN et al., 2007; CHOI et al., 2006; MACHADO et al., 2016; KUMAZAWA et al., 2004). In a previous study done by our research group, the content of phenolic compounds and flavonoids in the same propolis samples was analyzed. Comparing the obtained results in a previous study of this group, the same samples that showed high antioxidant activity also showed high levels of phenolic compounds and flavonoids, while samples with weak antioxidant activity showed low levels of phenolic compounds and flavonoids (MACHADO et al., 2016). Moreover, the ethanolic extracts showed higher antioxidant activity than the supercritical extracts and this result can be related with the preference of polyphenols and flavonoids by ethanol extraction, consequently improving the antioxidant capacity (MACHADO et al., 2016; MIGUEL et al., 2010; COTTICA et al., 2015).

The results obtained in this study corroborates with the studies by Anh et al., (2007) and Choi et al., (2006), those authors showed that the antioxidant activity of propolis extract from China and Korea, respectively, varied according with the region from which the propolis was collected. Also, some authors have described the influence of the extraction method on the antioxidant activity of propolis samples (MACHADO et al., 2015; COTTICA et al., 2011; CHRISTOV et al., 2005; MIGUEL et al., 2010; COTTICA et al., 2015).

In Brazil, because of the country's great biodiversity, it was expected the differences in most of the samples analyzed in this study ( $p > 0.05$ ), as the propolis samples were collected from different geographic regions.

### 3.2 ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The antimicrobial and antifungal properties of propolis have been extensively studied since this natural matrix are suggests to be used as

antimicrobial agents, with different possibilities of applications in pharmaceutical area or food industries (NEDJI et al., 2014).

In this study, the antimicrobial and antifungal activities of propolis were evaluated by determining its MIC when incubated with different pathogens. Table 2 shows the results for *in vitro* antimicrobial activities of propolis extracts obtained by ethanolic and supercritical extraction analyzed in this study.

**Table 2** - Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of extracts from different samples of Brazilian propolis obtained by ethanolic extraction (Et) and by supercritical fluid extraction (SC). MIC is expressed as  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Extracts	<i>Enterococcus</i> <i>sp.</i> ATCC 29712	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 2593	<i>Klebsiella sp.</i> ATCC 1706/ 700603	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 259222	<i>Candida</i> <i>albicans</i> ATCC 18804
R01Et	62.5	125	62.5	>1000	>1000
R02Et	31.3	62.5	31.3	>1000	>1000
G01Et	250	500	500	>1000	>1000
G02Et	250	>1000	>1000	>1000	>1000
G03Et	250	250	>1000	>1000	>1000
B01Et	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
B02Et	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
B03Et	500	1000	>1000	>1000	>1000
R01SC	125	250	250	>1000	>1000
R02SC	62.5	125	62.5	>1000	>1000
G01SC	>1000	250	>1000	>1000	>1000
G02SC	>1000	500	>1000	>1000	>1000
G03SC	>1000	250	>1000	>1000	>1000
B01SC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
B02SC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
B03SC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Minimal inhibitory concentration (MIC) of the red, green, and brown propolis extracts obtained by ethanolic extraction (Et) and by supercritical fluid extraction (SC) at concentrations from 31.3 to 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

From the results obtained in this study, it was observed that red propolis showed the highest antimicrobial activity among the samples analyzed with both extraction methods, ethanolic and supercritical extraction. The R02Et sample (ethanolic red extract from Alagoas) exhibited the best antimicrobial activity,



with MIC of 31.3, 62.5, and 31.3  $\mu\text{g/mL}$  for the bacteria *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella* sp., respectively. Similar results were reported in other research, showing the strong antimicrobial activity of red propolis from Brazil (MACHADO et al., 2015; KOO et al., 2000; ALENCAR et al., 2007). The green extracts exhibited moderate to weak antimicrobial activity (MIC ranging from 250 to 500) for most samples, and extracts of brown propolis did not show any antimicrobial or antifungal activity against most of the bacterial strains and fungi tested.

None of the analyzed extracts showed activity against *E. Coli* or *C. albicans*, and a similar result was obtained by Popova et al. (2011), who analyzed the antimicrobial activity of Mediterranean propolis from Malta, and also by Bankova et al. (1996), who did not observe any inhibitory activity for Brazilian and Bulgarian propolis extracts against a strain of the Gram-negative bacteria *E. coli*. However, other authors have described antimicrobial activity in propolis extracts against *E. coli* and *C. albicans* (GRAIKOU et al., 2016; TOSI et al., 2007; PRYTZYK et al., 2003). This results can be explained by the different chemical properties of propolis extracts, as well as different concentrations of extracts used in the assays.

As seen in this study, some researchers obtained results showing high antimicrobial activity of propolis against Gram-positive bacteria and low antimicrobial activity of propolis against Gram-negative bacteria (MARCUCCI et al., 2001; CHOUDHARI et al., 2012; LU et al., 2005; SILICI & KUTLUCA, 2005; REZENDE et al., 2006; PACKER & LUZ, 2007). Considering that the cell wall of Gram-negative bacteria is chemically more complex, we can conclude that the extract concentration was not enough to inhibit the growth of these bacteria. The results for the fungal test were unexpected, as propolis has been related as a good antifungal agent (CHOUDHARI et al., 2012; KALOGEROPOULOS et al., 2009; CASTALDO & CAPASSO, 2002; PICCINELLI et al., 2001).

Similar to the antioxidant activity, some authors reported that the antimicrobial activity of propolis is dependent of the propolis constituents as a flavonoids, phenolic acids, and other and its interaction (SAWAYA et al., 2004; MELLIYOU et al., 2007; KASOTE et al., 2015).

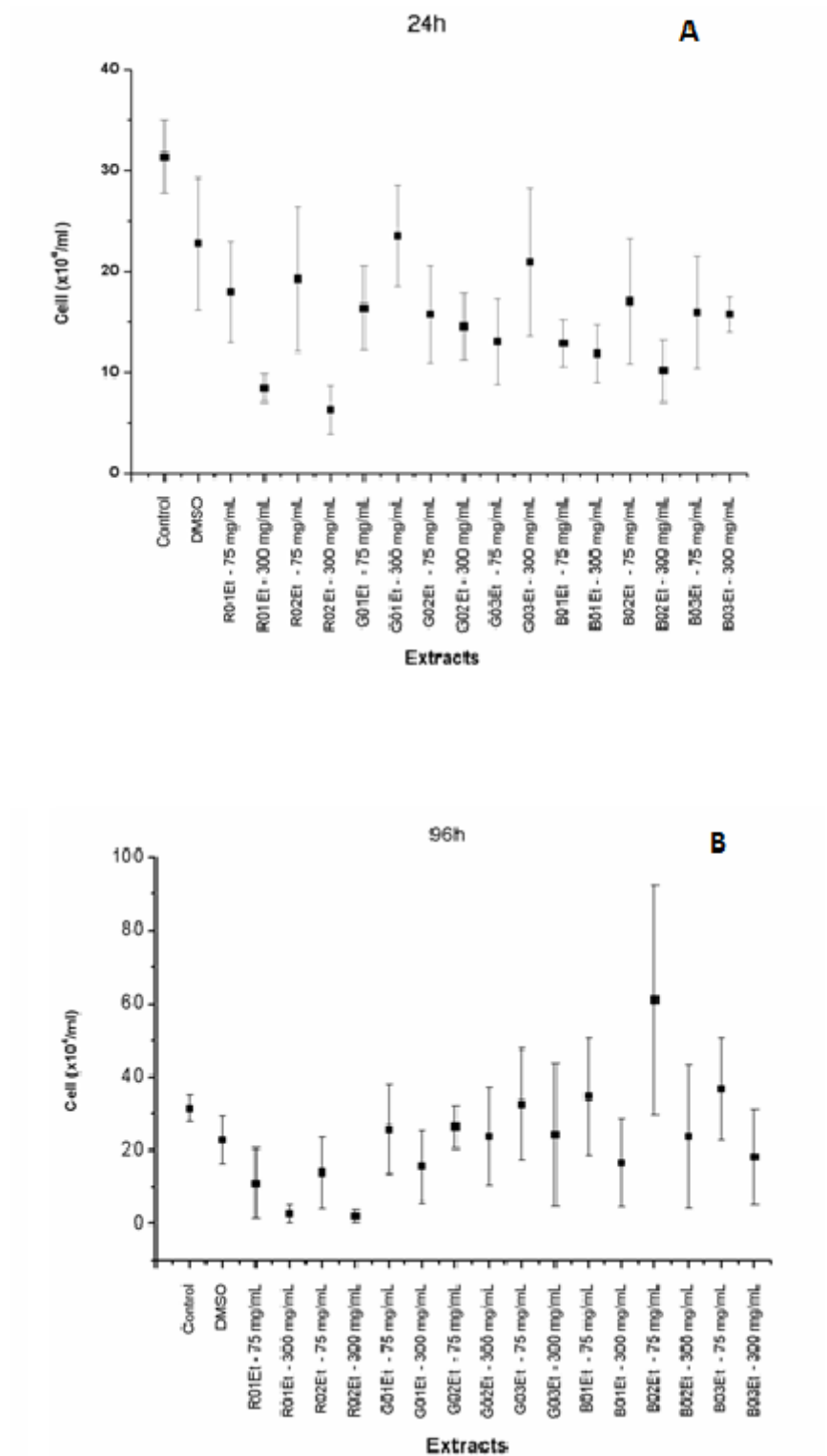
Most extracts analyzed in this study demonstrated a high antimicrobial activity against *S. aureus*, a food-related microorganism. Results involved propolis extracts and activity against *S. aureus* were reported also in other studies (CHOI et al., 2006; NEDJI et al., 2014; POPOVA et al., 2011; CHOUDHARI et al., 2012). Therefore, the antimicrobial results showed by the samples of red and green propolis extracts analyzed, suggest that propolis extracts have high potential as a food preservative against food-related microorganisms.

### 3.3 *IN VITRO* ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS AGAINST *T. CRUZI* EPIMASTIGOTES

Chagas disease is also known as American trypanosomiasis, is a disease that causes death in most cases and is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It is more found in Latin America, transmitted to humans via either the feces of triatomine bugs or the consumption of contaminated food (WHO, 2016). The *T. cruzi* Y strain is characterized as a strain with high pathogenicity, low parasitemias, and more sensitivity to treatment (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001).

This study investigated the effects of Brazilian propolis (red, green, and brown propolis extracts) against epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain). The best antioxidant activity was shown by the ethanolic extracts, and in a previous study, these extracts showed the best levels of flavonoids and phenolic compounds. Thus, they were chosen for *in vitro* evaluation against *T. cruzi* and cytotoxic activity assays. The results are shown below (Fig 2).

**Figure 2** - Activity of the EtOH extracts of different Brazilian propolis against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes Y strains after 24 h (A) and 96 h (B) of incubation with both tested concentrations (75 and 300 mg.mL<sup>-1</sup>).



The inhibitory effect on *T. cruzi* epimastigote growth was observed when ethanolic propolis extracts were added to *T. cruzi* cultures at concentrations of 75 and 300 mg.mL<sup>-1</sup>. In general, all samples analyzed in this study showed high inhibitory activity of *T. cruzi* when compared to the control in the first 24 h. After 24 h, the means of epimastigotes.mL<sup>-1</sup> observed for all extracts analyzed were reduced by more than 90%. The extract of red propolis R02Et showed the highest inhibition, reaching almost 98% in 24 h of incubation.

However, from the tests conducted, it was observed that for green and brown propolis extracts (except for the sample G01Et – 300 mg.mL<sup>-1</sup>), there was a decrease in the epimastigotes inhibition when the incubation time increased from 24 h to 96 h. These results probably indicate uninhibited cell proliferation in the green and brown propolis extracts. This effect was also observed by Salomão et al. (2011), where the effect of different concentrations of green propolis against *T. cruzi* was analyzed, and it was concluded that the inhibition of *T. cruzi* proliferation is dose-dependent. For the red propolis extracts the inhibitory effect increased proportionally to the incubation time, indicating its high biological potential.

The higher level of inhibitory activity was exhibited by the ethanolic extract of the R01Et and R02Et samples (red propolis) when comparing the analyzed extracts. The number of viable cells at 300 mg.mL<sup>-1</sup> after 96 h showed the lowest concentration,  $2.7 \pm 0.7$  and  $2 \pm 0.2 \times 10^4$  epimastigotes.mL<sup>-1</sup> for R01Et and R02Et respectively which indicates a cell reduction of 99%.

As far as we know, there was no previously research available demonstrating the biological activity of red propolis extracts used in this study against *T. cruzi*. Ayres et al. (2007) reported that the ethanolic extracts of Brazilian red propolis were the most active in reducing infections in macrophages of *Leishmania amazonensis*. The differentiated composition of red propolis (PICCINELLI et al., 2001; LOPEZ et al., 2014) can be related with its higher biological activity.

Studies have reported that the inhibiting of the epimastigotes and trypomastigote forms proliferation of *T. cruzi* could be related with content of flavonoids and aromatic acids present in propolis extracts (DANTAS et al., 2006; PRYTYK et al., 2003; LOTTI et al., 2010). This can explain the superior

activity of red propolis extracts compared to green and brown propolis samples analyzed, as the red propolis has the highest content of flavonoids and phenolic compounds (MACHADO et al., 2016; LOTTI et al., 2010). This characteristic of the red propolis extract was confirmed by our group in a previous study (MACHADO et al., 2016).

Other *in vitro* studies showed that propolis when used at different concentrations inhibit the growth of *T. cruzi* and other pathogenic protozoans as *T. evansi*, *Giardia* and *Leishmania* (SALOMÃO et al., 2010; FREITAS et al., 2006; DURAN et al., 2008; GRESSLER et al., 2012). However, Castro & Higashi (CASTRO & HIGASHI, 1995) reported an *in vivo* test that treatment with propolis extracts no effect on mortality, parasitemia or survival time of mice infected with *T. cruzi* when the mice were fed diets containing various formulations of the extract. Thus, further research on propolis in food formulations is necessary to develop a concentration able to be active as an *in vitro* test.

### 3.4 CYTOTOXICITY *IN VITRO*

Propolis has been widely researched, including the area of cancer research (SILVA-CARVALHO et al., 2014; CATCHPOLE et al., 2015; NOVAK et al., 2015; BURIOL et al., 2009). In this study, the cytotoxicity activity *in vitro* of all ethanolic extracts of propolis was investigated. From that, only samples of red propolis demonstrated potent cytotoxic activity against the tumor cell lines analyzed. Cytotoxic effects were not observed for green or brown propolis ethanolic extracts (data not shown). The results are shown in Table 3.

**Table 3** - *In vitro* cytotoxicity of the EtOH red extracts on tumor cell lines. Experiments were performed in triplicate.

Samples μg/mL	HL-60	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
Doxorubicin	0.02	0.01	1.18	0.25
	0.01 – 0.02	0.01 – 0.03	0.92 – 1.51	0.16 – 0.35
R01Et	4.80	19.92	23.63	13.67
	(3.97 - 5.82)	(14.40 - 27.56)	(19.66 - 28.40)	(11.22 - 16.65)
R02Et	8.74	30.19	27.08	18.47
	(7.66 - 9.95)	(21.91 - 41.59)	(24.67 - 29.72)	(15.10 - 22.59)

Cell lines: OVCAR-8 (ovarian adenocarcinoma), HCT-116 (colon carcinoma), SF-295 (glioblastoma), and HL-60 (leukemia) humans. Data are presented as IC<sub>50</sub> values (μg/mL), and their 95% confidence interval was obtained by non-linear regression from three independent experiments performed in triplicate, measured by the MTT assay after 72 h of incubation. Doxorubicin was used as the positive control.

The most pronounced cytotoxic effect was identified in the leukemia (HL-60) tumor cell line, with IC<sub>50</sub> values ranging from 3.97 to 5.82 μg.mL<sup>-1</sup> for the R01Et sample and from 7.66 to 9.95 μg.mL<sup>-1</sup> for the R02Et sample. The R01Et sample (red propolis from Sergipe) was the most effective cytotoxic agent against all four cancer cell lines tested. These results for both samples indicate that the red propolis extracts have cytotoxic properties. Novak et al. (2014) reported a IC<sub>50</sub> values ranged 29.7 and 20.5 μg.mL<sup>-1</sup> for red propolis extracts and its fraction respectively, and Carvalho et al. (2011) reported IC<sub>50</sub> values ranged from 25.67 to 33.72 for the test with propolis from Paraná, both against HL-60.

The R02Et and R01Et samples exhibited cytotoxic effects in glioblastoma (SF-295) tumor cell lines, with IC<sub>50</sub> values between 11.22 – 16.65 μg.mL<sup>-1</sup> and 15.10 – 22.59 μg.mL<sup>-1</sup> for R02Et and R01Et, respectively. Research has demonstrated cytotoxic activity by oil extracts of propolis against SF-295 tumors (BURIOL et al., 2009; CARVALHO et al., 2011).

Colon tumor cells (HCT-116) were less sensitive, with IC<sub>50</sub> values ranging from 14.40 to 41.59 μg.mL<sup>-1</sup>. Different results were observed by Buriol et al. (2009), who showed that oil and ethanolic propolis extracts from Paraná-Brazil specifically inhibited the proliferation of colon tumor cells (HCT-116).

Similar to that observed against HCT-116 cells, the extracts of red propolis showed low cytotoxic activity against ovarian tumor cells, OVCAR-8 (IC<sub>50</sub> values ranging from 19.66 to 29.72  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) compared with SF-295 and HL-60 cells.

Some constituents, such as polyisoprenylated benzophenone, xanthochymol, and isoflavone formononetin were associated with cytotoxic activity of red propolis when this fractions were tested (PICCINELLI et al., 2001; LOPEZ et al., 2014; SALOMÃO et al., 2004). However, other recently studies propose that the cytotoxic and antiproliferative activity of propolis in tumor cells may not be correlated exclusively with the concentration of a specific component, but with the synergism between several components (NOVAK et al., 2014; CARVALHO et al., 2011).

All the results described in this study, as well as research describing propolis cytotoxic activity, evidence the importance of the continued evaluation of propolis extract behavior on the different types of tumor cells, because this profile can vary for each cell assessed and each propolis sample tested. *In vivo* tests are also required for evaluation of possible side effects.

#### 4 CONCLUSIONS

This study showed the *in vitro* antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of Brazilian propolis extracts. It was noted that ethanolic red propolis extracts had the highest activity in all performed tests. Red samples were the only ones that showed inhibition of tumor cells, the highest activity against *T. cruzi* epimastigotes, greater inhibition of Gram-positive bacteria, and higher antioxidant activity. The results of this study showed that propolis has an important biological activity and that this activity depends on some factors, such as the extraction method and the region from which the propolis was collected. These results were in part similar to the results observed in other studies carried out with propolis extract.

Then, the results suggest the possibility of propolis extracts use as a preservative or a bioactive food supplement additive in the food industry, in order to provide the benefits of the propolis to human health. Especially the red

propolis that presented the best and most significant results. However, further investigation is required to better delineate the inclusion of propolis in food formulations, as well as in pharmaceutical industry. New studies regarding the application of red propolis extracts in food products are currently underway by this group.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – Departamento Nacional (SENAI DN) (BA-15011) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### References

- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.
- AMARAL, R. G.; FONSECA, C. S.; SILVA, T. K. M.; ANDRADE, L. N.; FRANÇA, M. E.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, D. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. O.; CARVALHO, A. A.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 1100-1106, 2015.
- AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.
- BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114–117, 2005.
- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 51, p. 277-280, 1996.
- BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 17-23, 2009.



BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Indicação Geográfica - IG. Available: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/indicacao-geografica>.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002.

CARVALHO, A. A.; FINGER, D.; MACHADO, C.S.; COSTA, P. M.; ALVES, A. P. N. N.; et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1239-1245, 2011.

CASTRO, S. L.; HIGASHI, K. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 55-58, 1995.

CATCHPOLE, O.; MITCHELL, K.; BLOOR, S.; DAVIS, P.; SUDDER, A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. **Phytoterapy**, v. 106, p. 167-174, 2015.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Lebenson Wiss Technology**, v. 39, p. 756-761, 2006.

CHOUHDHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 363-367, 2012.

CHRISTOV, R.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BERTRAND, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, v. 19, p. 673-678, 2005.

COTTICA, S. M.; SABIK, H.; ANTOINE, C.; FORTIN, J.; GRAVELINE, N.; VISENTAINER, J. V.; et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. **Lebenson Wiss Technol**, v. 60, p. 609-614, 2015.

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; FRANCO, S. L.; ZEOULA, L. M.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 929-935, 2011.

DA SILVA, A. S.; BOTTON, J.; WOLKMER, P.; ZANETTE, R. A.; LOPES, S. T. A.; ALVES, S. H.; MONTEIRO, S. G. *Trypanosoma evansi* susceptibility to amphotericin B. **Rural Science**, v. 39, p. 2550-2555, 2009.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; DE CASTRO, S. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 103, p. 187-193, 2006.

DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PARK Y. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008; 5(4): 435-441. doi:10.1093/ecam/nel006

DUMAN, M.; OZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80-85, 2015.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H.; OZER, B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *leishmania tropica*: a preliminar study. **Journal of Parasitology Research**, v. 102, p. 1217 – 1225, 2008.

FREITAS, S. F.; SHINOHARA, L.; SFORCINB, J. M.; GUIMARÃES, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170–175, 2006.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, p. 59-83, 1979.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINOU, I. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 261-267, 2016.

GRESSLER, L. T.; DA SILVA, A. S.; MACHADO, G.; ROSA, L. D.; DORNELES, F.; GRESSLER, L. T.; et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1314-1317, 2012.

LÓPEZ, B. C. G.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 2209-2213, 2010.

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

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

KASOTE, D.; AHMAD, A.; CHEN, W.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. **Phytochem Letters**, v. 11, p. 326-331, 2015.

KIM, D. O.; CHUN, O. K.; KIM, Y. J.; MOON, H. Y.; LEE, C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6509–6515, 2003.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; et al. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutants Streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000.

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

MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; COSTA, A. S.; COSTA, S. S.; SILVA, R. P. D. et al. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS One**, 2015.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PloS One**, 2016.

MARCUCCI, M. C.; Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. **Apidologie**, v.26, p. 83-89, 1995.

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

MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Oswaldo Cruz Institute**, v. 96, p. 53-59, 2001.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; Chinou, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 103, p 375-380, 2007.

MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3418-3423, 2010.

MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, p. 3482-3485, 2008;

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M100-S10 (M7)). Approved standard. 5<sup>a</sup>ed. Wayne, PA: NCCLS; 2000.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 433-437, 2014.

NOVAK, E. M.; SILVA, M. S. C.; MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; LÓPEZ, B. G. C.; FORTES, M. A. H. Z.; et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 91-102, 2014.

OSÉS, S. M.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; SANCHO, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1215–1223, 2016;

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

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

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by highperformance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; ANTONOVA, D.; CUTAJAR, S.; MIFSUD, D.; FARRUGIA, C.; TSVETKOVA, I.; HRISTO, N.; BANKOVA, V. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1431–1435, 2011.

PRYTZYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; AQUINO NETO, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 189-193, 2003.

REZENDE, G. P. S. R.; PIMENTA, F. C.; COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, v. 5, p. 967-970, 2006.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; HENRIQUE-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; CASTRO, S. L. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 0-11, 2011.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 87–92, 2004.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. M.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. In Vitro and In Vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megazol against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2023-2031, 2010.

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

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 113-114, 2007.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SILVA-CARVALHO, R.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; FERREIRA, A. M.; CARDOSO, S. M.; ALMEIDA-AGUIAR, C.; BALTAZAR, F. Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 160–171, 2014.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1025-1029, 2007

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.

VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v. 137, p. 1661-1670, 2010.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). Available: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/chagas/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/).

## **Capítulo IV**

---

### **Considerações Finais**

## 1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

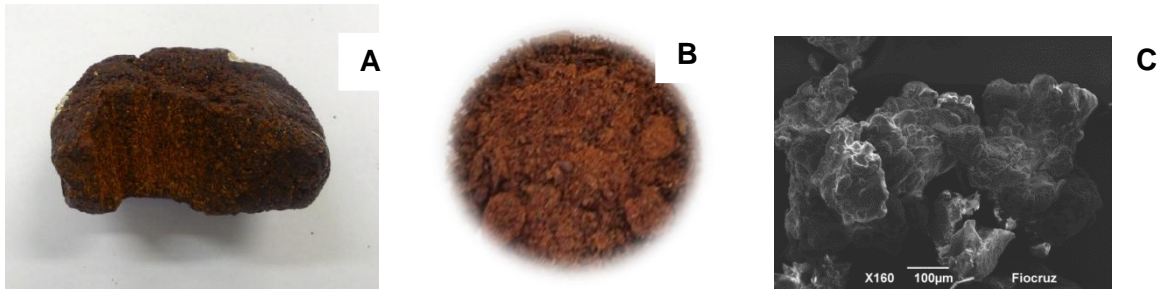
Os resultados obtidos a partir do desenvolvimento deste trabalho evidenciaram o potencial biológico da própolis. Todos os extratos de própolis obtidos por extração convencional e supercrítica apresentaram uma maior atividade antioxidante à medida que a concentração desses extratos aumentava. Dentre as diferentes amostras avaliadas, os extratos de própolis vermelha do nordeste brasileiro (Sergipe e Alagoas) apresentaram as mais altas porcentagens de atividade antioxidante, assim como, foram às amostras que apresentaram os melhores resultados na avaliação da atividade antimicrobiana, evidenciando e comprovando o maior potencial desse “novo” tipo de própolis. Quando realizada a análise comparativa em relação aos métodos de extração empregados, os extratos etanólicos apresentaram uma atividade antioxidante e antimicrobiana superior aos extratos supercríticos, o que reforça a preferência dos polifenóis e flavonoides pelo solvente etanol.

Na avaliação antiparasitária, foi observada a inibição das células de *T. cruzi* em todos os extratos etanólicos testados em 24 horas de incubação, porém, somente as amostras de própolis vermelha mantiveram a inibição celular após 96 horas de inibição. De todos os extratos testados, apenas os extratos da própolis vermelha apresentaram atividade citotóxica frente às quatro células tumorais testadas. Estes resultados também apontam a atividade promissora da própolis vermelha brasileira quando comparada as amostras de própolis verde e marrom.

Apesar de todo o potencial biológico apresentado, ainda é incipiente a aplicação da própolis em produtos alimentícios, o número de depósitos de patentes neste segmento corrobora com os artigos científicos publicados e com o lançamento deste tipo de produto no mercado. Os resultados sugerem o potencial de aplicação dos extratos de própolis, principalmente a própolis vermelha, como um conservante e como suplemento alimentar bioativo na indústria alimentar. No entanto, são necessárias mais investigações para delinear a inclusão de própolis em formulações alimentares e garantir a segurança do consumo destes produtos.

## APÊNDICE A – AMOSTRAS DE PRÓPOLIS UTILIZADAS E SUAS MICROSCOPIAS

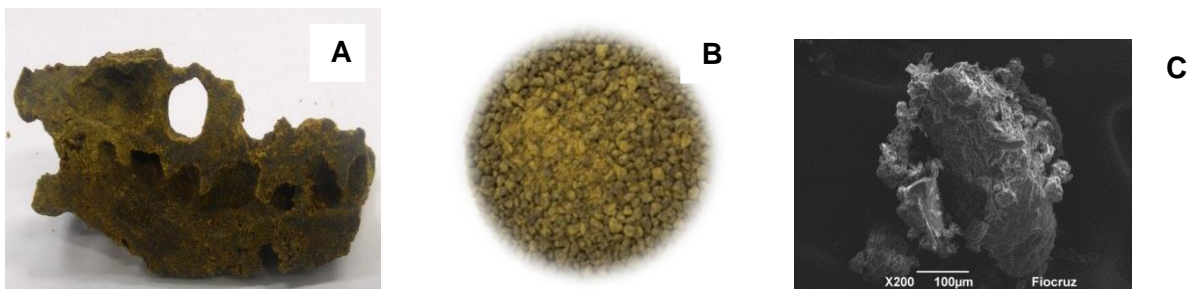
**Figura 1** - Imagem da Própolis Vermelha de origem do Estado de Sergipe - (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.



**Figura 2** - Imagem da Própolis Vermelha de origem do Estado de Alagoas - (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.

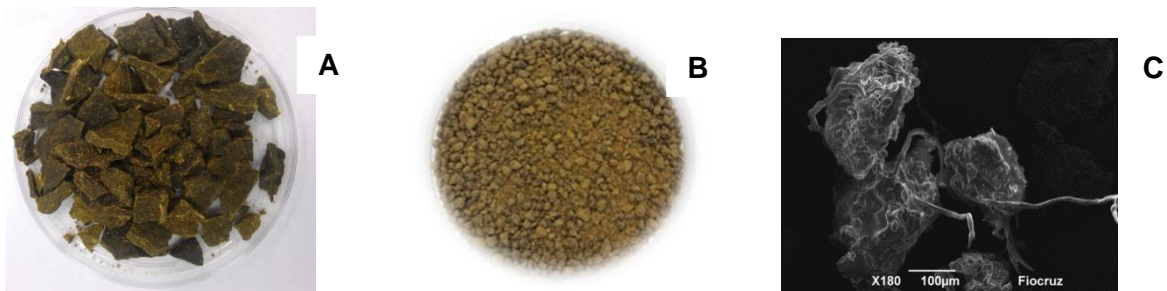


**Figura 3** - Imagem da Própolis Verde (01) de origem de Minas Gerais, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.





**Figura 4** - Imagem da Própolis Verde (02) de origem de Minas Gerais, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.



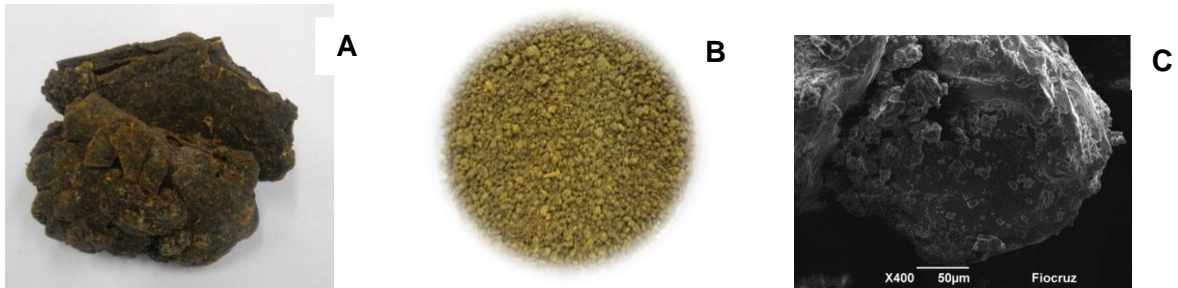
**Figura 5** - Imagem da Própolis Verde de origem do Paraná, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.



**Figura 6** - Imagem da Própolis Marrom de origem de Santa Catarina, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.



**Figura 7** - Imagem da Própolis Marrom de origem de Rio Grande do Sul, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.



**Figura 8** - Imagem da Própolis Marrom de origem de Paraná, (A) Própolis bruta; (B) Própolis triturada; (C) Microscopia.

