

ALINE FONSECA DA SILVA

**PRÓPOLIS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586p
2009

Silva, Aline Fonseca da, 1978-

Própolis: caracterização físico-química, atividade anti-
microbiana e antioxidante / Aline Fonseca da Silva.

– Viçosa, MG, 2009.

xvii, 126f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Benício Paes Chaves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Própole - Análise. 2. Físico-química - Análise.
3. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa.

II. Título.

CDD 22.ed. 638.1

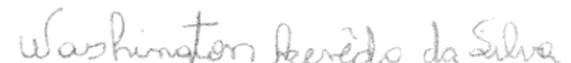
ALINE FONSECA DA SILVA

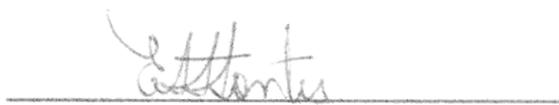
**PRÓPOLIS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE**

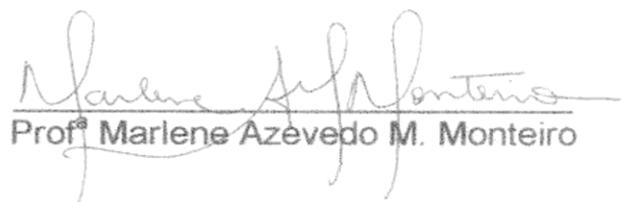
Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

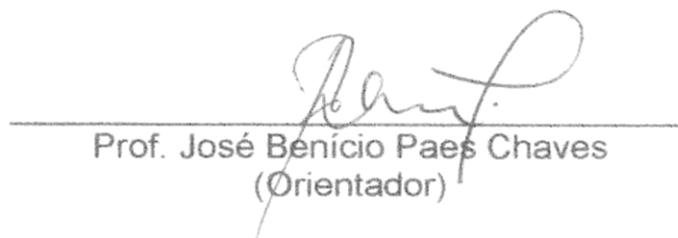
Aprovada em: 21 de setembro de 2009


Prof. Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)


Dr. Washington Azevêdo da Silva


Profª Edimar Aparecida F. Fontes


Profª Marlene Azevedo M. Monteiro


Prof. José Benício Paes Chaves
(Orientador)

A minha mãe Maria Luisa, a tia Maria da Glória e a minha irmã Ludmila pela paciência, incentivo, amor, dedicação e por tudo que fizeram para que eu enfrentasse todos os obstáculos sem esmorecer.

Dedico.

“Não há conquista sem sacrifício”.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve (Charles Chaplin)”

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por estarem ao meu lado todos os dias.

A minha família, pelo amor incondicional, pelo apoio em todos os momentos, por serem a minha inspiração, meu alicerce e minha vida.

Ao Dartanhã, obrigada pelo apoio, críticas, sugestões, pela ajuda nos momentos difíceis e pelo amor. Agradeço por me fazer sorrir e por me fazer acreditar que sou capaz

A FAPEMIG, pela concessão da bolsa e ao auxílio financeiro sempre que solicitado.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso, pela infraestrutura tornando esse trabalho possível.

Ao professor José Benício Paes Chaves pelas valiosas sugestões e críticas ao longo desse trabalho. Pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao professor Dejair Message pela orientação, críticas e sugestões. Seu amor pelas abelhas, sua dedicação aos apicultores, assim como sua pesquisa que visa um bem comum.

Ao professor Olinto Liparini Pereira pelas críticas e sugestões.

Ao Leandro Araújo pela boa vontade e inteligência. Thank you!!!! Sua ajuda foi indispensável para a realização desse trabalho.

A estudante de Engenharia de Alimentos Taline Batista pela ajuda e colaboração.

Vinícius de Moraes escreveu uma frase que expressa bem minha gratidão aos amigos: "Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos". Para vocês queridos amigos, MUITO OBRIGADA.

A Marlene Azevedo Monteiro pela grande amizade, apoio, sugestões e incentivo e com uma família (Ademir, Victoria e Eduarda) super acolhedora e simpática.

A dupla dinâmica Aline Arruda e Suzana Della Lucia, grandes e queridas amigas, com boas risadas, viagens inesquecíveis e muita gastronomia. Relaxar, pensar positivo, ter fé, palavras de ordem dessas amigas.

A Mariana Borges, sempre pronta para ajudar. Obrigada pela amizade e por compartilhar momentos divertidos. Dividimos algumas picadas e doçuras.

A Érica Endo, sábia com as palavras, ponderando sempre as situações, calma, generosa e tranqüila, obrigada pelo incentivo e amizade.

A Fernanda Rocha pelo acolhimento e pelas longas horas de conversas noturnas para amenizar a saudade de casa e a ansiedade.

A Rita pela companhia, pelas dicas, simplicidade e amizade. Dividimos o mesmo orientador, algumas dúvidas, tristezas e alegrias.

A Neusa dos Santos Baptista que mesmo à distância deu força e incentivo.

A família Arruda e afins (Aline, Pedro, Alessandra, Alexandro, Andréa, Ary, Larissa, Dona Creuza) pelos momentos alegres, por me aceitarem como parte da família, pelas ótimas risadas, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, enfim, pela amizade e ao pequeno Arthur que veio para completar essa turma.

A Dina, Juan, Maria José y Lucía, por la amistad, por el apoyo y afecto. Extraño a todos.

Das Anna Dietrich eine internationale freundschaft mit perspektiven um viele jahre zu dauern. Danke dafür, eil meiner geschichte gewesen zu sein. (A Anna Dietrich uma amizade internacional com perspectivas para durar muitos anos. Obrigada por ter feito parte da minha história).

Aos funcionários do DTA, Maria Rita, Juarez, Adão, Luis e Manoel, e em especial a Maria Geralda e Vânia, pela atenção, ajuda e carinho.

Aos colegas de pós-graduação Erica Endo, Washington, Aline Arruda, Suzana Della Lucia, Érica Granato, João Tomaz, Juliana Vidigal, Luciano Quintão, Rita Ribeiro, Sandra, Mariana Borges, Leandro Araújo, Fernanda Rocha, pela amizade e convívio.

Aos estudantes e funcionários da Clínica de Plantas pelas horas de descontração e ajuda fundamental finalização do meu trabalho.

Ao professor Robert Weingart Barreto (Fitopatologia/Clínica de Doença de Plantas) pela liberação do laboratório, conselhos, amizade, receptividade, atenção e pelas culturas fúngicas.

As abelhas, inspiração de sociedade, sobrevivência, cura, um doce objeto de estudo.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para o meu trabalho.

BIOGRAFIA

ALINE FONSECA DA SILVA, filha de Francisco Antonio da Silva Junior e Maria Luisa Fonseca da Silva, nasceu no Rio de Janeiro, em 12 de janeiro de 1978.

Concluiu o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em abril de 2001.

Iniciou, em agosto de 2001, o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em 2004 atuou como professora substituta na área de Análise Sensorial na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Em fevereiro de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa-MG.

Em 21 de setembro de 2009 submeteu-se a defesa de tese.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I- PRÓPOLIS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE	6
1) Introdução	6
2) Função da própolis e modo de coleta das abelhas	8
3) Principais áreas produtoras e principais espécies vegetais para coleta de resina	9
4) Classificação e armazenamento da própolis	10
5) Produção de extrato de própolis	12
6) Legislação sobre a própolis	14
7) Composição da própolis	16
8) Propriedades biológicas	23
8.1) Atividade antioxidante	24
8.2) Atividade antibacteriana	25
8.3) Atividade antifúngica	27
9) Patologia pós-colheita e uso da própolis como método alternativo de controle	30
10) Referências Bibliográficas	33
CAPÍTULO II- ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS SOBRE FUNGOS CAUSADORES DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA	43
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1) Introduction	45
2) Material and methods	47
2.1) Assay on inhibition of conidia germination	47
2.2) Assay on inhibition of mycelial growth	47
2.3) Experimental design and statistical analysis	49
3) Results	49
3.1) Inhibition of conidia germination by propolis extract	49

3.2) Inhibition of mycelial growth	52
4) Discussion	55
5) Concluding remarks	57
6) Acknowledgments	57
7) References	57
CAPÍTULO III- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS A PRÓPOLIS OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRAÇÃO	63
RESUMO	63
ABSTRACT	64
1) Introdução	65
2) Material e métodos	67
2.1) Amostras de própolis utilizadas	67
2.2) Preparo dos extratos aquoso e etanólico de própolis	67
2.3) Análise da atividade antifúngica dos extratos de própolis	69
2.4) Delineamento experimental e análise estatística	70
3) Resultados e discussão	70
4) Conclusão	80
5) Agradecimentos	80
6) Referências Bibliográficas	81
ANEXO 1- Tabelas dos resumos das análises de variância do crescimento fúngico submetido a diferentes extratos de própolis	85
CAPÍTULO IV- ATIVIDADE ANTIBACTERIANA. DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS	89
RESUMO	89
ABSTRACT	90
1) Introdução	91
2) Material e métodos	92
2.1) Amostras de própolis utilizadas	92
2.2) Microrganismos testados	93
2.3) Determinação da atividade antibacteriana	93
3) Resultados e discussão	93
4) Conclusão	97
5) Agradecimentos	98
6) Referências Bibliográficas	98

CAPÍTULO V- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS	102
RESUMO	102
ABSTRACT	103
1) Introdução	105
2) Material e métodos	106
2.1) Obtenção das amostras de própolis e elaboração dos extratos	106
2.2) Análise físico-química da própolis bruta	106
2.3) Determinação do espectro de absorção dos extratos de própolis	107
2.4) Caracterização sensorial das amostras de própolis bruta	107
2.5) Análise microbiológica da própolis bruta e dos extratos	108
2.5.1) Fungos filamentosos e leveduras	108
2.6) Atividade antioxidante	108
2.7) Análise dos dados	108
3) Resultados e discussão	109
3.1) Cinzas, umidade e compostos voláteis	109
3.2) Determinação do espectro de absorção dos extratos de própolis	110
3.3) Fenóis e flavonóides totais	113
3.4) Contagem de fungos filamentosos e leveduras	116
3.5) Caracterização sensorial das amostras de própolis bruta	117
3.6) Atividade antioxidante	119
4) Considerações finais	122
5) Agradecimentos	122
6) Referências Bibliográficas	123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1) Agrupamento da própolis brasileira quanto á cor.....	17
2) Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica e em presença de cloreto de alumínio (AlCl ₃)	21
3) Comprimentos de onda de absorção das principais classes de flavonóides .	22
4) Principais classes de flavonóides e exemplos	25
5) Listagem de doenças pós-colheita de frutas e respectivos agentes causais	32

CAPÍTULO II

1) Percent (%) of inhibition of conidia germination by propolis extract in different concentrations.....	50
2) Diameter growth of five distinct fungi during incubation in PCA amended with different propolis extracts at different concentrations	53
3) Percent (%) of mycelial growth inhibition in relationship to control for the tested fungi	54

CAPÍTULO III

1) Listagem dos códigos de identificação dos extratos produzidos	68
2) Lista de fungos utilizados e sua origem.....	70
3) Dados de crescimento micelial (mm) para os tratamentos de extrato etanólico a 4%	72
4) Porcentagem de inibição (%) do crescimento micelial de fungos submetidos a diferentes extratos de própolis	73

CAPÍTULO IV

1) Atividade antibacteriana dos extratos etanólico e aquosos sobre três bactérias patogênicas	94
---	----

CAPÍTULO V

1) Teor em % (m/m) para análise de cinzas e umidade de duas amostras bruta de própolis	109
2) Absorbância e comprimento de onda (nm) de máxima absorção dos extratos etanólicos e aquosos de própolis	112
3) Teores de fenóis e flavonóides totais	114

4) Caracterização sensorial de duas amostras de própolis bruta	118
5) Efeito antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos de própolis	120

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

1) Abelha coletando resina	9
2) Abelha com a corbícula cheia de resina	9
3) Própolis verde	17
4) Própolis vermelha	17
5) Estrutura básica dos flavonóides	18
6) Algumas classes de flavonóides encontradas em própolis	19
7) Exemplos de compostos fenólicos não incluídos no grupo dos flavonóides .	20

CAPÍTULO II

1) Microscopic examination of conidia	51
---	----

CAPÍTULO III

1) Aspecto visual das amostras de própolis moída	67
2) Aspecto visual dos extratos etanólicos e aquosos provenientes da amostra de própolis bruta C	69
3) Aspecto visual dos extratos etanólicos e aquosos provenientes da amostra de própolis bruta V	69
4) Placa com ensaio (C9AG4) de <i>P. capsici</i> com crescimento de bactéria contaminante	71
5) Crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phytophthora capsici</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> submetidos a diferentes extratos de própolis	78
6) Crescimento micelial de <i>Colletotrichum musae</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> submetidos a diferentes extratos de própolis	79

CAPÍTULO IV

1) Espectro de absorção dos extratos etanólicos e aquosos de própolis na faixa de 200 a 500 nm	111
--	-----

RESUMO

SILVA, Aline Fonseca da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante.** Orientador: José Benício Paes Chaves. Coorientadores: Dejair Message e Olinto Liparini Pereira.

A própolis é um produto natural, produzido pelas abelhas que coletam resina de brotos, folhas e exsudatos de plantas e é modificado pela mistura de secreções salivares, pólen e cera. Destaca-se por suas inúmeras propriedades, dentre as quais estão: antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, antitumoral, anestésica e anticariogênica. Inúmeros fatores contribuem para a diversidade de características e qualidade da própolis, tornando-a um material de composição complexa. Diversos autores conferem ao extrato aquoso as mesmas propriedades do extrato etanólico. Devido à discrepância com relação às informações sobre as propriedades do extrato aquoso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos comparativos visando esclarecer tais aspectos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar alguns indicadores de qualidade de extratos de própolis realizando quatro experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de extratos aquoso e etanólico de própolis provenientes de duas amostras distintas (própolis C e V) e obtidos a partir de três temperaturas de extração (50, 70 e 95°C) e com duas concentrações finais (2 e 4%) sobre alguns fungos (*Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Mucor* sp., *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* e *Sclerotium rolfsii*) causadores de doenças pós-colheita. Os extratos etanólicos apresentaram maior capacidade de inibição fúngica, enquanto os extratos aquosos foram pouco eficazes. Dentre os efeitos principais testados, o solvente mostrou grande importância na extração dos compostos antifúngicos, onde os extratos etanólicos de própolis foram os mais efetivos. A concentração de 4% foi a que apresentou melhor desempenho no controle do crescimento micelial. De modo geral, o comportamento foi variável entre as diferentes espécies de fungos. Não foi constatada associação ao grupo filogenético dos fungos e a sua sensibilidade a própolis. O fungo mais sensível foi *Mucor* sp., com 100% de inibição do crescimento micelial pelos extratos etanólicos. *Lasiodiplodia theobromae* foi o fungo mais tolerante aos extratos de própolis. O segundo

experimento teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos etanólico e aquoso de própolis, oriundos de duas origens distintas (própolis C e V) e obtidos a partir de duas temperaturas (50 e 70°C) de extração sobre três isolados bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesius*). Verificou-se que os dez extratos de própolis estudados tiveram pouco efeito sobre a inibição do crescimento de *E. coli* (halos de 0 a 1,2 mm). Para *S. aureus* os extratos etanólicos preparados a 70°C, de ambas as origens apresentaram um halo de inibição considerável (2,3 mm). Em relação à *S. choleraesius* os extratos etanólico a 70°C (própolis C), aquoso a 50°C (própolis V) e etanólico a 70°C (própolis V) apresentaram uma boa atividade antibacteriana com halos que variaram de 2,0 a 3,1 mm. O terceiro experimento teve como objetivo realizar a caracterização físico-química (umidade, cinzas, fenóis totais, flavonóides totais, compostos voláteis, espectro de absorção), análise microbiológica (contagem de fungos filamentosos e leveduras), caracterização sensorial e atividade antioxidante da própolis bruta e dos extratos aquosos e etanólicos de própolis. As duas própolis brutas (C e V) estudadas estão de acordo com o exigido pela legislação quanto ao percentual de cinzas, com valores de 2,6 e 3,4%. Quanto à umidade a própolis V encontra-se dentro do padrão exigido 7,6% (máximo de 8%), enquanto a própolis C apresentou um valor acima do permitido, 8,6%. O percentual de compostos voláteis foi de 0,63% para a própolis C e de 1,0% para a amostra de própolis V. No espectro de absorção, os extratos apresentaram uma variação de 290,6 a 299,2 nm, sendo que os etanólicos foram os que apresentaram os maiores comprimentos de onda. A própolis C e extratos etanólico e aquoso apresentaram contagem baixa para fungos filamentosos e levedura (< 10 UFC/g), e a própolis V uma contagem de $4,9 \times 10^3$ UFC/g. Quanto a caracterização sensorial, as amostras de própolis brutas apresentaram conformidade com a legislação brasileira vigente. Em relação ao teor de fenóis, todos os extratos avaliados encontram-se de acordo com a legislação brasileira. Os extratos aquosos apresentaram teores de flavonóides que variaram de 0,21 a 0,30% e os extratos etanólicos valores de 2,66 a 3,60%. Em relação a atividade antioxidante observou-se que todos os extratos apresentaram uma baixa atividade, sendo que os extratos etanólicos com maior atividade antioxidante em relação aos extratos aquosos. No quarto ensaio realizaram-se dois experimentos com o objetivo de avaliar o efeito

inibitório de diferentes extratos comerciais de própolis (aquoso, etanólico e propilenoglicol) nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5% sobre a germinação de conídios dos fungos *Aspergillus flavus*, *Alternaria brassicae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum musae*, e o crescimento micelial dos fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora capsici* e *Rhizopus stolonifer*, em que utilizaram-se preparações de extratos de própolis (aquoso e alcoólico) obtidas no laboratório, nas concentrações de 2 e 3%. Todos os fungos estudados são considerados importantes fitopatógenos em pré e pós-colheita. Os extratos aquosos não apresentaram efeito inibitório da germinação e do crescimento micelial dos fungos avaliados. Os extratos alcoólicos e de propilenoglicol inibiram em mais de 80% a germinação de conídios de *A. brassicae* e *C. musae* nas concentrações de 0,5 e 1,0%, respectivamente. Embora a germinação dos conídios de *A. flavus* e *B. sorokiniana* não tenha sido inibida, observou-se a redução do tubo germinativo em relação à testemunha. Maiores índices de inibição do crescimento micelial foram alcançados nas preparações com álcool a 3% para todos os fungos testados. *Lasiodiplodia theobromae* foi o fungo menos suscetível, enquanto *P. capsici* o mais suscetível. Os demais fungos apresentaram um comportamento variável.

ABSTRACT

SILVA, Aline Fonseca da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Propolis: physiochemical characterization, antifungal activity and antioxidant.** Adviser: José Benício Paes Chaves. Co-Advisers: Dejour Message and Olinto Liparini Pereira.

Propolis is a natural product, made by bees, collected from buds, leaves and plant exudates and modified mixing salivary secretions, pollen and waxes. Reaches a high position, due to its several properties: antimicrobial, antiinflammatory, healing, antioxidant, antitumoral, anesthetic and anticariogenic. Several factors contribute to the diversity of characteristics and quality of the propolis, turning it a material of complex composition. Due to divergences in relation of the information about propriety of the aqueous extract, is necessary the development of the comparative studies aiming to explain this aspects. Thus, the present study aimed to evaluate some quality indicators of aqueous and ethanolic extract realizing four experimental assays. The first assay had as objective evaluates the antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts obtained from three extraction temperatures (50, 70 and 95 °C) and two final concentrations of the extracts added to the growth medium (2 and 4%) against some fungi (*Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Mucor* sp., *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* e *Sclerotium rolfsii*) causers of the post-harvest diseases in fruits and vegetables. Ethanolic extracts presented higher capacity of fungal inhibition, while aqueous extracts were less effective. Among the main effects tested the solvent showed great importance in the extraction of the antifungal compounds, showing that propolis ethanolic extracts were more effective, while aqueous extract were almost ineffective despite of the fungal species tested. The 4% concentration presented better performance in the control of mycelial growth of all tested fungi. The propolis extracts showed a variable effect among the different fungi species. There was no association between the phylogenetic fungi group and its sensibility to propolis. The most susceptible fungus was *Mucor* sp., with 100% of inhibition of the growth mycelial for the ethanolic extracts. *Lasiodiplodia theobromae* was the most tolerant fungus. It can be concluded that ethanolic extract of propolis possess a great potential as alternative control to fungi that causes of post-harvest disease, while aqueous extracts still need to be better

evaluated. The second assay aimed to evaluate the antibacterial activity of ethanolic and aqueous propolis extracts obtained from two distinct origins (namely propolis V and C) with three temperatures of extraction (50, 70 and 95 °C, except for alcohol extracts that were obtained only at 50 and 70 °C) against three bacterial strains, one of each of the following species: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesius*. It was verified that the ten extracts obtained in this study had little effect on the growth inhibition of *E. coli* (halos of 0 to 1.2 mm). The ethanolic extracts prepared at 70°C from both origins presented a considerable inhibition (2,3 mm) against *S. aureus*. For *S. choleraesius* the ethanolic extracts at 70 °C (propolis C), aqueous at 50 °C (propolis V), ethanolic at 70 °C (propolis V) presented a good antibacterial activity with halos that varied of 2.0 to 3.1 mm. The third assay aimed at study the physiochemical characterization (ashes; lost weight on drying (humidity); total phenols and total flavonoids of the crude samples; volatile compounds contents; spectrum of absorption); microbiological analysis (counting of molds and yeasts); sensory analysis and antioxidant activity from two distinct propolis, marketable in Minas Gerais. Both samples, V and C of crude propolis are in agreement with Brazilian regulation as for the percentile of ashes, (2,6 and 3,4%). Moisture of the sample V was 7.6% (maximum of 8%), however the sample C presented value of 8.6%, which is above of maximum allowed. Volatile compounds content was 0.63% on propolis C and 1.0% for propolis V. As for of the absorption spectrum, the extracts ranged from 290.6 to 299.2 nm, and the ethanolic extracts presented the highest wavelengths. Propolis C and ethanolic and aqueous extracts presented low counting for molds and yeast (<10 UFC.g⁻¹), while crude sample V presented a counting of 4.9 x10³ UFC.g⁻¹. Regarding the sensory characterization, both samples of crude propolis were in conformity with the limits established by the Brazilian regulation. All extracts were low in antioxidant activity, though, ethanolic extracts presented higher activity than the aqueous ones. In the fourth assay, two experiments were carried out to determine inhibitory effects of propolis extract against some fungi. The first one evaluated the effect of the different commercial extracts of propolis (aqueous, ethanolic and propylene glycol) in the concentrations 0.1; 0.5; 1.0 and 1.5% against conidia germination of *Aspergillus flavus*, *Alternaria brassicae*, *Bipolaris sorokiniana* and *Colletotrichum musae*. The second one evaluated the mycelial growth of *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum*

gloeosporioides, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora capsici* e *Rhizopus stolonifer*, with laboratory propolis preparations (aqueous and ethanolic) in the final concentrations of 2 and 3% on the growth medium. The nine fungi studied are considered important pre and post-harvest pathogens. In the first assay, the aqueous extracts had no inhibitory effect on conidia germination and mycelial growth of tested fungi. Commercial ethanolic and propylene glycol extracts showed inhibitory effect over 80% on the conidia germination of *Alternaria brassicae* and *Colletotrichum musae*, even when used the lowest concentration. Although conidia germination of *Aspergillus flavus* and *Bipolaris sorokiniana* was not inhibited, its germ tubes were clearly shorter than the controls (no propolis addition to growth medium). Regarding the mycelial growth assay, the higher inhibitions were achieved with ethanol preparations added to the medium at 3% to all test fungi. *Lasiodiplodia theobromae* was the less susceptible fungus, while *Phytophthora capsici* was the most susceptible. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* showed a variable behavior.

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse do homem pelas abelhas é milenar. Pinturas rupestres que mostram saques das colmeias para obtenção de mel datam de períodos tão remotos como o mesolítico. As abelhas produzem mel desde muito tempo antes de o homem aparecer sobre a Terra, e este alimento tem sido valorizado através de sucessivas gerações. Entretanto, o interesse pelas abelhas não é somente pelo mel (ASÍS, 1989). Nas últimas décadas têm-se despertado em todas as partes do mundo o interesse por todos os produtos da colmeia: mel, cera, pólen, geleia real, apitoxina e própolis (ASÍS, 1989; PAULINO, 2004). Dentre os produtos apícolas, a própolis vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas, atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica, quanto pela possibilidade de aplicação na indústria alimentícia, na forma de alimentos funcionais (PARK *et al.*, 1998) e conservação de alimentos (ASÍS, 1989).

A própolis é uma mistura em proporções variáveis de resinas, coletadas pelas abelhas em brotos de flores e exsudados de plantas, acrescidas de secreções glandulares, ceras e pólen. Sua cor, sabor, odor, consistência, composição química e atividade biológica dependem das espécies vegetais que lhes deram origem e da época do ano (PAULINO, 2004).

A divulgação dos efeitos terapêuticos da própolis e a procura cada vez maior pelo homem de remédios naturais despertaram o interesse das indústrias ao redor do mundo. Atualmente, encontram-se disponíveis em lojas de produtos naturais ou via internet uma enorme quantidade de marcas e produtos feitos à base de própolis (LIMA, 2006), tais como balas, chocolates, doces, shampoos, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente, sabonetes, etc (PARK *et al.*, 1998).

A própolis apresenta uma grande quantidade de substâncias e a extração completa ou seletiva delas depende do solvente utilizado (MALASPINA e PALMA, 2000). Os processos de extração mais comuns são: em álcool, em água, alta pressão (CO₂ liquefeito) e por emulsificação (SUZUKI, 2000).

A maioria dos componentes da própolis são substâncias solúveis em óleo, por isso a extração em álcool é a mais comum (SUZUKI, 2000). No mercado, a maioria dos extratos e tinturas disponíveis são a base de álcool. No

entanto estas podem provocar reações adversas e contra indicações, tais como sabor e odor forte de álcool que dificultam o uso via oral, principalmente por crianças, idosos e pessoas muito debilitadas, além da resina e da cera aderirem à parede dos copos, dando uma impressão de sujeira, entre outros (SUZUKI, 2000).

Extrações em água não apresentam os problemas citados acima, porém este tipo de extrato tem pouca estabilidade e é facilmente contaminado (MALASPINA e PALMA, 2000).

De maneira geral, como a população utiliza a própolis como complemento alimentar e como medicamento é necessário ter um controle de qualidade rigoroso que deve abranger todas as fases de manipulação, desde a coleta da matéria prima até a elaboração final do produto. Na fase de coleta é possível observar que a matéria prima originada da entrada do alvado é passível de contaminação com pó, restos da colmeia e de abelhas. Portanto, a escolha de um método adequado de coleta já é uma etapa importante na qualidade da própolis *in natura* (MALASPINA e PALMA, 2000).

Pesquisas com extrato aquoso ainda são incipientes. Alguns autores afirmam que suas propriedades são tão eficazes como as do extrato alcoólico, enquanto outros apontam que estes extratos possuem eficácia distinta (SUZUKI, 2000; YILDIRIM *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que em alguns trabalhos o extrato é obtido utilizando solventes como hexano ou metanol, que posteriormente são evaporados, e o resíduo é diluído em água obtendo-se no final uma solução aquosa (ALY e ELEWA, 2007), já em outros trabalhos utiliza-se a água como extrator, obtendo-se assim um extrato aquoso (PINTO, 2000; PARK *et al.*, 1998).

Devido à discrepância com relação às informações sobre as propriedades do extrato aquoso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos comparativos visando esclarecer tais aspectos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar indicadores de qualidade de extratos de própolis aquosos e etanólicos. Comparou-se o perfil físico-químico e a atividade antioxidante de extratos de própolis etanólico e aquoso, obtidos a partir de três temperaturas de extração, assim como a atividade antifúngica e antibacteriana destes extratos.

Objetivos específicos

- Avaliação do efeito inibitório de extratos comerciais de própolis verde (aquoso, etanólico e propilenoglicol) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5% sobre a germinação de conídios de cinco espécies fúngicas;
- Avaliação do efeito inibitório de extratos de própolis verde (aquoso e etanólico) nas concentrações de 2 e 3% sobre o crescimento micelial de cinco espécies fúngicas;
- Caracterização da atividade antifúngica dos extratos aquoso e etanólico de própolis verde, obtidos a partir de três temperaturas (50, 70 e 95° C) de extração sobre dez espécies fúngicas de reconhecida importância como agentes de podridões pós-colheita em frutas e hortaliças;
- Caracterização da atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico de própolis verde, obtidos a partir de duas temperaturas (50 e 70°C) de extração sobre três espécies de bactérias patogênicas ao homem (1 Gram positiva e 2 Gram negativas);
- Caracterização físico-química (umidade, cinzas, flavonóides totais, fenóis totais, espectro de absorção, compostos voláteis) dos extratos aquosos e etanólico de própolis verde;
- Contagem de fungos filamentosos e leveduras das amostras de própolis verde bruta e dos extratos etanólicos e aquosos;
- Caracterização sensorial das amostras de própolis verde bruta quanto ao aroma, sabor, cor e textura;
- Caracterização da atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico.

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, S. S.; ELEWA, N. E. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. **Journal of Dairy Research**. 74: 74-78.

ASÍS, M. (1989). **Propóleo: el oro púrpura de las abejas**. Habana: Centro de Información y Documentación Agropecuário (CIDA). 256 p.

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

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

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. (2000). **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. Congreso Internacional de Propoleos. Argentina. Disponível em: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>. Acesso em: 09 de novembro de 2006.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

PAULINO, F. D. G. (2004). Produtos da colmeia. In: SOUZA, D. C. (Ed.). **Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural**. Brasília: SEBRAE. 187p.

PINTO, M. S. (2000). **Efeito antimicrobiano da própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vaca com mastite**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. UFV. 92 p.

SUZUKI, I. (2000). A própolis de solução aquosa. **Mensagem Doce** v. 58. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2005.

YILDIRIM, Z.; HACIEVLIYAGIL, S.; KUTLU, N. O.; AYDIN, N. E.; KURKCUOGLU, M.; IRAZ, M.; DURMAZ, R. (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. **Pharmacological Research**. 49 287–292.

CAPÍTULO I

PRÓPOLIS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE

1- INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex.: ervas) além das tradicionais preparações Galênicas (ex.: extratos) (PEREIRA *et al.*, 2002).

Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis administrada sob diversas formas. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito, por volta de 1700 a.c. a própolis, então denominada "cera negra", era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada pelas suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga União Soviética, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (PEREIRA *et al.*, 2002).

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada pelas abelhas. Os materiais disponíveis para coleta da própolis são produzidos por uma variedade de processos botânicos em diferentes partes de plantas. Podem ser substâncias ativamente secretadas e substâncias encontradas no exsudato de cortes das plantas, materiais lipofílicos das folhas e dos brotos foliares, mucilagens, gomas, resinas e látex (BANKOVA *et al.*, 2000). Durante a coleta da própolis, as abelhas misturam a cera e secreções salivares, que contém a enzima β -glicosidase, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas (GHISALBERTI, 1978; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; PARK *et al.*, 1998).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, e este possivelmente é o maior problema para a padronização da própolis, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região, época da colheita, com a técnica empregada para extração e com a espécie da abelha (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995). No Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país, essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira (PEREIRA *et al.*, 2002).

Diversos estudos científicos atribuem à própolis uma infinidade de usos, demonstrando que seu potencial para atividades anti-inflamatória, antimicrobiana (PARK *et al.*, 1998; BOSIO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; SILICI *et al.*, 2005; DRAGO *et al.*, 2000), antitumoral, antioxidativa (BANSKOTA *et al.*, 2000; ALDEMANN, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2008), hepatoprotetora, regeneração tecidual, citotóxica, entre outras (BANSKOTA *et al.*, 2000).

Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõe a própolis. Destes, os flavonóides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas (PARK *et al.*, 1995).

Comercialmente, a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às inúmeras constatações das diferentes atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Como consequência, observou-se incremento do valor agregado ao produto, sendo este um dos importantes indicadores que representam a cadeia produtiva da apicultura (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Um frasco de 40-50 mL do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca R\$ 5,00 a 10,00, mas chega a custar 150 dólares em Tóquio (PEREIRA *et al.*, 2002).

Este alto valor agregado pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis. A própolis brasileira atende cerca de 80% da demanda japonesa (PEREIRA *et al.*, 2002) e atualmente a grande procura deve-se ao Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto químico inicialmente isolado de própolis brasileira, o qual tem despertado grande

interesse em razão de suas propriedades biológicas (atividade anti-tumoral, atividade antimicrobiana e antioxidante) (PAREDES-GUZMÁN *et al.*, 2003).

2) Função da própolis e modo de coleta das abelhas

A palavra própolis provém do grego “pro” que significa defesa e “polis” que significa cidade. As abelhas usam a própolis para recobrir todas as paredes da colmeia, para obstruir buracos, frestas e unir partes. Serve também como instrumento de regulação da temperatura interna, pelo isolamento de compartimentos não utilizados, redução de alvado (defesa e frio), além de envernizar os alvéolos de cria com uma fina camada ao final de cada ciclo de criação (GREENWAY *et al.*, 1990; COUTO e COUTO, 2002; COSTA e OLIVEIRA, 2005; WIESE, 2005; LIMA, 2006) e para eliminar possíveis invasores, ou seja, a própolis é utilizada para isolar tudo que esteja relacionado à defesa sanitária e comprometa a sobrevivência da colônia.

A própolis tem importância para o homem no uso veterinário (cicatrização de feridas, cortes pós-operatórios, no combate de hemorragias, no tratamento de mastite); na agricultura (no tratamento de doenças de plantas, substituindo produtos químicos); na indústria de cosméticos (cremes de beleza, pasta dental, shampoos, sabonetes) e na indústria de alimentos (pastilhas, bombons, chicletes) (COSTA e OLIVEIRA, 2005).

Embora as operárias possam viver por pouco tempo, elas realizam uma série de tarefas dentro da colmeia de acordo com a sua idade e a coleta é a última atribuição de uma operária e será realizada fora da colmeia. Nesta fase a abelha é chamada de campeira e será responsável pela coleta de pólen, néctar, água e própolis. As abelhas coletam as resinas, de botões florais ou brotos de vegetais, utilizando suas mandíbulas e patas (Fig. 1). A resina é retirada aos pedaços com as mandíbulas e é manuseada com o primeiro par de patas e depois depositadas na corbícula (Fig. 2). Após encher a corbícula é feito o transporte da própolis pela campeira até a colmeia e repassa as outras operárias que utilizarão nos locais necessários (COSTA e OLIVEIRA, 2005; LIMA, 2006).



Figs. 1-2: Abelha coletando resina (1) e com a corbícula cheia de resina (2). Fonte: F. Jaussi (www.apis.admin.ch)

3) Principais áreas produtoras e principais espécies vegetais para coleta de resina

As informações sobre a produção de própolis brasileira é bastante escassa. Há apenas avaliações de produtores e exportadores que situam a produção brasileira entre 49 a 150 toneladas anuais. Somente quatro municípios mineiros (Muzambinho, Machado, Bambuí e Formiga) produzem em torno de 5 toneladas/mês durante a estação produtora. Considerando que Minas Gerais responde por mais de 50% da produção anual e o restante está distribuído entre o sul do Paraná, leste de São Paulo e algumas áreas serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro, conclui-se que uma estimativa de 49 toneladas é muito conservadora e a de 150 toneladas pode estar superestimada. O consenso é de que o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial, logo atrás da China (LIMA, 2006).

Em países de clima temperado da Europa e América do Norte, os vegetais produtores da resina para produção de própolis são poucos. O choupo, *Populus L.*, da família *Salicaceae* é a principal fonte. Ainda pode-se encontrar esta espécie vegetal na Ásia e no norte da África. Entretanto, não é natural dos trópicos. No Brasil, há diversas espécies vegetais para a retirada de resina. Porém, poucas foram as espécies identificadas até agora, sendo o assa-peixe (*Vernonia polyanthes Less.*), a aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), o alecrim (*Baccharis spp.*) e o eucalipto (*Eucaliptus spp*) alguns exemplos de vegetais onde as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis (PARK *et al.*, 2000).

As qualidades da própolis que interessam ao produtor são: a origem vegetal, a textura, o aroma e a cor que variam em função do tipo de material coletado. De um modo geral, existe uma predominância de fontes de recursos em cada região, proporcionando a cada região tem uma própolis com aroma, cor, textura característica. A própolis brasileira que apresenta maior aceitação no mercado internacional é a de cor verde, com aroma suave, textura consistente e predominância de alecrim (*Baccharis* spp.). Outro tipo de própolis bem aceita no mercado internacional é a denominada própolis de eucalipto, também verde e difere da de alecrim por ter um aroma menos suave (LIMA, 2006).

Contudo, a exemplo de muitos outros produtos naturais, falta à própolis garantia de parâmetros essenciais quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, de forma a permitir o seu uso racional. Para tanto, avaliações fitoquímicas e farmacotológicas se fazem necessárias (TEIXEIRA, 2003). Hausen *et al.* (1987, 1988) citados por Teixeira (2003) identificaram alguns compostos alergênicos presentes em própolis originária de espécies do gênero *Populus*, bem como em constituintes presentes em suas gemas foliares. Popova *et al.* (2002) comprovaram que certos compostos presentes em amostras de própolis provenientes de *Myroxylon balsamum* (Fabaceae) apresentam considerável toxicidade. Embora incipientes alguns trabalhos também vêm sendo desenvolvidos no intuito de se estabelecer dosagens de ingestão diária consideradas seguras (BURDOCK, 1998).

4) Classificação e armazenamento da própolis

É imprescindível realizar um controle total desde a produção, extração, seleção e armazenagem. A presença de impurezas muda a classificação da própolis e a sua aceitação comercial. A própolis pode ser classificada em: 1ª qualidade (própolis granulada, livre de impurezas, aroma agradável); 2ª qualidade (própolis granulada, colhida no alvado, na tampa e parede, sem impurezas, aroma agradável); 3ª qualidade (raspagem de quadros, tampas, paredes, com poeiras e sem grânulos uniformes). O preço da própolis varia de acordo com seu estado de pureza e origem botânica (COUTO e COUTO, 2002; WIESE, 2005).

O mercado está cada vez mais exigente e só terão êxito aqueles que investirem em um rigoroso controle de qualidade. O produtor terá que se adequar a um mercado que não aceita qualquer tipo de própolis, existindo atualmente uma tendência entre os exportadores em substituir as características sensoriais pela sua origem botânica (LIMA, 2006).

A própolis brasileira tem sido usada como ingrediente em alimentos funcionais, principalmente no Japão, nos Estados Unidos e na Europa. No Japão, há grande procura por própolis que contenha Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto químico inicialmente isolado da própolis brasileira, o qual tem despertado grande interesse em razão de suas propriedades biológicas (atividade anti-tumoral, pela promoção da apoptose e cura da leucemia, favorecendo o aumento da resposta imunológica, além de apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante). As própolis brasileiras são rotuladas como um produto único ("Brazilian propolis") e a grande procura tem se dado em função da presença de Artepillin C (PAREDES-GUZMÁN *et al.*, 2003).

Em geral a própolis é um produto estável, mas suas condições de armazenamento são importantes. Própolis *in natura* e seus extratos devem ser armazenados no escuro, em recipientes herméticos e em locais frescos, preferencialmente com temperatura menor do que 10°C. Própolis velhas não devem ser misturadas com própolis frescas (MALASPINA e PALMA, 2000). Nunca se deve guardá-la em forma de "bolas", exposta às condições do meio, sem nenhuma proteção. Isso reduz o brilho e aumenta a oxidação, prejudicando a qualidade do produto, desvalorizando-o comercialmente (COUTO e COUTO, 2002).

Sendo um produto de origem orgânica, seu armazenamento por um tempo muito longo pode levar à perda ou diminuição de suas características ou atividades biológicas (COSTA e OLIVEIRA, 2005).

Própolis liofilizada tem sido usada como um método alternativo para preservação das atividades biológicas, mas não há informações científicas sobre o efeito do produto após longo tempo de armazenamento. Esse método pode ter importância quando usado em larga escala em certas formulações, mas não é possível garantir que algumas características benéficas possam ser mantidas durante o processo. Se a própolis *in natura* ou a sua utilização em outros produtos não tiver um processamento adequado, pode haver

contaminação por coliformes termotolerantes e vários tipos de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Alguns tipos de fungos que são de difícil controle podem contaminar, causar infecções no tubo digestivo e provocar graves lesões. O tempo que o produto pode permanecer nas prateleiras dos locais de venda depende de sua composição e do tipo de embalagem, sendo por isto, determinados para cada caso. Muitos dos componentes individuais do produto são susceptíveis à decomposição ou transformações (principalmente oxidação) (MALASPINA e PALMA, 2000).

5) Produção do extrato de própolis

Das formas de comercialização da própolis o extrato é a que apresenta maior potencial. Pode ser comercializado em farmácias, supermercados, casas de produtos naturais e outros (COSTA e OLIVEIRA, 2005).

Várias literaturas descrevem procedimentos de extração diferenciados com diferentes solventes extratores. Sua escolha depende da finalidade do uso (ALDEMANN, 2005). Pelo fato da própolis apresentar uma grande quantidade de substâncias, a sua extração completa ou seletiva depende do solvente utilizado. Na indústria alimentícia, medicinal ou aplicações em cosméticos utiliza-se o álcool neutro (grau alimentício) determinado pela legislação. A metodologia mais usada pelas unidades processadoras é a extração em álcool de cereais (70%) na proporção 7 (álcool):3 (própolis) (volume/massa) para obtenção da concentração de 30%. Embora esse seja o critério mais usado no Brasil, ele não é adequado uma vez que as medidas utilizadas no processo são diferentes (volume/massa) (MALASPINA e PALMA, 2000).

Fernandes Jr. *et al.* (1997) produziram extratos triturando 50 g de própolis em 100 mL de etanol 96 °GL. Kumazawa *et al.* (2004) realizaram experimentos com extrato etanólico obtido em temperatura ambiente por 24 horas. Kujumgiev *et al.* (1999) testaram as atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica e antiviral) de extratos etanólicos de própolis obtidos com etanol 70% (1:10 p/v) por 24 horas. Bankova *et al.* (1998) e Hegazi *et al.* (2000) obtiveram os extratos também com etanol 70% mas realizaram a reextração após 24 horas. Park *et al.* (1995) prepararam extratos com 2 gramas de própolis e 25 mL de etanol 80%, agitando por 30 minutos e

temperatura de 70 °C. Ao contrário de Moreno *et al.* (2000) que para cada grama de própolis pulverizada adicionaram 15 mL de etanol 80% e agitação contínua por 24 horas a temperatura ambiente. Sforcin *et al.* (2000) trituraram 30 g de própolis com 100 mL de álcool etílico 95°GL, com agitação moderada e temperatura ambiente. A mesma metodologia deixando os extratos em agitação por sete dias foi utilizada por Bosio *et al.* (2000), Fernandes Jr. *et al.* (2001), e Miorin *et al.* (2003). Menezes *et al.* (1997) utilizaram 100 g de própolis e 200 mL de etanol 95% em um banho com agitação por 1 semana a 25 °C. Fernandes Jr. *et al.* (2001) para a obtenção de extratos etanólicos de própolis de meliponíneos adicionaram a 100 g de própolis 100 mL de etanol 95% em temperatura ambiente por dois dias.

Extrações em água também podem ser realizadas. Os principais problemas desse tipo de extrato são a estabilidade e a facilidade de contaminação. Para ser usado em produtos finais com base oleosa, os extratos com alta concentração alcoólica são práticos. Para o uso predominantemente em base hidroalcoólica, recomenda-se extratos feitos com baixa concentração de álcool. Independente do tipo de solvente utilizado, o tempo de extração empregado pelas diferentes empresas varia de semanas até meses (MALASPINA e PALMA, 2000).

Nagai *et al.* (2003) testaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos obtidos com 50g de própolis e 5 vezes o volume inicial da amostra de água destilada, agitação a 20 °C por um dia e uma reextração do resíduo por mais um dia. Bianchini e Bedendo (1998) utilizaram extrato aquoso de própolis obtido com 100 g de própolis triturada em 1 litro de água destilada por 1-2 min usando um aparelho tipo “mixer”. Pela complexa composição química, dificilmente encontrar-se-á um solvente que extraia todos os seus princípios ativos, devido às diferentes polaridades das moléculas. Por outro lado, a adição de um tensoativo ou qualquer outra substância com uma extremidade polar e a outra formada por uma cadeia parafínica longa, pode diminuir a tensão interfacial entre as substâncias presentes na própolis e o meio (Magro e Carvalho (1990) citados por KONISHI *et al.*, 2004) ajudando a solubilizá-las. Os extratos etanólicos são os mais utilizados, mas alguns autores utilizaram outros solventes para a obtenção dos extratos de própolis. Higashi e Castro (1994) utilizaram extratos em dimetilsulfóxido além dos extratos etanólicos, triturando as amostras de própolis no solvente por 4 horas e filtrando. Fontana *et al.*

(2000) obtiveram extratos com um grama de própolis extraído com 10 vezes o volume inicial da amostra de solventes de diversas polaridades (desde hexano até metanol) a 25 °C e deixado por um dia em agitador (100 rpm). Marcucci *et al.* (2001) utilizaram extratos metanólicos de própolis onde 50 g de amostra foi extraída em aparelho de Soxhlet com metanol à quente por 8 horas. Kherzi *et al.* (2006) utilizaram quatro extratos utilizando hexano, diclorometano, metanol e água aquecida como solventes. Aly e Elewa (2007) obtiveram extratos a partir de 100g de própolis tratada com hexano por 3 horas, seguido de outra extração em metanol por 3 h em Soxhlet, esses solventes foram evaporados. Ao resíduo final foi adicionado água destilada gerando o extrato aquoso.

6) Legislação sobre a própolis

A legislação brasileira que regulamenta o setor de produtos apícolas teve seu início em 1952 com o RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal por meio do Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952 que instituiu o DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal e o SIF – Serviço de Inspeção Federal. O RIISPOA traz informações essenciais, tais como normas para instalações, equipamentos, registros, regulamentação da instalação dos estabelecimentos e suas condições de funcionamento, instituição de modelos de carimbos oficiais obrigatórios e orientações sobre rotulagem (LIMA, 2006).

Para todo e qualquer produto destinado ao consumo existe uma legislação específica a ser seguida na composição dos rótulos. A composição e a concentração do produto devem estar de acordo com os valores colocados nos rótulos. Só os produtos legalmente registrados no Ministério da Saúde (MS) podem conter bula ou indicação terapêutica. Os produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) só devem ser comercializados como complemento alimentar e não podem conter qualquer indicação terapêutica (MALASPINA e PALMA, 2000).

O Ministério da Saúde não considera a própolis como alimento e recomenda que não sejam abertos processos de registro para tal propósito. Como medicamento a própolis e produtos elaborados podem ser registrados desde que seguidos todos os passos referentes a registro de medicamentos (LIMA, 2006).

Alguns países têm mostrado preocupação com padrão internacional definido para própolis *in natura* ou para extrato em relação ao controle de qualidade. Na Rússia, pesquisadores propuseram alguns indicadores quantitativos que não foram universalmente aceitos, como por exemplo, atividade bactericida, que representa apenas um único aspecto (Munn (1988) citado por MALASPINA e PALMA, 2000). No Japão são utilizados vários indicadores diferentes, dependendo da empresa ou da associação responsável (não oficial), mas não há padronização de parâmetros ou de valores para cada variável. Na Inglaterra em 1999, a HFMA (Health Food Manufactures' Association) estabeleceu um critério para determinar uma qualidade padrão da própolis *in natura* e purificada. Dentre esses critérios são considerados aparência, cor, propriedades sensoriais, flavonóides e pureza. No Brasil existe uma preocupação muito grande por parte das empresas e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em estabelecer um controle de qualidade mais efetivo da própolis *in natura* e seus derivados. Assim, nos últimos anos, várias tentativas foram feitas para resolver essa questão. Um grupo formado por representantes do Conselho Nacional do Agronegócio Apícola (CONABEE), da Confederação Brasileira de Apicultura, associações, empresas, pesquisadores e técnicos do MAPA elaboraram uma proposta e encaminharam ao referido MAPA normatizar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis (MALASPINA E PALMA, 2000).

A Instrução Normativa nº 3, de 19/01/2001 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do MAPA estabelece um padrão oficial que contempla a própolis *in natura* e o extrato de própolis. O Anexo VII desta Instrução fixa e descreve a composição, propriedades físicas e químicas (umidade, cera, cinzas, compostos fenólicos, flavonóides e oxidação), características sensoriais (aroma, sabor, consistência e granulometria); acondicionamento e demais condições a que um extrato deve obedecer para ser considerado apto para comercialização e consumo (ausência de contaminantes de origem sintética e aditivos, e critérios de qualidade higiênico sanitárias) (BRASIL, 2001).

A publicação desses regulamentos criou parâmetros de qualidade mínimos que devem ser seguidos (LIMA, 2006).

7) Composição da própolis

De uma maneira geral, a composição da própolis inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (WIESE, 2005) e metabólitos secundários, entre as quais triterpenóides, flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C e E, além de minerais, como Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr. A proporção dessas substâncias varia e depende do local e da época da coleta. Pesquisas mostraram que a composição da própolis é muito similar à dos exsudatos de brotos das plantas visitadas pelas abelhas (SILVA *et al.*, 2005).

Dadas às dimensões continentais do Brasil e a grande diversidade da flora e variedade de ecossistemas, a composição química da própolis é extremamente complexa e são vários os tipos de própolis produzidos (LIMA, 2006), existindo também diferenças entre a própolis produzida por abelhas nativas e abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) (SILVA *et al.*, 2006).

A própolis de maior aceitação no mercado internacional é a de cor verde (Figura 3), aroma suave, textura consistente e com predominância de alecrim (*Baccharis* sp.). Outro tipo de própolis bem aceita é a denominada própolis de eucalipto, esta própolis também tem cor esverdeada e difere da do alecrim por ter um aroma menos suave (LIMA, 2006).

Park *et al.* (2000) desenvolveram um trabalho cujo objetivo foi classificar amostras de própolis coletadas de todas as regiões do Brasil (exceto região norte) e avaliá-las de acordo com alguns métodos físico-químicos e algumas de suas propriedades biológicas. Após o processamento e análise quanto à aparência e coloração dos extratos classificaram 12 grupos distintos de própolis (Tabela 1). Neste mesmo trabalho, estes autores sugerem que existe maior diversidade de própolis nas regiões sul e nordeste do Brasil, proporcional a variação da vegetação destas regiões.

Tabela 1: Agrupamento da própolis brasileira quanto à cor.

Grupos*	Extrato Etanólico de Própolis		Origem da própolis
	Cor	Substâncias Solúveis (%)	
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12(SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park *et al.* (2000).

(*RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná; BA: Bahia; PE: Pernambuco; CE: Ceará; PI: Piauí; SP: São Paulo).

Recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha (Figura 4) em colmeias localizadas ao longo do litoral e manguezais no nordeste brasileiro que foi classificada então como própolis do grupo 13. Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. assumindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha (DAUGSCH *et al.*, 2006).



Figs. 3-4: Própolis verde (3) e própolis vermelha (4).

Fontes: Bacha, 2005; Agência Alagoas, 2009.

Os estudos desenvolvidos em praticamente todo o mundo atribuem à complexidade de sua composição, propriedades farmacológicas importantes, considerando alguns compostos isoladamente, ou o sinergismo entre eles. Os resultados indicam atividade de amplo espectro contra diferentes

microorganismos (fungos, bactérias, vírus, protozoários, etc.) Ainda, importantes propriedades biológicas antioxidante, acitotóxica e imunomoduladora foram comprovadas (BANKOVA *et al.*, 2000).

A análise química da própolis é muito dificultada, devido ao fato de se tratar de uma mistura de compostos que varia de acordo com a flora de cada região, época do ano (NASCIMENTO *et al.*, 2007), dentre outros fatores e pode conter centenas de substâncias químicas com funções ainda desconhecidas (COSTA, 2007). A investigação da composição química possibilita estabelecer a correlação de seus constituintes e atividade farmacológica destes (SOUSA *et al.*, 2006).

Ultimamente, esta análise tem se concentrado nos extratos aquoso e etanólico porque são os mais usados nos diversos tipos de aplicações terapêuticas (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Os compostos químicos encontrados na própolis podem ser organizados em alguns grupos principais como: açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres alifáticos, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, esteróides, cetona, charconas e D-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, entre outros (LIMA, 2006).

Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõe a própolis e que estão largamente distribuídos no reino vegetal. Destes, os flavonóides podem ser considerados os principais (RUSSO *et al.*, 2002), encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas (BANKOVA *et al.*, 1983; BANKOVA *et al.*, 1992). Fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada (PARK *et al.*, 1995) e até mesmo a variabilidade genética das rainhas (KOO e PARK, 1997), também influenciam na composição química da própolis.

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico. Possuem nessa estrutura três anéis aromáticos $C_6-C_3-C_6$ (A, B e C) (Figura 5).

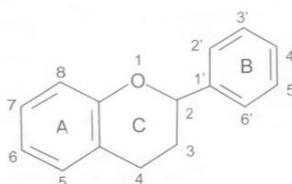


Fig. 5: Estrutura básica dos flavonóides (Pimentel *et al.*, 2005).

Na Figura 6 podemos observar algumas estruturas de flavonóides comumente encontradas na própolis: canferol, quercetina, isorramnetina e galangina são flavonóis; apigenina, luteolina, crisina e tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavonona e a pinobancsina é um diidroflavonol.

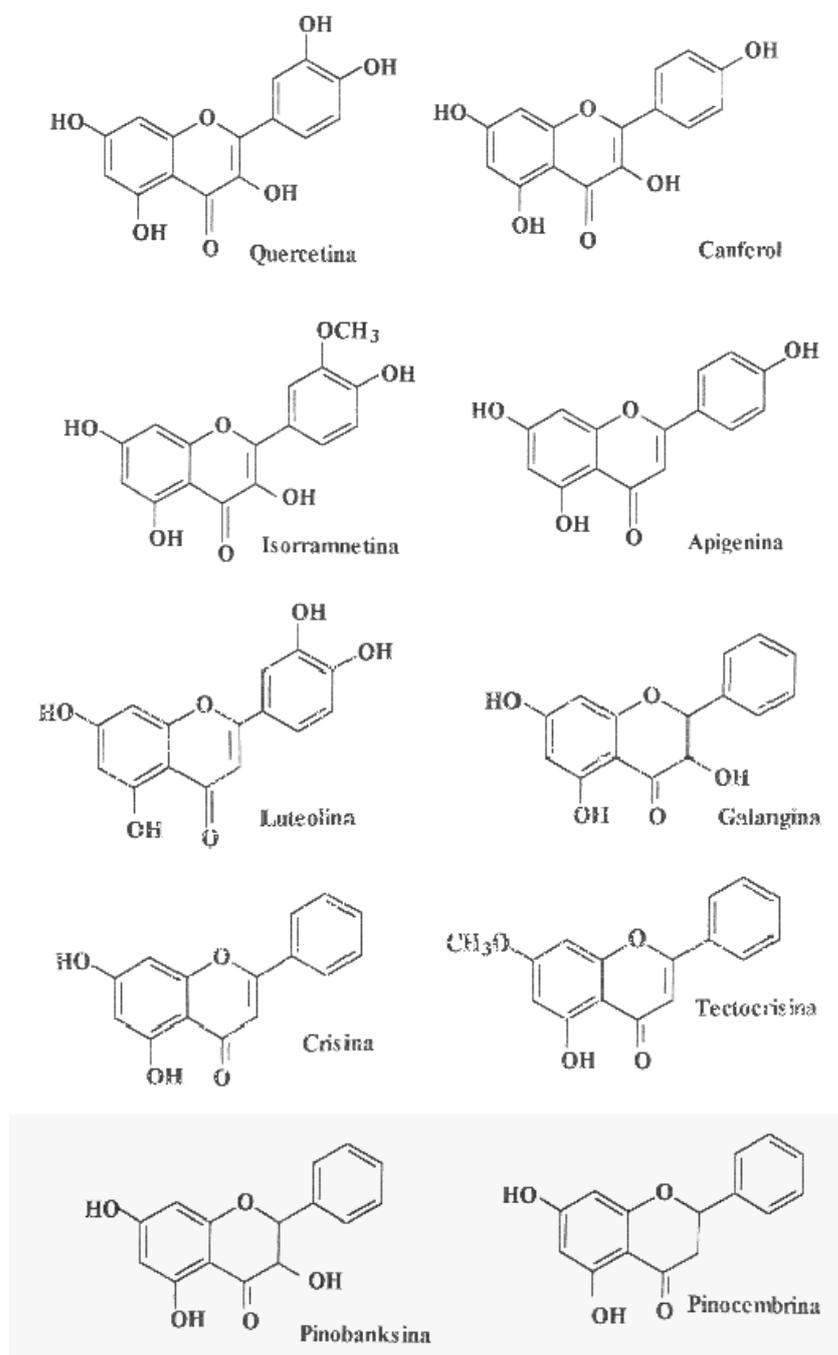


Fig. 6: Algumas classes de flavonóides encontrados em própolis (Marcucci *et al.*, 1998).

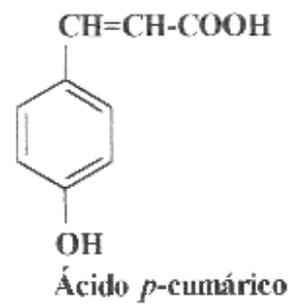
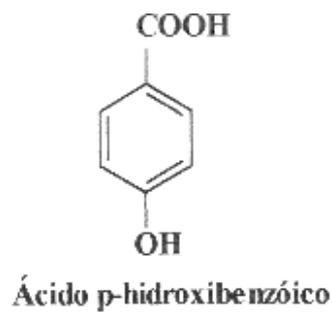
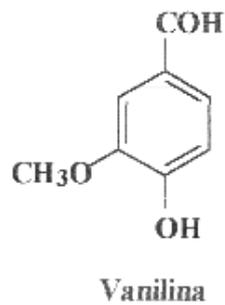
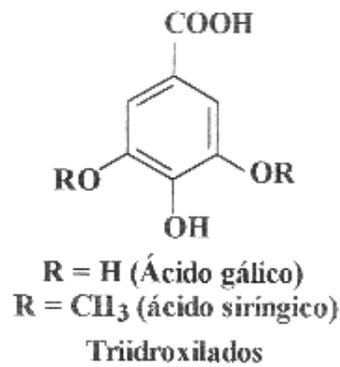


Fig. 7: Exemplos de compostos fenólicos não incluídos no grupo dos flavonóides (Marcucci *et al.*, 1998).

Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A e a banda I devido ao anel B. As diferentes classes dos flavonóides possuem bandas de absorção característica (Tabela 2).

Tabela 2: Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica e em presença de cloreto de alumínio (AlCl₃).

Tipo de flavonóide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl ₃ (nm)**
Flavonas	310-350	250-280	+ 35 – 55 *
Flavonóis(3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50 - 60 *
Flavonóis (sem 3-OH)	350-385	250-280	+ 35 - 55 *
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10 – 14
Isoflavonas (5-desoxi-6,7-dioxigenadas)	320 pico	275-295	+ 11 – 30
Flavanonas e diidroflavonóis	300-330 ombro	230-270	+ 20 – 26 *
Chalconas	340-390	230-270	+ 48 - 64 *
Auronas	465-560	270-280	+ 40 * + 60 - 70 *

* Têm um desvio batocrômico (para comprimentos de onda maiores) na faixa de (mostrada na tabela). ** Em 425 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de AlCl₃, por isso não há interferência destas substâncias no doseamento de flavonóides. **Fonte:** Aldemann, 2005.

O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (MARCUCCI *et al.*, 1998). Então, de um modo geral, apresentam maior absorção na faixa entre 250 e 350 nm (Tabela 3) (PARK *et al.*, 1995).

Tabela 3- Comprimentos de onda de absorção das principais classes de flavonóides.

Classe dos Flavonóides	Exemplos	Solvente	Faixa de variação da absorção (nm) para as classes de flavonóides	λ max (nm) principal e (secundário) para o exemplo
Antocianinas	cianidina-3-rutinosídeo	0,01% HCl em metanol	269-289 310-333 495-538	523 (290)
Flavonas	Luteolina	Etanol	248-286 332-356	350 (255; 268)
Flavonóis	Canferol	Etanol	252-268 345-379	368 (268)
Flavanonas	Naringenina	Etanol	215-233 278-290 312-335	325 (290; 224)
Isoflavonas	Genistina	Etanol	241-275 296-302 320-335	262 (330)
Chalconas	Neoplatimenina	95% etanol	235-266 320-385	393 (268; 320)
Auronas	Hispídiol	95% etanol	234-272 254-355 388-413	388 (234; 254)
Xantonas	Mangiferina	95% etanol	230-245 250-265 305-330 340-400	258 (242; 316; 364)

Fonte: Aldemann, 2005.

Uma variedade de métodos estão sendo utilizados para determinar a capacidade antioxidante, como por exemplo, a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas como lipídeos e DNA, e métodos para avaliar a degradação de radicais (FERRONATO *et al.*, 2006). Dentre esses métodos destaca-se o descrito por Pratt e Watts (1964), Hammershimdt e Pratt (1978), Pratt e Birac (1979), que consiste na oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico. Outra metodologia simples, mas igualmente informativa é o uso de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Nesse caso utiliza-se DPPH como radical

livre, permitindo-se que compostos antioxidantes reajam com o radical em soluções alcoólicas. Assim, colocando-se os compostos testados em contato com a solução contendo DPPH, é possível monitorar a diminuição da absorvância ocorrida durante a reação (TEIXEIRA, 2003).

Park *et al.* (1998) utilizaram o sistema do ácido linoléico para analisar a atividade antioxidante de extrato aquoso e etanólicos (com diferentes concentrações de etanol) e concluíram que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante. No entanto, os extratos de própolis a 70 e 80% de etanol apresentaram a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos etanólicos nas concentrações de 90, 60, 50 e 40%, respectivamente. Os extratos que apresentaram menor atividade antioxidante foram os extratos etanólico a 20% e o extrato aquoso.

Russo *et al.* (2002) determinaram a capacidade antiperoxidativa de extratos de própolis e CAPE (ácido caféico ester fenetil) e galangina e obtiveram como resultado que os extratos tem efeito protetor contra a peroxidação e uma potente capacidade de varrer radicais hidroxila.

A atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis provenientes de várias regiões geográficas (Brasil, Turquia, Nova Zelândia, Argentina, Austrália, Tailândia, Chile, Bulgária, África do Sul, China, Uzbequistão, Uruguai, Ucrânia, Estados Unidos e Hungria) foi avaliada pelo sistema do ácido linoléico e do DPPH e as amostras demonstraram possuir atividade varredora de radicais livres DPPH e capacidade de proteção de substratos lipídicos da oxidação pelo método de descoramento do β -caroteno (KUMAZAWA *et al.*, 2004).

Teixeira *et al.* (2008) investigaram a capacidade antioxidante da própolis oriunda de três diferentes localidades de Minas Gerais, utilizando DPPH. Os extratos de própolis de amostras de Itapeçerica e Paula Cândido apresentaram um alto teor de compostos fenólicos e uma pronunciada atividade antioxidante, o que não ocorreu com os extratos provenientes das amostras de Virginópolis.

8) Propriedades biológicas

A própolis tem sido utilizada na medicina popular de inúmeros países por suas atividades biológicas, podendo-se citar atividades antimicrobianas, anti-

inflamatórias, anti-sépticas, entre outras, e tem recentemente atraído a atenção dos pesquisadores pela sua riqueza química (SILVA *et al.*, 2006).

8.1) Atividade antioxidante

Diversos processos metabólicos do organismo humano produzem algumas substâncias oxidadas, denominadas radicais livres. Quando acumulados ou produzidos acima do normal, estes radicais livres provocam uma série de efeitos deletérios à saúde humana. Assim, algumas doenças estão relacionadas ao aumento de radicais livres no organismo: envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças neurológicas, entre outras. A própolis contém uma grande quantidade de compostos que possuem a capacidade de remover o excesso de radicais livres (LIMA, 2006). Entre eles os flavonóides e outros compostos fenólicos. Eles estão relacionados à habilidade da própolis na proteção contra os danos causados pelos radicais livres (RUSSO *et al.*, 2002). Esta ação antioxidante se deve ao fato de que os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI *et al.*, 1998). De fato, esses biopolifenóis demonstram interferir não apenas na propagação da reação, mas também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição quanto pela inibição de enzimas envolvidas na inicialização da reação (RUSSO *et al.*, 2002).

Os flavonóides, por serem pigmentos presentes em todas as células fotossintetizadoras, são encontrados em ervas, legumes, frutas e mel. Esse grupo pode ser dividido nos seguintes subgrupos: antocianinas, flavanas, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides. Porém, as flavononas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, as flavonas em plantas utilizadas para condimentos, os isoflavonóides em legumes, as antocianinas e catequinas em frutas e flavonóis em todas as frutas e vegetais (Tabela 4). Os nutricionistas estimam que a ingestão média de flavonóides em uma dieta normal é de 1 a 2g por dia e por serem consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana (ALDEMANN, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2005).

Tabela 4: Principais classes de flavonóides e exemplos.

Classes	Exemplos	Fontes
Antocianinas	cianidina, delphinidina	Predominantemente em frutas e flores.
Flavanas (mono, bi e triflavans)	catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, thealfavina	Flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes e bebidas como chás e água de coco.
Flavononas	hesperidina, narigenina	Encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas
Flavonas	apigenina, luteonina, diomestina, tangeretina, nobiletina, tricetina	Encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. Mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais.
Flavonóis	quercitina, rutina, miricetina	Estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas.
Isoflavonóides	daidzeína, genisteína	São encontrados quase que exclusivamente em legumes, particularmente na soja.

Fonte: Lopes, *et al.* 2000.

8.2) Atividade antibacteriana

A propriedade antimicrobiana da própolis tem sido extensivamente investigada, confirmando suas inúmeras atividades como antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiprotozoária (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998; YILDIRIM *et al.*, 2004).

A primeira investigação de atividade antibacteriana da própolis foi descrita por Kivalkina (1948) citado por GHISALBERTI (1979) que mostrou o efeito bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* e o bacilo da tifoide.

Bianchini e Bedendo (1998) testaram o efeito do extrato aquoso de própolis nas concentrações de 0,1%, 1,0% e 10% sobre cinco espécies bacterianas fitopatogênicas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Erwinia chrysanthemi*). Nesse ensaio observou-se que as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foram completamente inibidas quando submetidas ao extrato na concentração de 10%. *Erwinia chrysanthemi* foi

parcialmente inibida, e *Pseudomonas syringae* mostrou-se insensível ao extrato. As amostras com concentrações menores não apresentaram nenhum efeito sobre as bactérias estudadas.

Miorin *et al.* (2003) investigaram a atividade do extrato etanólico de própolis (30g própolis em 100mL de etanol, mantidos a temperatura ambiente por 7 dias), contra *Staphylococcus aureus* e compararam com amostras de mel. Os autores observaram que as amostras de própolis tiveram maior efeito antibacteriano quando comparado com as amostras de mel.

Yildirim *et al.* (2004) pesquisaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos da própolis turca contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador de infecção tuberculósica, em porcos guinea. Concluíram que o extrato aquoso de própolis turca possui efeito inibitório no desenvolvimento dessa infecção.

Alguns relatos atribuem essa variabilidade de resultados a complexa composição química da própolis que tem como fator de influência a sazonalidade, ou seja, são dependentes do local de origem, da espécie vegetal no qual a abelha coletou a resina, da época do ano em que essa própolis é colhida e da espécie da abelha. Sforcin *et al.* (2000) verificaram a inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) com baixa concentração de própolis (0,4%) e que para *E. coli* (Gram-negativa) foi necessária uma maior concentração (4,5 a 8,0%) para o mesmo nível de inibição, mostrando ser esta bactéria, menos susceptível a ação da própolis.

Kartal *et al.* (2003) avaliaram a atividade de diferentes extratos etanólicos (30, 50, 70 e 96% etanol) provenientes de própolis de duas regiões da Turquia, Kazan e Marmaris, contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Gram-positivas) e bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis*. Os extratos etanólicos das duas regiões apresentaram atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. subtilis*. O extrato etanólico proveniente da região de Kazan foi efetivo sobre *C. diphtheriae*, *B. catarrhalis*. A atividade antibacteriana dos extratos contra *S. pyogens*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis* não foi observado. Zonas de inibição dos extratos a 70% e 96% de etanol foram ligeiramente maiores do que os extratos a 30 e 50%. As amostras Kazan tiveram maior

poder antibacteriano do que a amostra Marmaris. Esta atividade foi relacionada à presença de ácido caféico e ésteres.

Própolis coletada por três diferentes espécies de abelhas melíferas (*Apis mellifera anatolica*, *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera caucasica*) da mesma região foram comparadas e diferenciadas quanto à sua atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). O extrato etanólico mostrou alta atividade contra *S. aureus*, mas apresentou fraca atividade sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*. Amostras de própolis coletadas pela abelha *Apis mellifera caucasica* mostrou maior atividade comparada a *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica* (SILICI e KUTLUCA, 2005).

Diversas pesquisas têm demonstrado a atividade antibacteriana da própolis e na maioria delas os resultados encontrados afirmam que ela é mais eficiente contra bactérias Gram-positivas e com baixa atuação contra Gram-negativas, mas o mecanismo ainda não foi totalmente elucidado (SILICI e KUTLUCA, 2005; VARGAS *et al.*, 2004; FERNANDES JR *et al.*, 2006). Uma das hipóteses é que os flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos atuam sobre a estrutura da parede celular. Apesar das bactérias Gram-negativas possuírem uma estrutura de parede celular menos rígida que as Gram-positivas, sua parede celular é quimicamente mais complexa. Um de seus constituintes, o lipopolissacarídeo, é que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos. Além disso, possuem um maior teor lipídico. Desta forma, tais características podem estar envolvidas na maior resistência ao extrato de própolis (VARGAS *et al.*, 2004).

8.3) Atividade Antifúngica

Os problemas ocasionados por fungos crescem exponencialmente ao longo dos anos e o tratamento com produtos químicos vem aumentando esta dificuldade. Assim como tem acontecido com os antibióticos, os fungos estão adaptando-se aos produtos antifúngicos (FEARNLEY, 2001).

Existem vários estudos envolvendo o uso da própolis no controle de fungos e leveduras patogênicos ao homem (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; SAWAYA, *et al.*, 2002; SILICI e KOC, 2006). Na maioria destes estudos ficou comprovada a eficácia da própolis no controle de doenças incitadas por fungos filamentosos ou leveduras.

Entretanto, poucos são os estudos, que relatam o potencial de uso da própolis no controle de fungos fitopatogênicos ou deterioradores de alimentos e praticamente não existem relatos do uso da própolis no controle de fungos causadores de podridões pós-colheita (TRIPHATI e DUBEY, 2004).

Metzner *et al.* (1977) citado por BURDOCK (1998) na avaliação da própolis sobre *Candida*, *Sacharomyces* e *Cryptococcus* sugere que há um efeito fungicida relacionado à presença do flavonóide pinocembrina.

Milena *et al.* (1989) citado por FEARNLEY (2001) testaram extrato etanólico de própolis a 10% contra 17 fungos patogênicos, sendo a própolis foi efetiva contra todos eles. Nesse estudo dos sete componentes da própolis testados separadamente, o ácido benzóico, ácido salicílico e vanilina foram identificados como substâncias fortemente fungistática.

Silva *et al.*, (2006) analisaram a própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* L. no Estado da Paraíba, colhida pelo método de tela plástica, determinando-se a atividade antimicrobiana em função do período de colheita das amostras. O estudo da atividade antimicrobiana foi realizado contra *Candida albicans*. Nesse estudo não foi verificada a atividade antimicrobiana da própolis sobre *C. albicans*.

Koc *et al.* (2007) pesquisaram a atividade antifúngica de extratos etanólicos de própolis turca contra seis leveduras (*Candida famata*, *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* e *Pichia ohmeri*) isoladas de quatro sucos de frutas não pasteurizados (maçã, laranja, uva branca e mandarin). Como resultado, houve uma significativa atividade antimicrobiana da própolis sobre as leveduras estudadas.

Ozcan (1999) determinou o efeito inibitório de extratos de própolis aquosos nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 and 4%, sobre os fungos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* e *Penicillium digitatum*. A concentração de 4% foi a que apresentou maior efeito e os fungos mais afetados por todas as concentrações foram *Alternaria alternata* e *Penicillium digitatum*. A concentração de 4% do extrato de própolis mostrou uma inibição do crescimento micelial maior do que 50% em todos os fungos testados.

Ozcan (2004) avaliou o efeito de extratos de pólen e própolis de diferentes regiões da Turquia, em duas concentrações (2 e 5%) sobre o crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus*. O extrato de própolis

apresentou um maior efeito sobre o fungo comparado ao extrato de pólen. A maior concentração do extrato (5%) foi a que teve maior efetividade sobre *A. parasiticus*.

Silici *et al.* (2005) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis adicionados em quatro sucos de frutas não pasteurizados, sobre três isolados de *Penicillium* e um Zygomycota.

Além de potencialmente inibir o crescimento micelial e germinação de esporos de fungos (DA SILVA *et al.*, 2007), a própolis pode atuar na inibição da produção de toxinas por esses organismos (PEPELJNJAK *et al.*, 1982; KHERZI *et al.*, 2006; ALY e ELEWA, 2007).

Em um estudo sobre a atividade dos extratos de própolis nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL sobre *Aspergillus sulphureus* e a produção de ocratoxina A, Pepeljnjak *et al.* (1982) evidenciaram que todos os extratos inibiram o crescimento deste fungo até o décimo dia de incubação e somente a concentração de 2,0 mg/mL teve um efeito fungistático. Ainda de acordo com estes autores, a quantidade de ocratoxina A produzida foi proporcional ao crescimento do *A. sulphureus* (PEPELJNJAK *et al.*, 1982).

Kherzi *et al.* (2006) determinaram o efeito da própolis obtida a partir de quatro solventes (hexano, diclorometano, metanol e água quente) no crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e na produção de aflatoxina em pistache. Os extratos com diclorometano e hexano foram os que tiveram maior atividade antifúngica. O efeito do extrato de diclorometano foi testado na produção de aflatoxina e houve uma baixa concentração dessa toxina (1,28 ppb no tratamento e 7,3 ppb no controle).

Aly e Elewa (2007) utilizaram extrato aquoso de própolis (concentrações de 250, 500 e 1000 ppm) na superfície de queijo egípcio tipo Ras para inibição de *Aspergillus versicolor*, produtor de esterigmatocistina, durante a maturação do queijo. O crescimento fúngico e a produção de toxina foram completamente inibidos pelo extrato de própolis na concentração de 1000 ppm, enquanto as menores concentrações exibiram um efeito fungistático durante os 90 dias de maturação do queijo.

De acordo com Burdock (1998) os flavonóides, ácidos fenólicos e flavonas tais como a galangina e a quercetina são os responsáveis por esse efeito inibitório. A ação da quercetina tem sido atribuída à inibição da síntese

de proteína, DNA e da função da membrana citoplasmática do fungo e subsequentemente na produção de toxina.

Os fungos apresentam diferentes comportamentos quanto a sensibilidade e tolerância frente à própolis, podendo haver influência do grupo ao qual eles pertencem (Ascomycota Zigomycota, Basidiomycota ou Oomycota) ou até mesmo a fase do ciclo de vida (germinação ou crescimento) no qual encontram-se (DA SILVA *et al.*, 2007, 2008).

9) Patologia pós-colheita e uso da própolis como método alternativo de controle

A perda de alimentos é um problema antigo, em que foi preciso o desenvolvimento de tecnologias de preservação para tentar acabar com a fome e a má nutrição, principalmente em áreas com altos índices de crescimento demográfico. As perdas pós-colheita são geralmente maiores em países em desenvolvimento ou emergentes como o Brasil, onde os índices chegam a 30% ou mais da produção. As principais causas são a deficiência de recursos humanos qualificados, o uso de tecnologias inadequadas do plantio ao armazenamento, o descuido no manuseio dos produtos, o ataque de pragas e doenças e a deficiência da infra-estrutura para o atendimento das necessidades do setor agrícola (CHITARRA e CHITARRA, 2005; VENTURA *et al.*, 2007). Essas perdas podem ser quantitativas e/ou qualitativas. A perda quantitativa corresponde à redução no peso do produto por perda de água ou perda de matéria seca, também podendo ser incluído nessa categoria a perda por manuseio e a perda acidental. As perdas qualitativas são expressas por diversos aspectos, como por exemplo, pelo surgimento de manchas que afetam o aspecto visual; e por sintomas como sarna e verrugose que tornam o produto menos atrativo mesmo não ocorrendo grandes danos ao tecido do hospedeiro. Já que o consumo *in natura* se dá pelo aspecto visual tais alterações podem tornar o produto não-comercializável. Podridões que alteram a consistência e o sabor, e a presença de micotoxinas tornam o produto inviável para o consumo humano são classificadas dentro de perdas qualitativas (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

As infecções por microrganismos, como fungos, bactérias, e em menor proporção vírus, favorecidos por danos físicos e fisiológicos que predispõem os

produtos à invasão de fitopatógenos, são as mais sérias causas de perdas pós-colheita em produtos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Das mais de 100.000 espécies de fungos conhecidas, menos de 10% são fitopatogênicas e dentre estas, apenas 100 espécies de fungos são responsáveis pela maioria das doenças pós-colheita (TRIPHATI e DUBEY, 2004). Uma lista de doenças pós-colheita e seus organismos causais é descrita na Tabela 5.

Os patógenos mais importantes nas doenças pós-colheita em frutas são os fungos, principalmente atuando como agentes de podridões. A maioria deles requer injúria na superfície dos frutos para infecção. Determinados grupos de fungos tem especificidade para certos grupos de fruteiras, por exemplo, *Colletotrichum gloeosporioides* e espécies de *Lasiodiplodia* para fruteiras tropicais, *Rhizopus stolonifer*, fruteiras temperadas e tropicais, mas há também a especificidade com relação à espécie hospedeira, como por exemplo, *Colletotrichum musae* que só infecta a banana, e o *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* que só infecta o abacaxi (VENTURA *et al.*, 2007).

Alguns autores afirmam que as perdas decorrentes do ataque de microrganismos bem como deterioração fisiológica durante o período entre a colheita e o armazenamento possam estar entre 5 e 50%, e em alguns casos chegar a ser total (VENTURA *et al.*, 2007).

Diversas estratégias para controle de microrganismos são pesquisadas com intuito de reduzir o inóculo inicial, prevenir e erradicar infecções em campo, inativar infecções originadas de injúrias e inibir o desenvolvimento e disseminação dos patógenos (VENTURA *et al.*, 2007).

Para que essas estratégias sejam efetivas alguns métodos são aplicados: uso de métodos combinados, métodos físicos (uso de frio, calor, e irradiação, ultra-som, atmosfera modificada/controlada), controle biológico, métodos químicos e uso de produtos naturais (CHITARRA e CHITARRA, 2005; VENTURA *et al.*, 2007).

Tabela 5: Listagem de doenças pós-colheita de frutas e respectivos agentes causais

Cultura	Agente causal
Maçã	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Monilinia fructigena</i> ; <i>Pezicula alba</i> ; <i>Penicillium expansum</i>
Abacate	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Banana	<i>Colletotrichum musae</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i> ; <i>Magnaporthe grisea</i>
Citrus	<i>Alternaria citri</i> ; <i>Pseudomonas syringiae</i> pv. <i>syringiae</i> ; <i>Penicillium italicum</i> ; <i>Penicillium digitatum</i> ; <i>Phytophthora citrophthora</i> ; <i>Diaporthe citri</i> ; <i>Elsinoe fawcetti</i> ; <i>Septoria depressa</i> ; <i>Diaporthe citri</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Uva	<i>Alternaria</i> spp.; <i>Elsinoe ampelina</i> ; <i>Melanconium fuligineum</i> ; <i>Guinardia bidwelli</i> ; <i>Plasmopora viticola</i> ; <i>Botryotinia fuckeliana</i> ; <i>Rhizopus stolonifer</i>
Manga	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Mamão	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Phoma caricae-papayae</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Pêra	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Penicillium</i> spp.; <i>Nectaria galligena</i>
Abacaxi	<i>Ceratocystis paradoxa</i> ; <i>Gibberella fujikoroj</i> ; <i>Penicillium funiculosum</i>
Morango	<i>Botryotinia fuckeliana</i> ; <i>Rhizopus</i> spp.

Fonte: Ventura *et al.*, 2007.

Uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de própolis devido a sua atividade antibacteriana e antifúngica (TOSI *et al.*, 1996). A maioria dos estudos envolve o uso de própolis para o controle de fungos patogênicos em humanos e leveduras em geral (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; SAWAYA *et al.*, 2002; SILICI e KOC, 2006). Poucos são os estudos envolvendo própolis no controle de fungos fitopatogênicos e praticamente não existem relatos para controle de fungos causadores de podridões pós-colheita (TRIPHATI e DUBEY, 2004).

Da Silva *et al.*, (2008) investigaram o efeito inibitório de extratos de própolis aquoso e etanólico (50, 93 e 99 %) nas concentrações de 2 e 3% sobre o crescimento micelial de *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Lasiodiplodia theobromae*. O extrato aquoso não apresentou efeito sobre os fungos estudados. *P. capsici* apresentou inibição superior a 90 % para a concentração de 2 % do extrato etanólico a 50 %. Nenhum dos extratos nas concentrações testadas tiveram efeito significativo na inibição do crescimento micelial de *L. theobromae*. A inibição dos demais fungos variou em função da concentração, entretanto, a concentração de 3 % foi a mais efetiva.

10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. (2005). **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. UFPR. 186 p.

AGÊNCIA ALAGOAS. (2009). **O mundo de olho na própolis vermelha de Alagoas** (25 de janeiro de 2009). Disponível em: <<http://www.agenciaalagoas.al.gov.br>>. Acesso em: março de 2009.

ALY, S. A.; ELEWA, N. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. **Journal of Dairy Research**. 74: 74-78.

BACHA, G. (2005). Arquivo particular de fotos. E-mail: gabriel_6713@hotmail.com

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N.L. (1983). A study on flavonoids of própolis. **Journal of Natural Products**. 46: 471-474.

BANKOVA, V. S.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, J. (1992). Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatography. **Journal chromatography**. v. 607: 150-153.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. (1998). Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**. 29: 361-367.

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

BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I. K., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., MESSAGE, D., HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from

Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**. 72: 239-246.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, L. P. (1998). Efeito antibiótico do propolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**. 55(1): 1-6.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. (2001). Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VII– Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

BURDOCK, J. S. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**. 36: 347-363.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. (2005). **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. UFLA, Lavras.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J. S. (2005). **Manual Prático de Criação de Abelhas**. Viçosa: Aprenda Fácil. 424 p.

COSTA, P. S. C. (2007). **Produção e processamento de própolis e cera**. CPT, Viçosa.

COUTO, R. H.N.; COUTO, L. A. (2002). **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP. 2ª ed. 191 p.

DA SILVA, A. F.; SILVA JR., G. J.; SILVA, M.B.L.; SOARES, D. J.; CHAVES, J. B. P. (2007). **Atividade antifúngica de diferentes extratos comerciais de própolis**. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia. Recife.

DA SILVA, A. F.; CHAVES, J. B. P.; BATISTA, T. A. S.; SOARES, D. J.; PEREIRA, O. L.; MESSAGE, D. (2008). **Extractos de propóleos: una alternativa para el control de hongos postcosecha**. In: IV Congreso Latino Americano de Micología. Mar del Plata: Argentina.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J.A.; PARK, Y. K. (2006). Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**. 89. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acessado em: 07 de abril de 2007.

DRAGO, L., MOMBELLI, B., DE VECCHI, E., FASSINA, M.C., TOCALLI, L., GISMONDO, M.R. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis drug extract. **Journal of Chemotherapy**. 12: 390–395.

FEARNLEY, J. (2001). **Bee propolis: Natural healing from the hive**. London: Souvenir Press. 172 p.

FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. (1997). Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 3(2): 287-294.

FERNANDES JR, A., LEOMIL, L., FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. (2001). The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 7 (2): 173-182.

FERNANDES JR, A., LOPES, M. M. R., COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C.M.; VIEIRA, E.P. (2006). Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. 36 (1): 294-297.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. (2006). Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**. 10 (2): 67-70.

FONTANA, J. D., PASSOS, M., SANTOS, M. H. R. D., FONTANA, C. K., OLIVEIRA, B. H., SCHAUSE, L., PONTAROLO, R., BARBIRATO, M. A., RUGGIERO, M. A.; LANÇAS, F. M. (2000). Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillarychromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action. **Chromatographia**. 52 (3/4): 147-151.

GHISALBERTI, E. L. (1979). Propolis: a review. **Bee World**. 60: 59-84.

GREENWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**. 71:107-118.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. (1978). Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**. 43(2): 556-559.

HEGAZI, A. G., HADY, F. K. A. E.; ALLAH, F. A. M. A. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung**. 55C: 70-75

HIGASHI, K. O.; CASTRO, S. L. D. (1994). Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 43: 149-155.

JAUSSI, F. **Bienenprodukte**. Disponível em: <<http://www.apis.admin.ch>>. Acesso em: abril de 2005.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYAA, S.; KURUCU, S.; TOPÇUET, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal Ethnopharmacology**. 86: 69–73.

KHEZRI, M; ROSTAMI, S; RISEH, R. S; ALIZADEH, A. (2006). Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (*Pistacia vera* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**. 8(5): 606-608.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. (1997). Investigation of flavonoids aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 61: 367-369.

KOC, A. N.; SILICI, S.; MUTLU-SARIGUZEL, F.; SAGDIC, O. (2007). Antifungal Activity of Propolis. **Food Technology and Biotechnology**. 45 (1) 57–61.

KONISHI, S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUSTODIO, A. R.; CUNHA, I. B.da S.; SHIMIZU, M. T. (2004). Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**. 75. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 16 de abril de 2005.

KUJUMGIEV, M.A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**. 64: 235–240.

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

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

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. da SILVA. (2000). Flavonóides. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 17: 18-22.

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. (2000). **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. Congresso Internacional de Propoleos. Argentina. Disponível em: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>. Acesso em: novembro de 2006.

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

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G.; SALATINO, A. (1998). Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**. 46. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2006.

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

MENEZES, H., JR, M. B., OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. (1997). Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**. 28 (2): 71-76.

MIORIN, P. L., JUNIOR, N. C. L., CUSTODIO, A. R., BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. 95: 913-920.

MORENO, M. I. N., ISLA, M. I., SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. 71 109-114.

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

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; CHANG, R.; REIS, D. C. (2007) Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Mensagem Doce**. 91. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: dezembro de 2005

OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (2006). **Patologia pós-colheita**. In: Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Oliveira, S. M. A.; Terao, D.; Dantas, S. A. F.; Tavares, S. C. C. H. (eds.). EMBRAPA, Brasília.

OZCAN, M. (1999). Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**. 50(5): 395-398

OZCAN, M. (2004). Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. **Journal of Medicinal Food**. 7(1): 114-116

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H. (1995). Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. 38(4): 1253-1259.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. (2000). Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**. 58. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acessado em: 04 de dezembro de 2005.

PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C.L.; FUJIWARA, F. E PARK, Y.K. Estudo das própolis que contém Artepillin C. (2003). **Mensagem Doce**. 74. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 16 de setembro de 2005.

PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, D. (1982). Inhibition of growth and biosynthesis of ocratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. **Pharmazie**. 37: 439-440.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas respectivas futuras. **Química Nova**. 25 (2): 321-326.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. (2005). **Alimentos funcionais-Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela. 95p.

POPOVA, M., BANKOVA, V., CHIMOV, A.; SILVA, M. V. (2002). A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum*.

Apidologie. 33: 87-88.

PRATT, D. E; WATTS, B. M. (1964). The antioxidant of vegetable extracts I. Flavone aglycones. **Journal of Food Science.** 29 (1) 27-33.

PRATT, D. E; BIRAC, P. M. (1979). Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science.** 44 (6): 1720-1722.

RUSSO, A., LONGO, R.; VANELLA, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia.** 73: S21-S29.

SANTOS, F. A., BASTOS, E. M. A., RODRIGUES, P. H., UZEDA, M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. D. M.; MOREIRA, E. S. A. (2002). Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe.** 8: 9-15.

SAWAYA, A. C. H. F.; PALMA, A. M.; CAETANO, F. M.; MARCUCCI, M.C.; DA SILVA CUNHA, I. B.; ARAUJO, C. E. P.; SHIMIZU, M. T. (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Letters in Applied Microbiology** . 35: 203–207

SFORCIN, J. M., FERNANDES Jr, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology** 73:69-73.

SILICI, S; KUTLUCA, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology.** 99 (1):243–249.

SILICI, S; KOC, N. A; SARIGUZEL, F. M; SAGDIC, O. (2005). Mould inhibition in different fruit juices by propolis. **Archiv fur Lebensmittelhygiene.** 56(4): 87-90.

SILICI, S.; KOC, N. A. (2006). Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Letters in applied microbiology**. 43(3):318-24.

SILVA, M. S. S.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A. D. (2005). Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**. 28(5): 801-804.

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

SOUSA, S. S. S.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. (2006). Constituintes do óleo essencial da propolis produzida na cidade de Pão de Açúcar-PI. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**. 8 (4): 1-3.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R. M. A.; SALATINO, A. (2003). Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Boletim de Indústria Animal**, 60 (1): 83-106.

TEIXEIRA, E. W. (2003). **Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais e suas atividades biológicas**. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. UFV. 171 p.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRIS, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. (2008). Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **eCAM (Evidence-based Complementary and Alternative Medicine)**. 177: 1-9.

TOSI, B.; DONINI, A., ROMAGNOLI., BRUNI, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy Research**. 10: 335-336.

TRIPHATI, P., DUBEY, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**. 32: 235–245.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. (2004). Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**. 34 (1): 159-163.

VENTURA, J. A., ZAMBOLIM, L., COSTA, H. (2007). **Patologia pós-colheita: doenças do mamão, banana e abacaxi**. In: II Simpósio Brasileiro de pós-colheita. Sediama, M. A. N., Barros, R. S., Flores, M. E. P., Salomão, L. C. C., Puschmann, R. (eds.). UFV, Viçosa.

YLDIRIM, Z.; HACIEVLIYAGIL, S.; KUTLU, N. O.; AYDIN, N. E.; KURKCUOGLU, M.; IRAZ, M.; DURMAZ, R. (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea pigs. **Pharmacological Research**. 49. 287-292

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**. 2005. Guaíba: Novos Livros. 2ª ed. 378p

CAPÍTULO II

ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS SOBRE FUNGOS CAUSADORES DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA

RESUMO

O efeito inibitório de diferentes extratos de própolis foi testado sobre a germinação de conídios e o crescimento micelial de nove fungos considerados importantes fitopatógenos em pré e pós-colheita. Para avaliar o efeito inibitório da própolis sobre a germinação dos conídios dos fungos *Aspergillus flavus*, *Alternaria brassicae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum musae*, foram usados extratos comerciais de própolis (aquoso, alcoólico e propilenoglicol) nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5%. Para os testes de inibição do crescimento micelial dos fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora capsici* e *Rhizopus stolonifer*, utilizaram-se preparações de extratos de própolis (aquoso e alcoólico) obtidas no laboratório, nas concentrações de 2 e 3%. Os extratos aquosos não apresentaram efeito inibitório da germinação e do crescimento micelial, dos fungos testados. Os extratos alcoólico e de propilenoglicol inibiram em mais de 80% a germinação de conídios de *A. brassicae* e *C. musae* nas concentrações de 0,5 e 1,0%, respectivamente. Embora a germinação dos conídios de *A. flavus* e *B. sorokiniana* não tenha sido inibida, observou-se a redução do tubo germinativo em relação à testemunha. Maiores índices de inibição do crescimento micelial foram alcançados nas preparações com álcool a 3% para todos os fungos testados. *Lasiodiplodia theobromae* foi o fungo menos suscetível, enquanto *P. capsici* foi o mais suscetível. Os demais fungos apresentaram um comportamento variável.

Palavras-chave: própolis, atividade antifúngica, pós-colheita.

ABSTRACT

PROPOLIS EXTRACTS ACTIVITY AGAINST POST-HARVEST FUNGI

Two assays were carried out to determine propolis effects as an alternative control in two distinct stages in the development of different phytopathogenic fungi. The effect of different propolis extracts was tested against germination and mycelial growth of several fungi deemed as important pre and post-harvest pathogens. To evaluate the inhibitory effect on conidia germination of *Aspergillus flavus*, *Alternaria brassicae*, *Bipolaris sorokiniana* and *Colletotrichum musae*, commercial extracts of propolis (aqueous, ethanolic and propylene glycol) were used in concentrations of 0.1; 0.5; 1.0 and 1.5% added to water-agar media. Laboratory propolis preparations (aqueous and ethanolic) in concentrations of 2 and 3% were used to test the inhibitory effect on mycelial growth of *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora capsici* and *Rhizopus stolonifer*. Aqueous extracts had no inhibitory effect on conidia germination and mycelial growth of tested fungi. Commercial ethanolic and propylene glycol extracts showed an inhibitory effect over 80% of the conidia germination of *Alternaria brassicae* and *Colletotrichum musae*, in concentrations of 0.5 and 1.0%, respectively. Although conidia germination of *Aspergillus flavus* and *Bipolaris sorokiniana* was not inhibited, their germ tubes were clearly shorter than the controls. Regarding the mycelial growth assay, higher inhibitions were achieved with ethanol preparations added to the medium at 3% for all test fungi. *Lasiodiplodia theobromae* was the least susceptible fungus, while *Phytophthora capsici* was the most susceptible. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* showed a variable behavior.

Key-words: propolis, antifungal activity, post-harvest diseases

1- Introduction

Infections by fungi, bacteria and, in smaller proportion virus, are the most serious causes of post-harvest losses in fruits and vegetable products. Such losses can reach 100% (TRIPHATI e DUBEY, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006, CHITARRA e CHITARRA, 2005). However, the most important pathogens associated with post-harvest diseases in fruits are the fungi. Discoloration and rots that affect the visual aspect, consistency, flavor and also micotoxins presence are factors that turn product less attractive and unviable for consumption (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Chemicals are the main products used to minimize post-harvest losses caused by fungi. For this reason they are the major contaminants of fruits and vegetables. In the last years many compounds has been banished from the official lists due to residues and/or developed toxicant metabolites (CHITARRA e CHITARRA, 2005). As an alternative to chemical fungicides, several strategies for microorganisms control have been studied focusing on reducing the initial inoculum, to prevent and to eradicate infections from field, and to reduce or to inhibit the development and dissemination of the pathogens in post-harvest (VENTURA *et al.*, 2007).

Among those, the use of safe alternative products, like essential oils or other plant derivate extracts, which does not leave residues, are worth attention. Propolis, due its antibacterial and antifungal activity, also has been investigated (TOSI *et al.*, 1996; COSTA, 2007).

There are several studies involving propolis in the control of pathogenic fungi and yeasts in humans (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; SAWAYA *et al.*, 2002; SILICI e KOC, 2006). However, few are the studies involving propolis for controlling of phytopathogenic fungi and there are almost no reports for the control of post-harvest fungi (TRIPHATI e DUBEY, 2004).

Propolis is a complex substance, with varied coloration and consistency, which derivate from resin collected by bees from several parts of plants such as sprouts, floral buttons, stems exsudates or leaf buds, added of the enzyme β -glicosidase (bee salivary enzyme). Propolis color, flavor, odor, consistency, chemical composition and biological activity depend on plant species and the collection time period of the year (MARCUCCI, 1995; PARK *et al.*, 1998, PAULINO, 2004).

Commercially, propolis occupies prominent place in apicultural products national and international market due to its several biological activities (anti-inflammatory, cicatrizant, anaesthetic and anti-carcinogenic, antioxidant) attributed to its chemical components (GISALBERTHI, 1979; BURDOCK, 1998; PARK *et al.*, 1998; ASÍS, 1989; TEIXEIRA, *et al.*, 2003; PAREDES-GUZMÁN *et al.*, 2003; LIMA, 2006).

Several types of solvents can be used for propolis extraction depending on intended use (MALASPINA e PALMA, 2000). Most of the propolis components are oil soluble substances, but extraction in ethanol, mainly ethanol, is the most common (SUZUKI, 2000).

Propolis extraction in water is possible; however the extract type has low stability and is easily contaminated (MALASPINA e PALMA, 2000). Studies with aqueous extract are incipient, but some authors believe they are as effective as the ethanolic extract, while others point that these extracts possess different and lower effectiveness (ALY e ELEWA, 2007; PINTO, 2000; PARK *et al.*, 1998).

Propolis contains a variety of chemical compounds such as ethanols, aldehydes, acids and aliphatic esters, fatty acids, amino acids, aromatic acids, aromatic esters, steroids, ketones, charcones and D-hidrocharcones, flavonoids (flavones, flavonols and flavonones), terpenoids, triterpenoids, vitamins A, B₁, B₂, B₆, C, E and minerals (Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn and Cr). Some of these chemicals are considered as antifungal (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000).

Once post-harvest diseases caused by fungi represents considerable economical losses and due to the great potential of propolis as an antimicrobial agent, the present work had as aimed at evaluating the effect of different propolis extracts in different concentration on mycelial growth and conidia germination against some post-harvest fungi.

2) Material and methods

2.1- Assay on inhibition of conidia germination

Aqueous, ethanolic and propylene glycol commercial propolis extracts were acquired in Viçosa market, Minas Gerais State. In all the packagings the manufacturers labeled that the extracts are of green propolis.

Pure cultures of *Aspergillus flavus*, *Alternaria brassicae*, *Colletotrichum musae* and *Bipolaris sorokiniana* were obtained from the mycological collection of Plant Diseases Clinic from Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais State, Brazil.

To evaluate the germination, water-agar medium 15 % w/v was used. After autoclaving the medium, the extracts were incorporated at 0.1 , 0.5 , 1.0 and 1.5 % concentrations.

Medium (15 mL/plate) containing extracts in different concentrations as well as the controls were dispensed into Petri plates. A 20 μ L aliquot of the conidia suspension containing 10^6 or 10^7 spores/mL (calibrate using a haemocytometer) was homogeneously distributed on medium using a Drigalski spatula. Petri plates were maintained at 25 ± 2 °C for 24 hours. The first 100 conidia were randomly counted under light microscope. Conidia were considered germinated when the germinative tube was twice larger than their major size. Percentage of conidia germination inhibition was determined using the control plate as the relative 100 % of conidia germination.

2.2- Assay on Inhibition of mycelial growth

Crude propolis sample classified as “ultra-green exportation type” was obtained from an emporium in Nova Lima, Minas Gerais State, Brazil. Its physical-chemical characterization as provided by the emporium which total phenolic substances was 10.41 %, and flavonoid (quercetin g/100g) was 4.06 %.

Four types of extracts were prepared, one aqueous extract and three extracts with different concentrations of ethanol (50, 93.8 and 99). Three control treatments were added to the study (without extract, only cereal ethanol (ALC) and a commercial ethanolic extract). The commercial ethanolic extract (COM) of green propolis was acquired in a local store in Viçosa, Minas Gerais State.

Propolis samples were grinded and homogenized in a mill (model SIEMENS) for subsequent extract production.

Aqueous propolis extract (AE) was prepared as described by Matsushige *et al.* (1996), in which 2 g of grinded and homogenized crude propolis were added to 25 mL of deionized water. The mixture was maintained for 2 hours at 95 °C in a thermostated water bath (model MARCONI MA 470152). After extraction, the suspension was separated by centrifugation (model BECKMAN J2-MC rotor JA 20) at 8800 *g* for 10 minutes and the supernatant stored in amber flasks, in refrigerator at 10 °C (PARK *et al.*, 1998).

Ethanolic extracts were prepared as described by Park *et al.* (1998), where 2 g of crude propolis, grinded and homogenized, were added to 25 mL of ethanol 99.3 % (ET99), cereal ethanol at 50 % (EC50) and 93.8 % (EC93) and the extraction was carried out at 70 °C in a thermostated water bath for 30 minutes, under constant stirring. Extracts were then centrifuged and stored as previously described.

Phytophthora capsici, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Lasiodiplodia theobromae* pure cultures were obtained from mycological collection of Plant Diseases Clinic from Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais State, Brazil.

To evaluate mycelial growth inhibition, PCA (potato carrot agar) medium was used (DHINGRA e SINCLAIR, 1996). After autoclaving the medium, the extracts and controls were incorporated at concentrations of 2 % and 3 %. The medium containing the treatments was dispensed (15 mL/plate) into Petri plate. A 5 mm disc, obtained from the periphery of 7 days-old cultures grown in PCA at 25 ± 2 °C, of each tested fungi was transferred to the center of each plate.

Plates were kept at 25 ± 2 °C with 12 hours photoperiod. The inhibitory effect on mycelial growth by the different extracts was evaluated when the test plates reached the border of the Petri plate, i.e. diameter growth was calculated from four measurements along perpendicular axes after the control plate reached the plate edge. Percent of mycelial inhibition was calculated as following:

$$I = ((C - T)/C) \times 100, \text{ where:}$$

I = inhibition (%)

C = colony diameter of mycelium from the control plate (mm)

T = colony diameter of mycelium from each treatment plate (mm)

2.3- Experimental design and statistical analysis

The experimental design for the germination assay was completely randomized with three repetitions. The results were evaluated descriptively.

In the mycelial inhibition assay, the experiment was led considering a 3 x 6 factorial (concentration x type of the extract) in a completely randomized design with four repetitions. SAS program (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc. North Carolina, USA), version 9.1, licensed to Universidade Federal de Viçosa was used for statistical analysis. Duncan's multiple range test was applied for mean comparison. Significance level for all statistical tests was $p < 0.05$.

3) Results

3.1- Inhibition of conidia germination by propolis extract

Results of the inhibition conidia germination by propolis extracts are summarized in Table 1.

To all tested fungi and concentrations the aqueous extract had low/no effect on inhibition of conidia germination. *C. musae* in relation to others fungi studied presented a higher inhibition, reaching 20.0, 19.0 and 18% inhibition at 1.5, 1.0 and 0.5% concentration, respectively. This is a fungus more susceptible to propolis extracts. Propylene glycol and ethanolic extracts inhibited 91.4-100%, respectively, of conidia germination of *Colletotrichum musae* at 0.5 % concentration.

A. brassicae presented a expressive inhibition (100.0 and 94.0%) in the ethanolic and propylene glycol extracts at 1.5% concentration. In concentrations lower 0.5% (ethanolic extract) and 1,0% (propylene glycol extract), the inhibition was high (80.0-81.0%)

Although conidia germination of *A. flavus* and *B. sorokiniana* was not inhibited, its germ tubes were clearly shorter than the controls at 1.0% and 1.5%, both in ethanolic and propylene glycol extract.

Table 1: Percent (%) of inhibition of conidia germination by propolis extract in different concentrations.

Fungi Extracts	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria brassicae</i>
Aqueous 1.5%	2.0	20.0	1.0	6.4
Aqueous 1.0%	2.0	19.0	0.7	6.0
Aqueous 0.5%	2.0	18.0	0	6.0
Aqueous 0.1%	0	-	0	0
Ethanollic 1.5%	9.0	100.0	3.4	100.0
Ethanollic 1.0%	2.0	100.0	0	-
Ethanollic 0.5%	2.0	100.0	0	80.0
Ethanollic 0.1%	1.4	24.4	0	1.7
Propyleneglycol 1.5%	2.7	100.0	2.7	94.0
Propyleneglycol 1.0%	2.0	100.0	1.0	81.0
Propyleneglycol 0.5%	2.0	91.4	0	10.7
Propyleneglycol 0.1%	1.4	20.0	0	7.7

Microscopic examination of conidia of the *Alternaria brassicae*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris sorokiniana* and *Colletotrichum musae*, after 24 h of treatment with different propolis extracts are presented in the Figure 1.

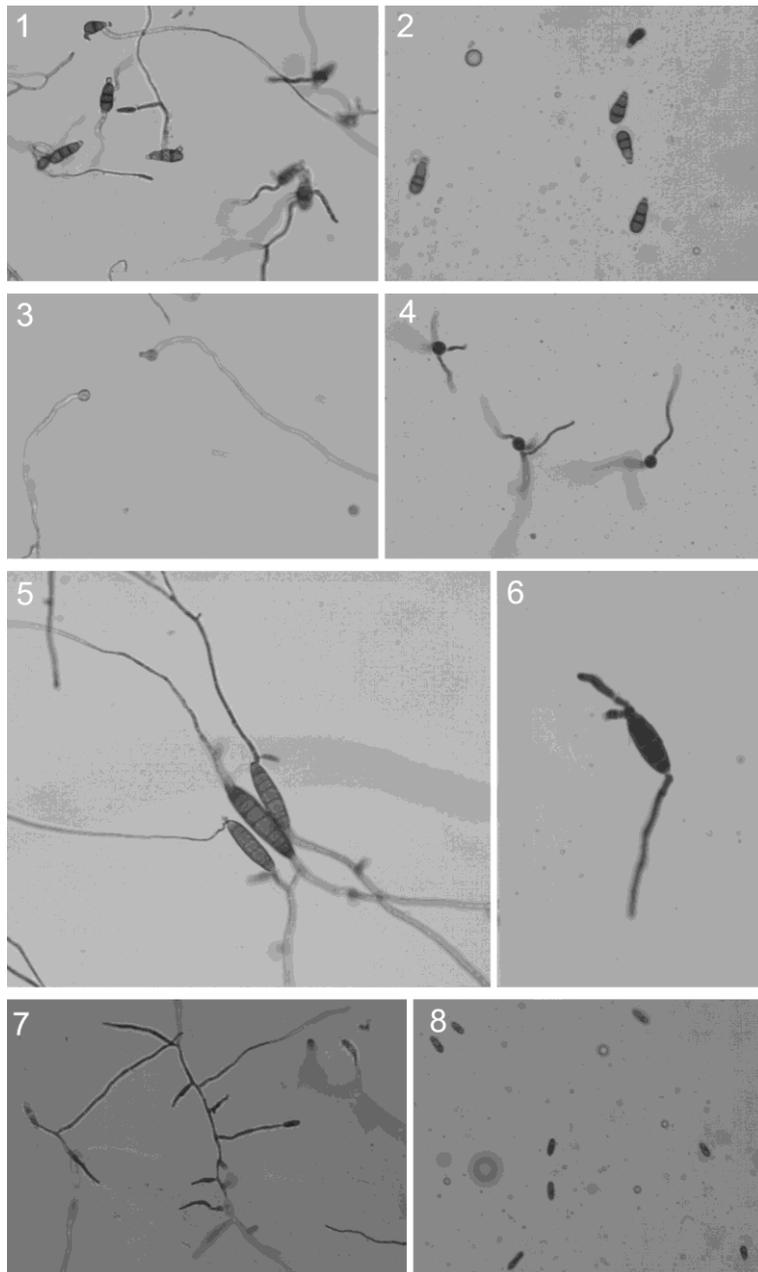


Fig. 1: Microscopic examination of conidia. 1. *Alternaria brassicae* (control); 2. *Alternaria brassicae* (ethanol extract 0.5%); 3. *Aspergillus flavus* (control); 4. *Aspergillus flavus* (ethanol extract 1.5%); 5. *Bipolaris sorokiniana* (control); 6. *Bipolaris sorokiniana* (ethanol extract 1.5%); 7. *Colletotrichum musae* (control); 8. *Colletotrichum musae* (ethanol extract 1.0%).

3.2- Inhibition of mycelial growth

Analysis of Variance (ANOVA) has shown that the interaction between type of extract and concentration for all tested fungi was statistically significant ($p < 0.05$). Thus effects on mycelial growth inhibition depended on the concentration and type of extract. Therefore, the new ANOVA was considered studying the effect of each extract into each concentration.

Higher mycelial growth inhibitions were achieved with ethanol preparations added to the medium at 3 % to all test fungi. The aqueous extract showed no inhibitory effect for the fungi tested, except for *P. capsici* and *B. cinerea* at 3 %. Although *Botrytis cinerea* have been satisfactorily inhibited by the different extracts at 2 and 3 %, it was also inhibited in the ethanol control treatment. *Lasiodiplodia theobromae* was little sensible to propolis at the tested concentrations and little mycelial inhibition was achieved; by the other hand *P. capsici* was highly sensible. *C. gloeosporioides* had an abnormal behavior once its mycelial growth on aqueous extract at 2 and 3 % and ethanol extract at 2 % was higher than on the control plates. Similar to the other fungi *R. stolonifer* was better inhibited at 3 %, but also was significantly inhibited by the ethanol control (Tables 2 and 3).

Table 2: Diameter growth of five distinct fungi during incubation in PCA amended with different propolis extracts at different concentrations.

Fungi	Conc. (% v/v)	Means (diameter growth in mm)					
		AE ¹	ALC	EC50	EC93	ET99	COM
<i>B. cinerea</i>	0	40.00 a ²					
	2	31.82 aA	8.30 bB	12.87 bB	7.45 bB	9.90 bB	9.82 bB
	3	25.90 aA	4.70 bC	10.25 cB	4.40 cB	2.85 cB	5.02 cB
<i>C. gloesporoides</i>	0	24.45 a					
	2	30.70 aA	25.77 aAB	20.52 bBC	14.45 bC	16.85 bC	14.60 bC
	3	26.82 aA	22.90 aA	13.90 cB	14.52 bB	11.10 cB	9.35 cB
<i>L. theobromae</i>	0	40.00 a					
	2	40.00 aA	40.00 aA	37.7 aA	40.00 aA	40.00 aA	34.7 aA
	3	40.00 aA	40.00 aA	33.82 aB	36.00 aAB	34.7 bAB	25.10 bC
<i>P. capsici</i>	0	40.00 a					
	2	37.45 aA	27.02 bB	3.00 bC	1.50 bC	2.5 bC	0.67 bC
	3	32.17 bA	14.87 cB	1.00 cC	1.00 bC	1.0 cC	0.00 cC
<i>R. stolonifer</i>	0	40.00 a					
	2	40.00 aA	40.00 aA	33.57 aB	22.07 bC	25.65 bC	6.02 bD
	3	40.00 aA	27.90 bB	18.15 bC	6.85 cD	8.72 cD	4.27 bD

¹ AE: aqueous propolis extract; ALC: cereal ethanol; EC50: ethanolic propolis extract at 50 % (cereal ethanol); EC93: ethanolic propolis extract at 93.8 % (cereal ethanol); ET99: ethanolic propolis extract at 99 % (ethanol); COM: commercial ethanolic propolis extract; ² Different letters (lowercase within column; uppercase within rows) indicate statistically significant differences (Duncan's test, $\alpha = 0.05$) for each fungus.

Table 3: Percent (%) of mycelial growth inhibition in relationship to control¹ for the tested fungi.

Treatment ²	<i>B. cinerea</i> (Ascomycetes)	<i>L. theobromae</i> (Ascomycetes)	<i>P. capsici</i> (Oomycetes)	<i>C. gloeosporioides</i> ⁵ (Ascomycetes)	<i>R. stolonifer</i> (Zygomycetes)
COM. 2% ³	75.43 ⁴	13.13	98.33	40.29	84.94
COM. 3%	87.44	37.25	100	61.76	89.31
ÁLC. 2%	79.25	0	32.44	- 5.42	0
ÁLC 3%	88.25	0	62.81	6.34	30.25
AE 2%	20.44	0	6.38	- 25.56	0
AE 3%	35.25	0	19.56	-7.51	0
EC50(2%)	67.81	5.75	92.5	16.05	16.06
EC50(3%)	74.38	15.44	97.5	43.15	54.63
EC93(2%)	81.38	0	85.00	36.81	44.81
EC93(3%)	89.00	10.0	97.5	40.59	82.88
ET99(2%)	75.25	0	93.75	31.08	35.88
ET99(3%)	92.88	13.25	97.5	54.60	78.19

¹ Plates with PCA without any amendment. ² COM: commercial ethanolic propolis extract; AE: aqueous propolis extract; ALC: cereal ethanol; EC50: ethanolic propolis extract at 50 % (cereal ethanol); EC93: ethanolic propolis extract at 93.8 % (cereal ethanol); ET99: ethanolic propolis extract at 99 % (ethanol); ³ Percentage of each treatment in v/v. ⁴ Means of four replicates after applying the formula $I = ((C-T)/C) \times 100$. ⁵ Negative values in *C. gloeosporioides* mean growth higher than control.

4) Discussion

The present study clearly show that propolis has an antifungal effect, and that it is variable depending on the solvent, similar as reported by previous works (TOSI *et al.*, 1996; SILICI *et al.*, 2005; KHERZI *et al.*, 2006, LONGHINI *et al.*, 2007). Water was considered ineffective to extract the antifungal propolis principles, since no inhibitory effect was obtained with its extract. These results apparently are in disagreement with other that showed aqueous extracts having antifungal activity (ÖZCAN, 1999; ALY e ELEWA, 2007). However, in the later work (ALY e ELEWA, 2007) water was not used as an extractor (solvent), but as a vehicle. Results of studies using water as solvent corroborate with this (KHERZI *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 1998), but some studies claimed that water extracts have an antibacterial activity (BIANCHINI e BEDENDO, 1998). Despite this contradictory results, aqueous propolis extracts (using water as solvent) clearly had a much lower antifungal effect, as showed here.

Several methods and solvents are reported to be effective in extracting propolis antimicrobial constituents; however ethanol is the most widely used (QUIROGA *et al.*, 2006; KARTAL *et al.*, 2003; KUJUMGIEV *et al.*, 1998; MENDONÇA *et al.*, 2002; PINTO, 2000). However, the methodologies employed are quite distinct. This can explain why studies showing propolis effects vary so greatly. Based on the results of the present work, a method using warmed ethanol (at 70 °C) for approximately a half hour can be satisfactorily applied to extract propolis antifungal properties in a way to permit laboratory studies, when compared with commercial extracts, which usually take 15 to 60 days to obtain the extract (COSTA e OLIVEIRA, 2005).

Among ethanol extracts, the 99 % ethanol extract was the more efficient against the tested fungi, probably due to extraction of more antifungal compounds.

Besides the different methods and solvents used to extract propolis constituents, there is the effect of propolis origin that can result in completely distinct pharmacological and antimicrobial properties, since the plant source and collection time already were reported as an important factor (BANKOVA *et al.*, 2000; BANSKOTA *et al.*, 2000; GHISALBERTI, 1979; BANKOVA *et al.*, 1983; MARCUCCI, 1995; SILVA *et al.*, 2005; LIMA, 2006).

Similar to the works of propolis antifungal properties, several works with plants and plant extracts were developed against fungi and had proven their effects (CHALFOUN e CARVALHO, 1987; BAUTISTA-BAÑOS, *et al.* 2003; SOUZA *et al.*, 2007; AMARAL e BARA, 2005). Several substances of propolis have antifungal activity, such as flavonoids, flavones, flavonones, aromatic acids and their esters, cinnamic acid derivatives, heteroaromatic compounds, volatile compounds (etheric oils), kaempferol-7,4'-dimethyl ether, ermanin, pinocembrin, pinobanksin, pinobankin-3-acetate (STANGACIU, 1998) and some of them clearly are originated from the plant source.

Conidia germination of *Aspergillus flavus* and *Bipolaris sorokiniana* were not affected by propolis extracts at the concentrations tested; on the other hand, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria brassicae* were completely inhibited. Among the fungi tested for mycelial growth similar results were obtained. While *L. theobromae* was highly tolerant, *P. capsici* was highly susceptible. This behavior is quite expected since the great majority of antifungal compounds have a distinct effectiveness against different fungal groups and only a few ones have a broad spectrum of action (SIEGEL e SISLER, 1977a; 1977b).

Apparently among the Ascomycetes the response to propolis is highly variable but without any apparent connection to a specific group. Few are the Basidiomycetes that cause post-harvest diseases and although none was included in the present work, propolis extracts were already reported to be effective against this group of fungi (PEREIRA *et al.*, 2001).

Researches using propolis as an alternative preservative agent are very important, because it can clearly reduce fungal development and perhaps increase the shelf-life, even a few days, of the products (i.e. fruits); this is also useful to transport logistic and to consumers that will have a longer time to consume the fruits. In this way, Ozcan (1999) cited that the consumers considered propolis a safe and nontoxic alternative preservative agent.

The research and development costs of botanical fungicides, from discovery to marketing, are much lower compared to those of chemical preservatives. Also, consumers demand for natural compounds leads the scientific community into a constant search for alternative products. So, the encouraging results of using natural products to control fungal growth and contamination in foods and food products indicate that we should be able to

develop natural fungicides that would be as effective as chemicals, and presumably safer for man and the environment (KOC *et al.*, 2007).

5) Concluding remarks

This work indicates the potential use of propolis as an alternative food preservative agent. However, factors such as extract concentrations, extraction solvent, target microorganism, propolis type and origin should be in constant concern. Also resin strong flavor and aroma must be considered, once it affects the food sensory qualities.

Ethanol (ethanol) was the best extractor, followed by propylene glycol extracts, while the aqueous extracts apparently had no antifungal potential.

Due to variations in tolerance of different microorganisms against the propolis extracts, further studies should be carried out, to determine if there is a fungal group that is more susceptible (e.g. Oomycetes) while others are more tolerant and also verify the possibility to use propolis as an antifungal agent to be applied in crop fields to control specific plant diseases or prevent the infection of post-harvest fungi.

6- Acknowledgments

The first author would like to thank FAPEMIG for the scholarship; the Plant Diseases Clinic, in special Dr. Dartanhã José Soares by providing fungal isolates and useful comments; the Food Analysis Laboratory, in special MSc. Flávia by helpful in extracts preparation.

7) References

ALY, A. S.; ELEWA, A. N. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. **Journal of Dairy Research**. 74: 74-78.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. (2005). Avaliação da atividade antifúngica e extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2 (2): 5-8 (suppl).

ASÍS, M. (1989). **Propóleo: el oro púrpura de las abejas**. Centro de Información y Documentación Agropecuário (CIDA). Habana.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N.L. (1983). A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**. 46: 471-474.

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

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. (2000). Two Novel Cytotoxic Benzofuran Derivatives from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**. 63: 1277-1279.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ, L. M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**. 22: 1087-1092.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. (1998). Efeito antibiótico do propolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**. 55 (1): 149-152.

BURDOCK, J. S. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**. 36: 347-363.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. (1987). Efeito de óleo e de extrato de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**. 12(3): 234-235.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. (2005). **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. UFLA, Lavras.

COSTA, P. S. C. (2007). **Produção e processamento de própolis e cera**. CPT, Viçosa.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J. S. (2005). **Manual Prático de Criação de Abelhas**. Viçosa: Aprenda Fácil.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. (1996). **Basic Plant Pathology Methods**. Second Edition. Boca Raton, USA.

GHISALBERTI, E. L. (1979). Propolis: a review. **Bee World**. 60: 59-84.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYAA, S.; KURUCU, S.; TOPÇUET, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**. 86: 69–73.

KHEZRI, M; ROSTAMI, S; RISEH, R. S; ALIZADEH, A. (2006). Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (*Pistacia vera* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**. 8(5): 606-608.

KOC, A. N.; SILICI, S.; MUTLU-SARIGUZE, F.; SAGDIC, O. (2007). Antifungal Activity of Propolis. **Food Technology and Biotechnology**. 45 (1) 57–61.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, YU.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. (1998). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**. 64: 235-240.

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

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

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. (2000). **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. Congreso Internacional de Propoleos. Argentina. Disponível em: <[http:// www.culturaapicola.com.ar](http://www.culturaapicola.com.ar)>. Acesso em: novembro de 2006.

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

MATSHUGIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K., NAMBA, T. (1996). Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**. 2: 203-209.

MENDONÇA, H. L.; ROMEIRO, R. S.; MESSAGE, D.; MACAGNAN, D.; GARCIA, F.A.O.; VIEIRA JUNIOR, J. R. (2002). Possibilidades de uso de própolis para controle de doenças fúngicas e bacterianas do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. 27: S65. (suppl.).

OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (2006). **Patologia pós-colheita**. In: Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Oliveira, S. M. A.; Terao, D.; Dantas, S. A. F.; Tavares, S. C. C. H. (eds.). EMBRAPA, Brasília.

ÖZCAN M. (1999). Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**. 50 (5): 395-398.

PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C.L.; FUJIWARA, F. E., PARK. Y.K. Estudo das própolis que contém Artepillin C. (2003). **Mensagem Doce**. 74. <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: agosto de 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

PAULINO, F. D. G. (2004). **Produtos da colmeia**. In: SOUZA, D. C. (Ed.). Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural. SEBRAE, Brasília.

PEREIRA, C. S.; ARAUJO, A. G.; GUIMARAES, R. J.; PAIVA, L. C. (2001) Uso da própolis como inibidor da germinação de esporos de *Hemileia vastatrix*. **Mensagem Doce**. 64. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: agosto de 2008.

PINTO, M. S. (2000). **Efeito antimicrobiano da própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vaca com mastite**. 92p. (MSc. Thesis. Medicina Veterinária. UFV).

QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, D. A., SOBRERO, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M.A. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **Journal Applied of Microbiology**. 101:103-110.

SAS. **SAS Software Version 9.1**. (2001). SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

SAWAYA, A. C. H. F.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B. S; ARAUJO, C.E.P.; SHIMIZU, M.T. (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida. **Letters Applied of Microbiology**. 35: 203-207.

SIEGEL, M. R.; SISLER, H. D. (1977a). **Antifungal compounds: Discovery, development and uses**. Vol. I. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

SIEGEL, M. R.; SISLER, H. D. (1977b). **Antifungal compounds: Interactions in biological and ecological systems**. Vol. II. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

SILICI, S; KOC, N. A.; SARIGUZEL, F. M; SAGDIC, O. (2005). Mould inhibition in different fruit juices by propolis. **Archives Lebensmittelhyg**. 56(4): 87-90.

SILICI, S; KOC, N. A. (2006). Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Letters Applied of Microbiology**. 43: 318-324.

SILVA, M. S. S.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A. D. (2005). Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**. 28(5): 801-804.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. (2007). Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. 32(6):465-471.

STANGACIU, S. (1998). A guide to the composition and properties of propolis. **Apiacta**. 33: 71-77.

SUZUKI, I. (2000). A própolis de solução aquosa. **Mensagem Doce**. 58. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: dezembro de 2005.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R. M. A.; SALATINO, A. (2003). Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Boletim Indústria Animal**. 60 (1): 83-106.

TOSI, B.; DONINI, A., ROMAGNOLI., BRUNI, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy Research**. 10: 335-336.

TRIPHATI, P., DUBEY, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**. 32: 235–245.

VENTURA, J. A., ZAMBOLIM, L., COSTA, H. (2007). **Patologia pós-colheita: doenças do mamão, banana e abacaxi**. In: II Simpósio Brasileiro de pós-colheita. Sediya, M. A. N., Barros, R. S., Flores, M. E. P., Salomão, L. C. C., Puschmann, R. (eds.). UFV, Viçosa.

CAPÍTULO III

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRAÇÃO

Resumo

As abelhas coletam a resina de brotos, folhas e exsudatos de plantas e é modificado pela mistura de secreções salivares, pólen e cera. Inúmeros fatores contribuem para a diversidade de características e qualidade da própolis, tornando-a um material de composição complexa. Dentre as inúmeras propriedades da própolis, a ação contra microorganismos é uma das mais fortes e essenciais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de extratos aquosos e etanólicos obtidos a partir de três temperaturas (50, 70 e 95°C) de extração e de duas origens (própolis C e V). Além destes fatores testou-se também duas concentrações finais (2 e 4%) dos extratos. Os extratos etanólicos apresentaram maior capacidade de inibição fúngica, enquanto os extratos aquosos foram pouco eficazes. Dentre os efeitos principais testados (origem, temperatura, solvente e concentração), o solvente mostrou grande importância na extração dos compostos antifúngicos, mostrando que os extratos etanólicos de própolis foram os mais efetivos. A concentração de 4% foi a que apresentou melhor desempenho no controle do crescimento micelial. De modo geral, o comportamento foi variável entre as diferentes espécies de fungos. Não foi constatada associação ao grupo filogenético dos fungos a sua sensibilidade a própolis. O fungo mais sensível foi *Mucor* sp., com 100% de inibição do crescimento micelial pelos extratos etanólicos. *Lasiodiplodia theobromae* foi o fungo mais tolerante aos extratos de própolis. Apesar da grande variabilidade dos resultados obtidos pode-se concluir que os extratos etanólicos de própolis possuem grande potencial para o controle alternativo de fungos causadores de doenças pós-colheita, enquanto os extratos aquosos precisam de mais avaliações.

Abstract- ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC PROPOLIS EXTRACT FROM DIFFERENT TEMPERATURE OF EXTRACTION

Propolis is collected by honeybees from buds, leaves and plant exudates and is modified mixing salivary secretions, pollen and waxes. Several factors contribute to the diversity of characteristics and quality of the propolis, turning it a material of complex composition. Among the several properties of propolis, the action against microorganisms is one of the more strong and essential. The present study had as objective evaluates the antifungal activity of aqueous extracts and ethanolic obtained from three extraction temperatures (50, 70 and 95°C) and two origins (propolis C and V). Besides these, two final concentrations (2 and 4%) of the extracts were also tested. Ethanolic extracts presented higher capacity of fungal inhibition, while aqueous extracts were less effective. Among the main effects tested testados (origin, temperature, solvent and concentration), the solvent showed great importance in the extraction of the antifungal compounds, showing that propolis ethanolic extracts were more effective. The 4% concentration presented better performance in the control of mycelial growth. In general, the behavior was variable among the different fungi species. There was no association between the phylogenetic fungi group and its sensibility to propolis. The most susceptible fungus was *Mucor* sp., with 100% of inhibition of the growth mycelial for the ethanolic extracts. *Lasiodiplodia theobromae* was the most tolerant fungi to the propolis extracts. In spite of the great variability of results obtained, it can be concluded that ethanolic extract of propolis possess a great potential as alternative control to fungi that causes of post-harvest disease, while aqueous extracts need more evaluations.

1-INTRODUÇÃO

A demanda mundial por frutas e hortaliças vem crescendo expressivamente nos últimos anos, em virtude, principalmente, da conscientização da população acerca da importância de uma alimentação saudável e do reconhecimento destas na prevenção de várias enfermidades (OLIVEIRA, 2006). Apesar do aumento do consumo de frutas, as perdas pós-colheita ainda são um problema grave principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, aonde os índices chegam a 30% ou mais da produção, ocasionando consideráveis perdas econômicas (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Inúmeros fatores estão associados a essas perdas, tais como: deficiência de recursos humanos qualificados, o uso de tecnologias inadequadas do plantio ao armazenamento, o descuido no manuseio dos produtos, o ataque de pragas e doenças e a deficiência da infra-estrutura para o atendimento das necessidades do setor agrícola (CHITARRA e CHITARRA, 2005; VENTURA *et. al.*, 2007).

As infecções por microrganismos, como fungos, bactérias, e em menor proporção vírus, favorecidos por danos físicos e fisiológicos que predispõe o produto a invasão de patógenos são as mais sérias causas de perdas pós-colheita em produtos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os fungos são os principais causadores de doenças pós-colheita em frutas, como consequência do amplo número de espécies envolvidas e da diversidade e eficiência dos mecanismos de penetração dos mesmos (SILVEIRA *et al.*, 2005). A maioria deles requer injúria na superfície dos frutos para infecção. Determinados grupos de fungos tem especificidade para certos grupos de fruteiras, por exemplo, *Colletotrichum gloeosporioides* e espécies de *Lasiodiplodia* para fruteiras tropicais, *Rhizopus stolonifer*, fruteiras temperadas e tropicais, mas há também a especificidade com relação a espécie do hospedeiro, como por exemplo, *Colletotrichum musae* que só infecta a banana e *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* que só infecta o abacaxi (VENTURA *et. al.*, 2007).

Alguns autores afirmam que as perdas decorrentes do ataque de microrganismos bem como deterioração fisiológica durante o período entre a colheita e o armazenamento possam estar entre 5 e 50% e em alguns casos chegar a ser total (VENTURA *et. al.*, 2007).

Para o controle dessas doenças os métodos físico e biológico são alternativas viáveis e desejáveis em relação ao tratamento químico convencional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nos frutos tratados. Ainda, o emprego dos chamados fungicidas naturais aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle (RIBEIRO e BEDENDO, 1999). Alguns frutos, como o morango e a uva, por exemplo, são consumidos na sua integridade, portanto devem ser utilizados na sua conservação produtos totalmente naturais e biodegradáveis (HENRIQUE e CEREDA, 1999).

Atualmente uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de produtos naturais, buscando explorar suas propriedades fungitóxicas, dentre eles está o uso de extrato de própolis (TRIPATHI e DUBEY, 2004; SAHINLER e KAFTANOGLU, 2005).

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas de exsudados e secreções de plantas, brotos, casca de árvores, misturada à cera e enzima salivar. Várias propriedades são atribuídas à própolis, por conta da sua vasta e complexa composição química. Propriedades que vão desde a atividade antimicrobiana até benefícios biológicos, como: hepatoprotetora, antitumoral e anti-inflamatória, entre outras (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI *et al.* 1995; SAHINLER e KAFTANOGLU, 2005).

A fonte de coleta dessa resina, a época do ano e a região são fatores que contribuem para a diferenciação da sua composição química. No caso de produtos já processados (extratos), o solvente, o tempo de extração e a temperatura de extração são fatores que atuam na obtenção dos compostos ativos da própolis e que geram sua atividade biológica e farmacológica.

A maioria dos extratos comercializados é etanólico, mas alguns pesquisadores sugerem que o extrato aquoso possui o mesmo efeito. Baseado nessa discordância o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de extratos aquoso e etanólico de própolis provenientes de duas amostras distintas e obtidos a partir de três temperaturas (50, 70 e 95° C (somente para o extrato aquoso) de extração e com duas concentrações finais (2 e 4% v/v) sobre alguns fungos causadores de doenças pós-colheita.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostras de própolis utilizadas

Amostras de própolis de 1 Kg foram adquiridas de um apicultor filiado a Associação Viçosa de Apicultores (APIVIÇOSA), localizada na cidade de Viçosa (Zona da Mata) no Estado de Minas Gerais (amostra V) e de um entreposto de Minas Gerais que recebe própolis do sul do Estado, sendo esta uma amostra tipo exportação denominada “ultra green” (amostra C). As duas amostras de própolis são classificadas como verde e são da espécie *Apis mellifera* L (Figura 1).



Figura 1: Aspecto visual das amostras de própolis moída.
(1-amostra de própolis C; 2-amostra de própolis V)

2.2- Preparo dos extratos aquoso e etanólico de própolis

As amostras foram trituradas e homogeneizadas em um moinho (Marconi MA 090). Para produção do extrato aquoso, seguiu-se a metodologia proposta por Matsushige *et al.* (1996), sendo que 2 gramas da própolis triturada e homogeneizada foram adicionados 25 mL de água deionizada e a mistura incubada por 2 horas a 50, 70 ou 95°C em banho-maria (THERMOMIX BM). Após a extração, a mistura foi centrifugada (SIGMA 3K30) a 8800 g por 10 minutos a temperatura de 20°C e os sobrenadantes obtidos foram armazenados em frasco âmbar com tampa de rosca, em refrigerador a 10° C (PARK *et al.*, 1998).

Os extratos etanólicos foram obtidos a partir de 2 gramas de própolis bruta triturada e homogeneizada, em que adicionou-se 25 mL de álcool de cereais 70%, preparado em laboratório e depois submetido ao banho-maria (THERMOMIX BM) com agitação periódica por um período de 30 minutos. Foram utilizadas duas temperaturas de extração (50 e 70°C). Os extratos foram centrifugados (SIGMA 3K30) e armazenados sob as mesmas condições citadas acima (PARK *et al.*, 1998).

Foram produzidos dez extratos (seis aquosos e quatro etanólicos) para cada amostra de própolis e cada extrato produzido recebeu uma codificação (Tabela 1). O aspecto visual das amostras dos extratos etanólico e aquosos da amostras de própolis C e V estão apresentadas nas Figuras 2 e 3.

Tabela 1: Listagem dos códigos de identificação dos extratos produzidos.

Tipo de extrato	Codificação
Própolis C extraído em água a 50°C na concentração de 2%	C5AG2
Própolis C extraído em água a 50°C na concentração de 4%	C5AG4
Própolis C extraído em água a 70°C na concentração de 2%	C7AG2
Própolis C extraído em água a 70°C na concentração de 4%	C7AG4
Própolis C extraído em água a 95°C na concentração de 2%	C9AG2
Própolis C extraído em água a 95°C na concentração de 4%	C9AG4
Própolis C extraído em etanol a 50°C na concentração de 2%	C5AL2
Própolis C extraído em etanol a 50°C na concentração de 4%	C5AL4
Própolis C extraído em etanol a 70°C na concentração de 2%	C7AL2
Própolis C extraído em etanol a 70°C na concentração de 4%	C7AL4
Própolis V extraído em água a 50°C na concentração de 2%	V5AG2
Própolis V extraído em água a 50°C na concentração de 4%	V5AG4
Própolis V extraído em água a 70°C na concentração de 2%	V7AG2
Própolis V extraído em água a 70°C na concentração de 4%	V7AG4
Própolis V extraído em água a 95°C na concentração de 2%	V9AG2
Própolis V extraído em água a 95°C na concentração de 4%	V9AG4
Própolis V extraído em etanol a 50°C na concentração de 2%	V5AL2
Própolis V extraído em etanol a 50°C na concentração de 4%	V5AL4
Própolis V extraído em etanol a 70°C na concentração de 2%	V7AL2
Própolis V extraído em etanol a 70°C na concentração de 2%	V7AL4



Figura 2: Aspecto visual dos extratos etanólicos e aquosos provenientes da amostra de própolis bruta C.



Figura 3: Aspecto visual dos extratos etanólicos e aquosos provenientes da amostra de própolis bruta V.

2.3- Análise da atividade antifúngica dos extratos de própolis

As culturas puras de fungos foram obtidas da coleção micológica da Clínica de Doenças de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Tabela 1).

Foi utilizado o meio BDA (batata-dextrose-agar) (DHINGRA e SINCLAIR, 1996; ÖZCAN, 1999) para avaliação da inibição do crescimento micelial. Após autoclavagem, os meios foram incorporados com os extratos nas concentrações de 2 e 4% (v/v). O meio (15mL/placa) contendo os extratos em diferentes concentrações foi vertido em placas de Petri. Posteriormente foi transferido um disco de cultura de 0,5 mm para o centro da placa. Os discos foram obtidos das margens de culturas com 7 dias de idade, crescidos em BDA, para cada um dos fungos testados.

Tabela 1: Lista de fungos utilizados e sua origem.

Fungos	Origem
<i>Alternaria brassicae</i>	Couve
<i>Botrytis cinerea</i>	Morango
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mamão
<i>Colletotrichum musae</i>	Banana
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manga
<i>Mucor</i> sp.	Caju
<i>Phytophthora capsici</i>	Pimentão
<i>Rhizoctonia solani</i>	Batata
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Jaca
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Gengibre

As placas foram mantidas em incubadora a 25± 2°C com regime de 12 horas de luz branca. O crescimento micelial foi avaliado diariamente até que as testemunhas atingissem a borda da placa. Foram realizadas duas medidas perpendiculares do diâmetro de cada colônia com o auxílio de uma régua e o percentual da inibição micelial foi calculado de acordo com a fórmula abaixo.

$$I = ((C - T)/C) \times 100, \text{ em que:}$$

I = porcentagem de inibição

C = diâmetro da colônia da testemunha (mm)

T = diâmetro da colônia em cada tratamento (mm)

2.4- Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (origem: própolis C e própolis V) x solvente (álcool e água) x temperatura (50°C e 70°C) com quatro repetições e como controle foi utilizado: álcool 2% e meio de cultura sem adição de extrato). O programa SAS (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc. North Carolina, USA), versão 9.1, licenciado para Universidade Federal de Viçosa foi utilizado para a análise estatística.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos constituídos por extrato aquoso a 95°C (V9AG2, V9AG4, C9AG2 e C9AG4) foram descartados, pois em todos os ensaios (10 fungos)

houve contaminação com uma bactéria (Figura 4) que interferiu no crescimento micelial desses fungos e no andamento da avaliação.

Com base nas características das colônias (coloração bege a levemente marrom, com margens irregulares e elevadas) (Figura 4) e na técnica de Ryce (FERREIRA e SALGADO, 1995), determinou-se que a bactéria em questão era Gram-positiva, pois não houve presença de viscosidade na suspensão avaliada e presumiu-se que a mesma pertença ao gênero *Bacillus*.



Figura 4: Placa com ensaio (C9AG4) de *P. capsici* com crescimento de bactéria contaminante.

O gênero *Bacillus* tem como uma de suas características fisiológicas a formação de endósporo, o que aumenta a resistência a fatores adversos (CHUN e VIDAVER, 2001). Como propriedades o endósporo apresenta, resistência ao dessecamento, à radiação ultravioleta e, principalmente resistência ao calor. Na maioria das espécies pode, em suspensão aquosa, resistir a temperaturas de 70° ou 80°C, durante dez minutos ou mais, mas alguns sobrevivem mesmo após duas horas em água fervente (FERREIRA e SALGADO, 1995).

Embora na literatura existam relatos de que a própolis tem ação antibiótica contra bactérias do gênero *Bacillus* (GHISALBERTI, 1979; BONVEHÍ *et al.*, 1994; MENEZES *et al.*, 1997; KOSALEC *et al.*, 2003), aventa-se a hipótese da presença dessa bactéria nos ensaios ser em razão da temperatura de 95°C ter inativado os compostos que possuem atividade antibacteriana. As células bacterianas ativas foram destruídas, porém a sua estrutura de resistência (endósporo), provavelmente permaneceu viável e, ao

extrato ser adicionado ao meio de cultura estes podem ter sido ativados, promovendo assim o desenvolvimento das colônias bacterianas.

Os tratamentos contendo os extratos alcoólicos a 4% foram removidos da análise estatística, pois para quase todos os fungos avaliados não houve crescimento, ou seja, os fungos foram completamente inibidos por essa concentração, exceto para os fungos *A. brassicae* e *L. theobromae* (Tabela 2). Embora para *A. brassicae* e *L. theobromae*, os resultados dos tratamentos a 4% pudessem ter sido mantidos na análise estatística, optou-se por excluir os mesmos também para estes dois fungos, pois nenhuma conclusão, além daquela de que o extratos a 4% tem maior efeito inibitório poderia ser extraído desta análise, ou seja, a concentração final do extrato de própolis, no substrato onde o fungo se desenvolve tem efeito sobre o seu desenvolvimento. Os extratos etanólicos na concentração de 4% apresentaram a maior capacidade de inibição para todos os fungos, com percentuais acima de 66,94% (Tabela 3).

Nos ensaios com os fungos *C. musae*, *C. gloeosporioides*, *Mucor* sp., *B. cinerea* e *S. rolfsii*, alguns tratamentos com extrato etanólico a 4% inibiram 100% do crescimento micelial (Tabela 3).

Tabela 2: Dados de crescimento micelial (mm) para os tratamentos de extrato etanólico a 4%, para todos os fungos analisados no presente estudo.

Extratos	CM	SR	RS	RST	MUC	BC	PC	CG	AB	LT
C5AL4 (r1)	0	0	0	0	0	0	0	-	4,2	2,0
C5AL4 (r2)	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4,7
C5AL4 (r3)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3,7
C5AL4 (r4)	0	0	0	0	0	0	0	6	5,7	2,5
C7AL4(r1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,2
C7AL4(r2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,7
C7AL4(r3)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5
C7AL4(r4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,7
V5AL4 (r1)	0	4,5	0	0	0	12,2	0	3,7	6,7	3,0
V5AL4 (r2)	0	0	0	0	0	6,2	0	0	6,7	2,7
V5AL4 (r3)	0	0	0	0	0	5	0	0	6,7	3,5
V5AL4 (r4)	0	0	0	0	0	-	0	0	0	4
V7AL4 (r1)	0	4,5	0	0	0	0	0	0	3	4,7
V7AL4 (r2)	0	1	0	0	0	0	0	5	1,2	1,5
V7AL4 (r3)	0	2	0	0	0	0	0	0	2,5	4,7
V7AL4 (r4)	0	1	0	0	0	0	0	0	2,2	4,7

(**Extratos:** C5AL: própolis C extraído em álcool a 50°C; C7AL: própolis C extraído em álcool a 70°C; V5AL: própolis V extraído em álcool a 50°C; V7AL: própolis V extraído em álcool a 70°C. **Obs.:** A numeração 4 representa a concentração 4% de cada extrato adicionado ao meio de cultura. **Fungos:** CM: *Colletotrichum musae*; SR: *Sclerotium rolfsii*; RS: *Rhizoctonia solani*; RST: *Rhizopus stolonifer*; MUC: *Mucor* sp.; BC: *Botrytis cinerea*; PC: *Phytophthora capsici*; CG: *Colletotrichum gloeosporioides*; AB: *Alternaria brassicae*; LT: *Lasiodiplodia theobromae*)

Tabela 3: Porcetagem de inibição do crescimento micelial de fungos submetidos a diferentes extratos de própolis.

Extratos*	CM**	SR	RS	RST	MUC	BC	PC	CG	AB	LT
ALC2	11,31	28,81	7,44	10,44	40,81	23,35	23,63	15,34	50,19	0,00
ALC4	38,63	77,44	53,06	54,31	71,00	73,02	49,44	49,74	66,75	13,94
C5AG2	10,38	15,00	0,00	0,00	14,56	-5,54	-2,25	-3,09	15,63	0,00
C5AG4	33,25	30,92	29,44	4,25	14,56	5,94	10,81	62,63	30,38	3,44
C5AL2	77,38	86,44	81,69	69,44	100,00	56,20	81,88	55,61	48,00	58,50
C5AL4	100,00	100,00	98,75	91,00	100,00	91,16	97,75	94,24	84,38	72,88
C7AG2	14,44	18,00	3,63	0,00	20,88	-3,50	-1,44	0,13	15,75	0,00
C7AG4	23,50	29,25	37,69	0,00	34,25	4,75	11,25	-3,09	21,50	12,44
C7AL2	73,06	85,63	78,38	61,44	100,00	55,15	81,25	58,42	81,88	61,44
C7AL4	96,56	100,00	98,94	87,81	100,00	91,56	97,75	100,00	98,75	69,75
V5AG2	12,38	0,00	8,75	0,00	24,44	-5,54	-2,25	0,13	9,13	0,00
V5AG4	0,00	3,13	15,69	0,00	29,44	-1,58	-2,25	35,12	20,56	0,00
V5AL2	82,63	66,94	76,06	56,31	100,00	50,07	80,19	60,05	78,00	61,08
V5AL4	100,00	91,75	95,19	98,75	100,00	79,09	93,06	96,65	84,38	74,13
V7AG2	4,69	0,00	0,00	0,00	25,88	-5,54	-1,31	-3,09	5,42	14,88
V7AG4	85,94	24,25	9,56	0,94	41,81	66,56	-2,25	0,86	14,83	0,00
V7AL2	80,38	86,75	78,19	59,75	100,00	61,81	69,69	55,41	75,00	59,67
V7AL4	97,50	84,13	95,50	79,69	100,00	100,00	93,44	96,13	92,58	66,94

(***Extratos:** ALC2, ALC4: controle álcool; C5AG: própolis C extraído em água a 50°C; C7AG: própolis C extraído em água a 70°C; C5AL: própolis C extraído em álcool a 50°C; C7AL: própolis C extraído em álcool a 70°C; V5AG: própolis V extraído em água a 50°C; V7AG: própolis C extraído em água a 70°C; V5AL: própolis V extraído em álcool a 50°C; V7AL: própolis V extraído em álcool a 70°C. **Obs.:** As numerações 2 e 4 representam as concentrações de 2 e 4% de cada extrato adicionado ao meio de cultura; ****Fungos:** CM: *Colletotrichum musae*; SR: *Sclerotium rolfsii*; RS: *Rhizoctonia solani*; RST: *Rhizopus stolonifer*; MUC: *Mucor* sp.; BC: *Botrytis cinerea*; PC: *Phytophthora capsici*; CG: *Colletotrichum gloeosporioides*; AB: *Alternaria brassicae*; LT: *Lasiodiplodia theobromae*).

Dentre os efeitos principais avaliados (origem, solvente e temperatura), para os dez fungos testados, ficou claramente demonstrado que a maior parte da variação contida no modelo ($> 90\%$) foi captada pela fonte de variação solvente. Ou seja, o solvente foi dentre as fontes de variação analisadas, a que mais interferiu sobre a variável dependente, nesse caso o crescimento micelial. Para todos os fungos testados no presente estudo, o solvente foi a única variável independente que foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os casos. Os demais efeitos principais (origem e temperatura) e as interações entre estes foram variáveis de um fungo para outro.

Todos os extratos etanólicos, quando comparados com os extratos aquosos foram os mais efetivos na inibição do crescimento micelial dos dez fungos estudados.

Os extratos aquosos tiveram baixa atuação contra os fungos estudados, de modo geral inibindo menos de 35% do crescimento micelial para todos os fungos testados, exceto para *C. gloeosporioides* em que o tratamento de extrato aquoso (C5AG4) apresentou 62,63% de inibição e para os fungos *B. cinerea* e *C. musae* o tratamento de extrato aquoso (V7AG4) apresentou 66,56% e 85,94% de inibição, respectivamente (Tabela 3).

Lasiodiplodia theobromae, *C. gloeosporioides*, *R. solani* e *Mucor* sp. apresentaram comportamento semelhante, e na análise de variância apenas o fator solvente foi significativo. Os demais efeitos principais e as interações entre as três variáveis independentes não foram significativas ($p \geq 0,05$), ou seja, o solvente foi a única variável dos extratos testados que interferiu diretamente no crescimento micelial desses fungos.

Para os demais fungos o comportamento foi variável, a interação tripla (ORIG x SOLV x TEMP) foi significativa ($p \leq 0,05$), para os fungos *B. cinerea*, *A. brassicae*, *R. stolonifer* e *C. musae* e não significativa para *S. rolfsii* e *P. capsici*, bem como para aqueles mencionados anteriormente (*L. theobromae*, *C. gloeosporioides*, *R. solani* e *Mucor* sp.).

O efeito principal origem foi significativo apenas para os fungos *S. rolfsii*, *P. capsici* e *R. stolonifer*. Já o efeito principal temperatura foi significativo apenas para *S. rolfsii*. Como mencionado as interações entre os fatores principais foi variável de fungo para fungo.

A interação dupla origem x solvente foi significativa para *A. brassicae*, *R. stolonifer*, *C. musae*, *B. cinerea* e *S. rolfsii*. A interação origem x temperatura foi

significativa apenas para *A. brassicae*, *P. capsici*, *R. stolonifer* e *S. rolfsii*. Já a interação dupla temperatura x solvente foi significativa para *A. brassicae*, *C. musae* e *B. cinerea*.

De acordo com o percentual de inibição (Tabela 3) o fungo mais sensível foi *Mucor* sp. e o fungo mais tolerante foi *L. theobromae*.

Devido ao fato do solvente ter sido responsável por mais de 90% de toda a variação das análises e uma vez que as possíveis interações variaram de fungo para fungo, as interações significativas não foram desdobradas, pois as conclusões obtidas desses desdobramentos não trariam informações mais relevantes.

Castagnino *et al.* (2008) verificaram o efeito do extrato alcoólico de própolis em três concentrações (0,5; 1,0 e 5,0%) sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos (*Fusarium* sp., *Pestalotia* sp. e *Rhizoctonia* sp.). Os resultados obtidos mostraram que *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. tiveram inibição do crescimento, de forma significativa em todas as concentrações. Já o fungo *Rhizoctonia* sp., apresentou inibição significativa, apenas na concentração de 5%.

Aly e Elewa (2007) utilizaram extrato aquoso de própolis (concentrações de 250, 500 e 1000 ppm) na superfície de queijo egípcio tipo Ras para inibição de *Aspergillus versicolor*, produtor de esterigmatocistina, durante a maturação do queijo. O crescimento fúngico e a produção de toxina foram completamente inibidos pelo extrato de própolis na concentração de 1000 ppm, enquanto as menores concentrações exibiram um efeito fungistático durante os 90 dias de maturação do queijo.

Siqueira *et al.* (2009) investigaram a atividade antifúngica de extratos aquosos e alcoólicos de própolis brasileira verde e vermelha contra *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*. O extrato alcoólico de própolis vermelha demonstrou ter capacidade antifúngica maior do que o extrato alcoólico de própolis verde. O fungo *T. rubrum* foi o mais sensível aos extratos alcoólico verde e vermelho, e *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* foram mais suscetíveis ao extrato alcoólico de própolis verde. Não houve atividade dos extratos aquosos sobre os fungos testados.

Kherzi *et al.* (2006) determinaram o efeito da própolis obtida a partir de quatro solventes (hexano, diclorometano, metanol e água quente) no crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e na produção de aflatoxina

em pistache. Os extratos com diclorometano e hexano foram os que tiveram maior atividade antifúngica. O efeito do extrato de diclorometano foi testado no controle da aflatoxina e houve uma baixa concentração dessa toxina (1,28 ppb no tratamento em comparação com 7,3 ppb no controle).

Zeppa e Dolci (2002) citados por LAPPE (2004) utilizaram a própolis para o controle superficial de fungos filamentosos em queijos de curta e média maturação, observando que a casca tratada com solução hidroalcoólica de própolis em altas concentrações (>1,5g/L), o crescimento fúngico foi superficial ou nenhum.

Lappe (2004) avaliou o efeito da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0%) sobre a superfície de salames tipo italiano, investigando sua contribuição no controle da formação de fungos e sua possível interferência no aspecto sensorial. O uso da solução de própolis nas diferentes concentrações foi eficaz no controle fúngico e não interferiu nas características sensoriais.

Diversos trabalhos mostraram a atividade antifúngica da própolis (PEPELJNJAK *et al.*, 1982; TOSI *et al.*, 1996; SILICI *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2006; KHERZI *et al.*, 2006; ALY e ELEWA, 2007; DA SILVA *et al.*, 2008), entretanto o mecanismo de ação não é claramente conhecido. Mello *et al.* (2006) sugerem que o modo de ação antifúngico da própolis seja atribuído a alteração na parede celular, onde esta mudança leva ao aumento do volume e conseqüentemente a ruptura da membrana.

De acordo com Burdock (1998) os flavonóides, ácidos fenólicos e flavonas tais como a galangina e a quercetina são os responsáveis por esse efeito inibitório. A ação da quercetina tem sido atribuída à inibição da síntese de proteína, DNA e da função da membrana citoplasmática do fungo e subseqüentemente na produção de toxina.

Nesse ensaio não houve uma diferenciação para os grupos fúngicos, ou seja, fungos de um mesmo grupo filogenético não apresentaram o mesmo comportamento quando submetidos aos diferentes extratos (Figura 5 e 6).

Os relatos referentes à atividade de própolis sobre diferentes categorias de organismos são variáveis, essa diferença pode ser atribuída à diferença intrínseca de cada microrganismo testado e a diferença da quantidade de flavonóides encontrado na amostra (BURDOCK, 1998).

Metzner *et al.* (1977) citados por BURDOCK (1998) na avaliação da própolis sobre *Candida*, *Saccharomyces* e *Cryptococcus* sugere que há um efeito fungicida relacionado à presença do flavonóide pinocembrina.

Os fungos apresentam diferentes comportamentos quanto a sensibilidade e tolerância frente a própolis, podendo haver influência do grupo ao qual eles pertencem (Ascomiceto, Zigomiceto, Basidiomiceto ou Oomiceto) ou até mesmo a fase do ciclo de vida (germinação ou crescimento) no qual encontram-se (DA SILVA *et al.*, 2007, 2008).

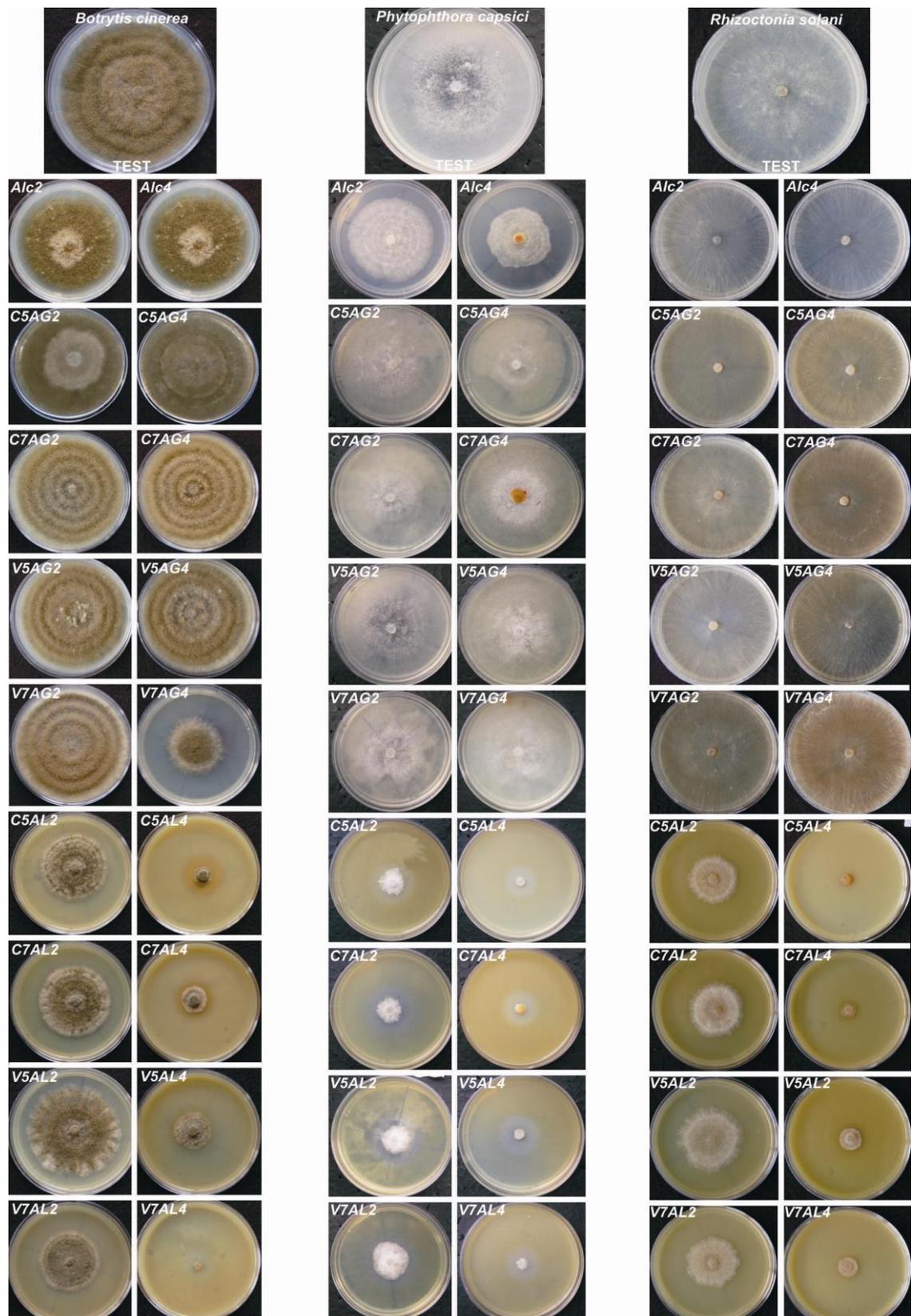


Figura 5: Crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* e *Rhizoctonia solani* submetidos a diferentes extratos de própolis. (**TEST:** testemunha; **Extratos:** ALC2, ALC4: controle álcool; C5AG: própolis C extraído em água a 50°C; C7AG: própolis C extraído em água a 70°C; C5AL: própolis C extraído em álcool a 50°C; C7AL: própolis C extraído em álcool a 70°C; V5AG: própolis V extraído em água a 50°C; V7AG: própolis C extraído em água a 70°C; V5AL: própolis V extraído em álcool a 50°C; V7AL: própolis V extraído em álcool a 70°C. **Obs:** As numerações 2 e 4 representam as concentrações de 2 e 4% de cada extrato adicionado ao meio de cultura).

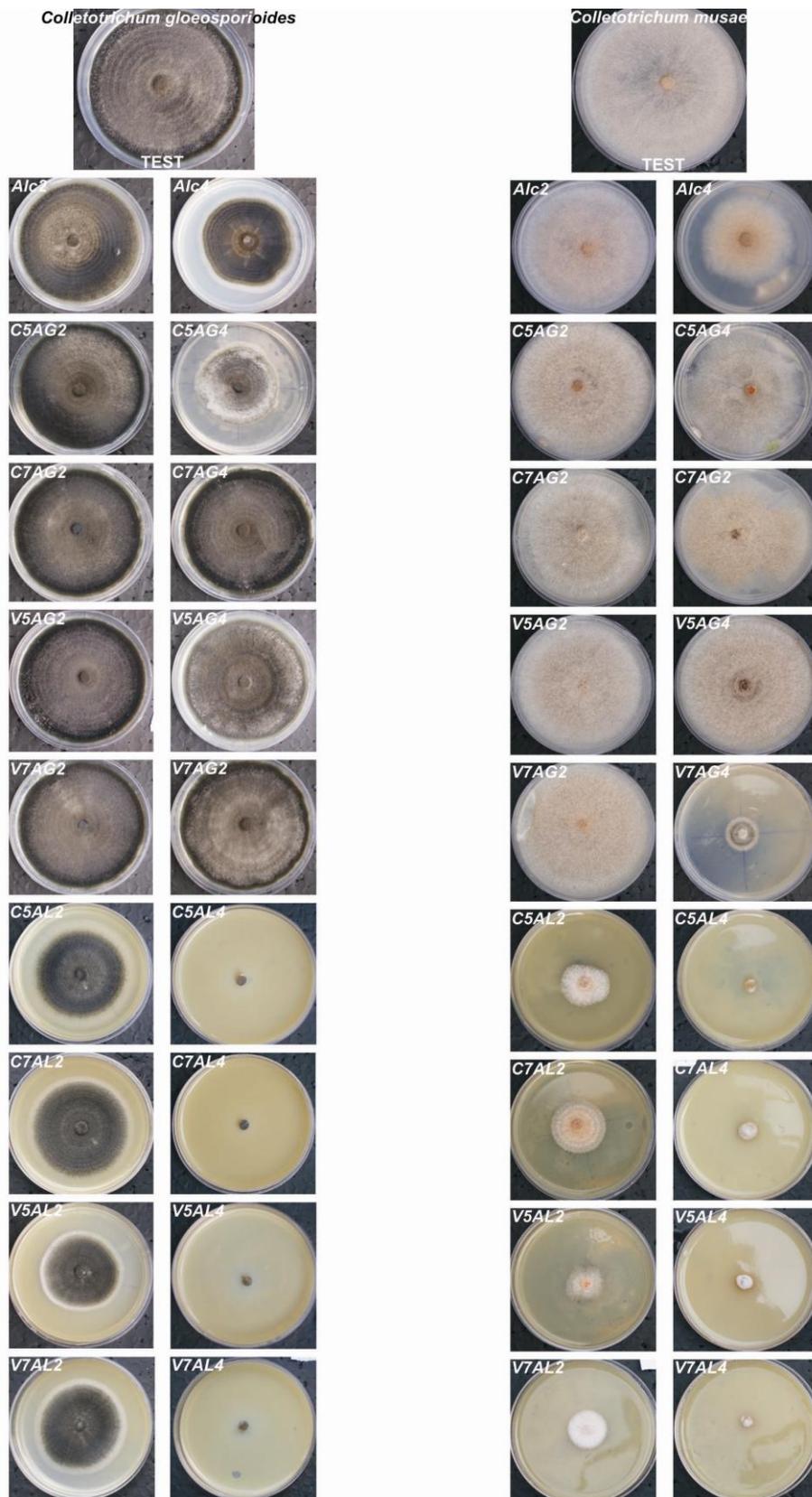


Figura 6: Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* submetidos a diferentes extratos de própolis. (**TEST:** testemunha; **Extratos:** ALC2, ALC4: controle álcool; C5AG: própolis C extraído em água a 50°C; C7AG: própolis C extraído em água a 70°C; C5AL: própolis C extraído em álcool a 50°C; C7AL: própolis C extraído em álcool a 70°C; V5AG: própolis V extraído em água a 50°C; V7AG: própolis C extraído em água a 70°C; V5AL: própolis V extraído em álcool a 50°C; V7AL: própolis V extraído em álcool a 70°C. **Obs.:** As numerações 2 e 4 representam as concentrações de 2 e 4% de cada extrato adicionado ao meio de cultura).

Quiroga *et al.* (2007) determinaram a atividade antifúngica e a atividade citotóxica de extratos etanólicos sobre *Aspergillus niger* (isolado de citrus), *Fusarium* sp. (isolado de soja), *Fusarium* sp. (isolado de manga), *Macrophomina* sp. (isolado de soja), *Penicillium notatum*, *Phomopsis* sp. (isolado de soja) e *Thichoderma* spp. e comparou com a atividade isolada dos flavonóides pinocembrina e da galangina, além das drogas sintéticas ketoconazole e clotrimazole. Os resultados mostraram que todos os produtos avaliados apresentaram atividade antifúngica, mas as drogas sintéticas possuem uma atividade maior que os flavonóides testados e o extrato etanólico de própolis, nessa ordem, por outro lado a citotoxicidade da drogas sintéticas é muito maior. Nesse caso a própolis pode ser considerada como uma alternativa para o controle desses fungos, considerando o potencial do seu efeito e a baixa citotoxicidade.

4- CONCLUSÃO

A própolis tem um grande potencial antifúngico, mas com resultados diferenciados para cada espécie, necessitando estudos mais detalhados dentro de cada espécie e/ou gênero. Entretanto, é um produto que pode ser considerado como alternativo para o controle de fungos causadores de doenças pós-colheita.

O solvente e a metodologia de extração são aspectos de grande importância, pois interferem diretamente na propriedade biológica do produto final.

Com base nesse trabalho o extrato de própolis que apresentou melhor resposta sobre a atividade antifúngica para todos os fungos estudados foi o extrato alcoólico preparado a 70°C na concentração de 4%.

5- AGRADECIMENTOS

Ao estudante de mestrado Leandro Dias Araújo (DTA), pela colaboração no preparo e coleta dos resultados desse ensaio. A Clínica de Doença de Plantas da Universidade Federal de Viçosa pela infra-estrutura e concessão dos isolados fúngicos. Ao Dr. Dartanhã José Soares pelas sugestões, e ao Dr. João Luis da Silva pela ajuda nas análises estatísticas.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, S. A.; ELEWA, N. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. **Journal of Dairy Research**. 74: 74-78.

BONVEHI, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemist's Society**. 71 (5): 529-532.

BURDOCK, J. S. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**. 36: 347-363.

CASTAGNINO, G. L. B.; FURTADO, E. L.; FUNARI, S. R. C. (2008). **Efeito da própolis sobre diferentes fungos fitopatogênicos**. In: 17º Congresso Brasileiro de Apicultura. Belo Horizonte.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. (2005). **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. UFLA, Lavras.

CHUN, W.; VIDAVER, A. K. (2001). **Gram-positive bacteria**. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. (eds.). 3ª ed.

DA SILVA, A. F.; SILVA JR., G. J.; SILVA, M.B.L.; SOARES, D. J.; CHAVES, J. B. P. (2007). **Atividade antifúngica de diferentes extratos comerciais de própolis**. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia. Recife.

DA SILVA, A. F.; CHAVES, J. B. P.; BATISTA, T. A. S.; SOARES, D. J.; PEREIRA, O. L.; MESSAGE, D. (2008). **Extractos de propóleos: una alternativa para el control de hongos postcosecha**. In: IV Congreso Latino Americano de Micología. Mar del Plata.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. (1996). **Basic Plant Pathology Methods**. Second Edition. Boca Raton, USA.

- GHISALBERTI, E. L. (1979). Propolis: a review. **Bee World**. 60: 59-84.
- FERREIRA, L. P.; SALGADO, C. L. (1995). **Bactérias**. In: Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. (eds.). Ceres, São Paulo.
- HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M. P. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragassia x anannassa* Duch) cv IAC Campinas. (1999). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 19 (2): 231-233.
- KHEZRI, M; ROSTAMI, S; RISEH, R. S; ALIZADEH, A. (2006). Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (*Pistacia vera* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**. 8(5): 606-608.
- KOSALEC, I.; BAKMAZ, M., PEPELJNJAK, S. (2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. **Acta Pharmacology**. 53: 275-285.
- LAPPE, R. (2004). **Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano**. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. Rio Grande do Sul. 77 p.
- MARCUCCI, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. 26: 83-99.
- MATSHUGIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K., NAMBA, T. (1996). Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**. 2: 203-209.
- MELLO, A. M.; GOMES, R. T.; LARA, S. R.; GOMES SILVA, L.; ALVES, J. B.; CORTÉS, M. E.; ABREU, S. L., SANTOS, V. R. (2006). The effect of brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. **Pharmacologyonline**. 3: 352-358

MENEZES, H.; BACCI JR, M.; OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. (1997). Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**. 28:71-76.

OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (2006). **Patologia pós-colheita**. In: Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Oliveira, S. M. A.; Terao, D.; Dantas, S. A. F.; Tavares, S. C. C. H. (eds.). EMBRAPA, Brasília.

ÖZCAN M. (1999). Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**. 50 (5): 395-398.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, D. (1982). Inhibition of growth and biosynthesis of ocratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. **Pharmazie**. 37: 439-440.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **Journal of Applied Microbiology**. 101: 103-110.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. (1999). Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**. 56 (4):1267-1271.supl.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. (2005). Natural products propolis: chemical composition. **Natural products Research**. 19 (2): 183-188.

SAS. **SAS** Software Version 9.0. (2001). SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

SILICI, S; KOC, N. A; SARIGUZEL, F. M; SAGDIC, O. Mould inhibition in different fruit juices by propolis. 2005. **Archiv fur Lebensmittelhygiene**. 56(4): 87-90.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, I. L. S. S.; OLIVEIRA, S. M. A. (2005). Doenças fungicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. **Caatinga**. 18 (4): 283-299.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B.S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. (2009). *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. 48 (1): 90 - 96

TOSI, B.; DONINI, A.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy research**. 10:335- 336.

TRIPHATI, P., DUBEY, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**. 32: 235–245.

VENTURA, J. A., ZAMBOLIM, L., COSTA, H. (2007). **Patologia pós-colheita: doenças do mamão, banana e abacaxi**. In: II Simpósio Brasileiro de pós-colheita. Sediama, M. A. N., Barros, R. S., Flores, M. E. P., Salomão, L. C. C., Puschmann, R. (eds.). UFV, Viçosa.

**ANEXO 1 - TABELAS DOS RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO
CRESCIMENTO FÚNGICO SUBMETIDO A DIFERENTES EXTRATOS DE
PRÓPOLIS**

Lasiodiplodia theobromae

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	15,40125	0,0561695 ^{ns}
SOLV ^a	1	954,845	5,72471E-16 *
TEMP	1	5,95125	0,226451709 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	0,91125	0,632445704 ^{ns}
ORIG*TEMP	1	16,245	0,05021068 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	7,80125	0,167693003 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	2,88	0,397118516 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	0,5	0,722892457 ^{ns}
Fatorial vs. Testemunha	1	267,289	3,08104E-09 *
ERRO	30	3,9025	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 95,1%

Alternaria brassicae

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	0,065676	0,92072303 ^{ns}
SOLV ^a	1	2315,75676	1,6641E-15*
TEMP	1	22,342703	0,076326616 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	55,233243	0,007740568*
ORIG*TEMP	1	53,553243	0,008587783*
SOLV*TEMP	1	37,131892	0,025290598*
ORIG*SOLV*TEMP	1	28,962973	0,04565808*
TESTEMUNHAS	1	770,468571	1,47207E-10*
Fatorial vs. Testemunha	1	189,007562	1,74787E-05*
ERRO	23	6,48673913	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 92,1%

C. gloeosporioides

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	2,2188	0,560587024 ^{ns}
SOLV ^a	1	3203,9472	2,07946E-19*
TEMP	1	4,4652	0,41048114 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	1,1532	0,67435580 ^{ns}
ORIG*TEMP	1	10,1568	0,21800797 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	2,43	0,54261652 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	15,5952	0,12963367 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	76,38107143	0,001768264*
Fatorial vs. Testemunha	1	107,0925625	0,000328218*
ERRO	28	6,395803571	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 95,1%

Phythophtora capsici

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	48,02	0,000112904*
SOLV ^a	1	6641,28125	5,2038E-31*
TEMP	1	1,28	0,47422417 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	0,125	0,82236228 ^{ns}
ORIG*TEMP	1	11,76125	0,035892177*
SOLV*TEMP	1	9,68	0,05542076 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	7,80125	0,08368232 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	141,96125	1,63678E-08*
Fatorial vs. Testemunha	1	352,24225	5,32322E-13*
ERRO	30	2,436916667	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 98,8%

Mucor sp.

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	0,007813	0,968847 ^{ns}
SOLV ^a	1	3989,477812	4E-23*
TEMP	1	2,477812	0,488505 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	0,007812	0,968849 ^{ns}
ORIG*TEMP	1	0,112812	0,882046 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	2,475313	0,488723 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	0,112813	0,882046 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	331,53125	4,69E-09*
Fatorial vs. Testemunha	1	1998,689063	7,56E-19*
ERRO	30	5,037666667	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 99,8%

Rhizopus stolonifer

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	7,80125	0,000281138*
SOLV ^a	1	2083,35125	2,86475E-34*
TEMP	1	1,05125	0,141725406 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	2,10125	0,041168546*
ORIG*TEMP	1	5,95125	0,001159687*
SOLV*TEMP	1	0,00125	0,958842494 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	2,10125	0,041168546*
TESTEMUNHAS	1	27,01125	1,56391E-08*
Fatorial vs. Testemunha	1	246,51225	1,14244E-20*
ERRO	30	0,461583333	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 99,1%

Rhizoctonia solani

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	17,2578125	0,062270569 ^{ns}
SOLV ^a	1	925,5753125	7,70671E-15*
TEMP	1	3,3153125	0,40272414 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	1,8528125	0,530546304 ^{ns}
ORIG*TEMP	1	1,0153125	0,641955067 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	0,1953125	0,838170642 ^{ns}
ORIG*SOLV*TEMP	1	5,6953125	0,274766033 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	2,76125	0,444628222 ^{ns}
Fatorial vs. Testemunha	1	246,51225	0,000112354*
ERRO	30	4,601833333	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 96,9%

C. musae

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	0,750312	0,582157 ^{ns}
SOLV ^a	1	4677,862812	8,68E-29*
TEMP	1	8,100312	0,077553 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	14,445312	0,020775*
ORIG*TEMP	1	2,257813	0,342286 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	18,757813	0,009266*
ORIG*SOLV*TEMP	1	18,150313	0,010347*
TESTEMUNHAS	1	34,86125	0,000675*
Fatorial vs. Testemunha	1	1114,608063	9,57E-20*
ERRO	30	2,424833333	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 98,7%

Botrytis cinerea

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	3,38	0,12525817 ^{ns}
SOLV ^a	1	3156,15125	5,57327E-30*
TEMP	1	1,36125	0,32490031 ^{ns}
ORIG*SOLV	1	12,25125	0,005355166*
ORIG*TEMP	1	0,21125	0,696165099 ^{ns}
SOLV*TEMP	1	10,125	0,010506217*
ORIG*SOLV*TEMP	1	25,92	0,000137942*
TESTEMUNHAS	1	143,65125	2,38709E-11*
Fatorial vs. Testemunha	1	343,396	3,71102E-16*
ERRO	30	1,358916667	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 98,3%

Sclerotium rolfsii

FV	GL	QM	Pr > F
ORIG	1	108,78125	1,09903E-06*
SOLV ^a	1	2251,205	6,42747E-23*
TEMP	1	34,445	0,001804706*
ORIG*SOLV	1	44,65125	0,00050409*
ORIG*TEMP	1	12,75125	0,045833602*
SOLV*TEMP	1	0,845	0,595689692 ^{ns}

ORIG*SOLV*TEMP	1	1,20125	0,527374997 ^{ns}
TESTEMUNHAS	1	39,605	0,000932975*
Fatorial vs. Testemunha	1	425,104	5,24836E-13*
ERRO	30	2,937666667	

*: significativo $\alpha = 5\%$; ns: não significativo

^a % da variação total explicada pelo efeito principal solvente: 91,7%

CAPÍTULO IV

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS

RESUMO

A própolis é uma resina natural coletada e modificada pelas abelhas e usada pela humanidade desde a antiguidade. Dentre os produtos apícolas, a própolis destaca-se por suas inúmeras propriedades, dentre as quais: antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antioxidante, antitumoral, anestésica e anticariogênica. Na indústria alimentícia, a própolis tem sido usada na forma de alimentos funcionais e na conservação de alimentos. Inúmeras pesquisas relatam à complexidade da própolis e as vantagens advindas de seu uso como agente antimicrobiano, no entanto existem grandes divergências entre os resultados que têm sido obtidos. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana de extratos etanólico a 50 e 70 °C e aquoso a 50, 70 e 95 °C, de própolis oriundos de duas origens (C e V) sobre três isolados bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesius*). Verificou-se que os dez extratos de própolis estudados tiveram pouco efeito sobre a inibição do crescimento de *E. coli* (halos de 0 a 1,2 mm). Para *S. aureus* os extratos etanólicos preparados a 70°C, de ambas as origens apresentaram um halo de inibição considerável (2,3 mm). Em relação à *S. choleraesius* os extratos etanólico a 70°C (propolis C), aquoso a 50°C (propolis V) e etanólico a 70°C (propolis V) apresentaram uma boa atividade antibacteriana com halos que variaram de 2,0 a 3,1 mm.

Palavras-chaves: própolis, atividade antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesius*.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC PROPOLIS EXTRACTS

Propolis is a natural resin collected and modified by bees and used by the humanity since ancient times. Among the bee products, the propolis reaches a high position due to its several properties: antimicrobial, antinflammatory, healing, antioxidant, antitumoral, anesthetic, anticariogenic. In the food industry, it has application in the form of functional foods and also as a food preservative. Several researches report the complexity of propolis composition as well as its antimicrobial activity. However results obtained are quite divergent. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of ethanolic (50 and 70 °C) and aqueous (50, 70 and 95 °C) propolis extracts obtained from two distinct origins (C and V) against three bacterial isolated (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesius*). It was verified that the ten extracts obtained in this study had little effect on the growth inhibition of *E. coli* (halos of 0 to 1,2 mm). The ethanolic extracts prepared at 70°C from both origins presented a considerable inhibition (2,3 mm) against *S. aureus*. As for *S. choleraesius* the ethanolic extracts at 70°C (propolis C), aqueous at 50°C (propolis V), ethanolic at 70°C (propolis V) presented a good antibacterial activity with halos that varied of 2,0 to 3,1 mm.

Keywords: propolis, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesius*.

1- INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, que eventualmente estejam contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos permitem que estes organismos ou seus metabólitos invadam os fluídos ou os tecidos do hospedeiro podendo causar algumas doenças graves em quem os consomem. As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Dentre estes, as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem de longe o grupo microbiano mais importante e mais associado às doenças veiculadas pelos alimentos. A contaminação dos alimentos por bactérias patogênicas ao homem ocorre principalmente como resultado de condições deficientes de higiene durante o processamento dos alimentos (PINTO, 1996).

Existem inúmeros antibacterianos sintéticos que foram e estão sendo desenvolvidos para o combate de diversos microrganismos, mas o uso indiscriminado e prolongado desses antimicrobianos têm constantemente gerado populações de microrganismos patogênicos resistentes a esses compostos (VARGAS *et al.*, 2004). Uma alternativa que tem sido exaustivamente estudada é a substituição desses produtos pelo uso de substâncias naturais provenientes de plantas medicinais e outros produtos de origem natural, entre eles a própolis (MENEZES *et al.*, 1997; VARGAS *et al.*, 2004; TRIPATHI e DUBEY, 2004; VALGAS *et al.*, 2007).

A própolis é considerada um antibiótico natural, com alta capacidade de inibir ou inativar diversos microrganismos (LIMA, 2006; DAUGSH, 2007).

O uso da própolis data de séculos antes de Cristo. Os egípcios a utilizavam para embalsamar as múmias e ao longo dos milhares de anos novos fins para a própolis foram sendo descobertos. Mesmo em pequenas quantidades a presença de própolis em alimentos processados a faz atuar como conservante, devido ao seu alto poder antioxidante e sua atividade bacteriostática (BASTOS, 2001).

A atividade antibacteriana da própolis está diretamente relacionada à sua composição química e dentre as centenas de compostos presentes, muitos autores conferem essa capacidade aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina. A galangina, pinocembrina e pinostrombina são

reconhecidas como os flavonóides mais efetivos contra bactérias. Os ácidos ferúlicos e caféico também contribuem para a ação antibacteriana da própolis. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo, podendo ser atribuído ao efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995; CABRAL, 2008).

O efeito da própolis sobre diferentes estirpes bacterianas tem sido amplamente estudado, entretanto fatores como origem da própolis, solvente usado na extração, tempo e metodologia de extração, espécie da abelha, a concentração do extrato e até mesmo o método de avaliação do crescimento bacteriano fazem com que os resultados obtidos variem consideravelmente (PINTO, 2000; LIMA, 2006; DAUGSH, 2007; MIORIN, 2003). Outro fator que influencia o comportamento destes microrganismos frente à ação antibacteriana da própolis é a composição da parede bacteriana. Diversos estudos mostram que a própolis apresenta maior efeito sobre bactérias Gram positivas, sendo pouco eficaz ou inativa contra bactérias Gram negativas (PARK *et al.*, 1998; PINTO, 2000; SILICI e KUTLUCA, 2005; VARGAS *et al.*, 2004; FERNANDES JR *et al.*, 2006).

Em razão destes resultados, em boa parte divergentes, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos etanólico e aquoso de própolis, oriundos de duas origens distintas e obtidos a partir de três temperaturas de extração sobre três isolados bacterianos, sendo um Gram positivo e dois Gram negativos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostras de própolis utilizada

As amostras utilizadas nesse ensaio, assim como a metodologia de preparo dos diferentes extratos de própolis etanólicos e aquosos estão descritos no capítulo II, itens 2.1 e 2.2. Nesse experimento os extratos submetidos a 95°C não foram utilizados.

2.2- Microrganismos testados

Três bactérias patogênicas foram utilizadas no estudo, sendo uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e duas Gram negativas (*Salmonella choleraesius* ATCC 6539 e *Escherichia coli* ATCC 11229). Os microrganismos testados foram fornecidos pelo banco de culturas do Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3- Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos diferentes extratos de própolis foi avaliada por meio do método de difusão de disco de acordo com Park *et al.* (2000).

As culturas bacterianas conservadas em ultrafreezer (-80°C) foram descongeladas a temperatura ambiente, em seguida pipetou-se 0,2mL da suspensão em 10 mL de caldo BHI (Broth Heart Infusion), para sua ativação e os tubos foram incubados em BOD a 37°C por 24h.

Placas com Agar MHA (Mueller Hinton Agar) foram preparadas e após solidificação foram inoculados 0,1mL da suspensão bacteriana. Discos de papel estéreis com 6 mm de diâmetros foram impregnados com 10µL dos extratos de própolis e colocados no centro das placas semeadas com as culturas bacterianas. Estes discos haviam sido previamente secos, e mantidos em dessecador por 24 horas para eliminação do resíduo de etanol. Discos contendo somente etanol 70% foram utilizados como controle.

As placas foram mantidas a 37 °C em BOD por 24h e após esse período os halos de inibição foram mensurados. A atividade antimicrobiana foi determinada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos, com o auxílio de uma régua.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de própolis estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Atividade antibacteriana dos extratos etanólico e aquosos sobre três bactérias patogênicas.

Tipo de extrato	Halo médio de inibição do crescimento bacteriano (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram ⁺)	<i>Salmonella choleraesius</i> (Gram ⁻)	<i>Escherichia coli</i> (Gram ⁻)
Álcool (controle)	0,3	1,3	0,2
Extrato aquoso a 50°C (propolis C)	0	0	0
Extrato aquoso a 70°C (propolis C)	0	0,2	0,2
Extrato etanólico a 50°C (propolis C)	0	0	1,2
Extrato etanólico a 70°C (propolis C)	2,3	2,0	0
Extrato aquoso a 50°C (propolis V)	0	3,0	0
Extrato aquoso a 70°C (propolis V)	0	0	0
Extrato etanólico a 50°C (propolis V)	0,7	0	0
Extrato etanólico a 70°C (propolis V)	2,3	3,1	0

(Categorias de atividade antimicrobiana adotadas neste trabalho: 0-1,5 mm: pouca atividade; 1,6-2,9mm: média atividade; ≥3,0mm: alta atividade)

Pode-se observar que a maioria dos extratos teve pouco ou nenhum efeito sobre as bactérias estudadas. *Escherichia coli* foi a bactéria que apresentou menor sensibilidade aos extratos testados.

Os extratos aquosos não foram efetivos contra nenhuma das bactérias estudadas, exceto o extrato aquoso a 50°C contra *S. choleraesius*. Considerando-se os resultados obtidos para os demais extratos aquosos tanto neste quanto nos outros ensaios conduzidos (capítulo II e V), o efeito do extrato aquoso a 50°C contra *S. choleraesius* foi um resultado atípico, pois como regra geral foi observado que os mesmos (extratos aquosos) foram ineficazes. Inúmeros trabalhos afirmam que extratos aquosos são ineficazes, pois não são capazes de solubilizar os compostos fenólicos responsáveis pela atividade

antimicrobiana da própolis (PARK, *et al.*, 1998; WOISKY e SALATINO, 1998; PINTO, 2000; ALDEMANN, 2005). A realização de novos testes é necessária para melhor esclarecer este comportamento. Acredita-se que a atividade antimicrobiana da própolis se deve a efeitos sinérgicos entre flavonóides, ácidos aromáticos fenólicos e seus derivados que estão presentes majoritariamente na própolis. Porém, a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis está relacionada com o tipo de microorganismo testado e o solvente utilizado na extração (BURIOL *et al.*, 2009).

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com outros estudos que tem demonstrado que a atividade antibacteriana da própolis é mais eficiente sobre bactérias Gram positivas e com baixa atuação contra Gram negativas (SILICI e KUTLUCA, 2005; VARGAS *et al.*, 2004; FERNANDES JR *et al.*, 2006; BURIOL *et al.*, 2009). Essa diferença encontrada entre bactérias Gram negativas e Gram positivas deve-se, provavelmente, as diferenças na constituição química da parede celular desses microrganismos (PINTO, 2000), pois as bactérias Gram negativas apresentam grandes quantidades de lipídios, proteínas e polissacarídeos e suas paredes são estrutural e quimicamente mais complexas do que as paredes das bactérias Gram positivas (AMORIM *et al.*, 1995). É provável então que os compostos fenólicos da própolis, indicados como os maiores responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano, não consigam interagir com a parede celular das bactérias Gram negativas da mesma forma que interagem com as Gram positivas (PINTO, 2000).

Independentemente da sua origem, a própolis sempre apresenta atividade antimicrobiana, uma vez que seu efeito bactericida e fungicida é indispensável para preservar a vida na colméia (BURIOL *et al.*, 2009).

Os extratos avaliados obtiveram uma alta atividade frente à *Salmonella choleraesius* com o tratamento (extrato etanólico a 70°C (propolis V)) apresentando um halo de inibição de 3,1 mm. Esse resultado condiz com outros estudos, como por exemplo, a pesquisa realizada por Fernandes Jr *et al* (1997) que avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e foram eficazes sobre essas duas espécies bacterianas. Entretanto, as doses de própolis requeridas foram bem diferenciadas. De acordo com estes mesmos autores, para obtenção do mesmo nível de inibição foi necessária uma dose cinco vezes maior para *E. coli* (10,0% v/v) do que para *S. aureus* (2,0% v/v).

Park *et al.* (1998) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes extratos de própolis (extrato aquoso e extrato etanólico com diferentes percentuais de álcool) contra *S. aureus* e consideraram que quando utilizados extratos etanólicos de própolis de 60 a 80%, a inibição do crescimento microbiano aumentou consideravelmente (zona de inibição de 1,5 mm, considerando uma boa atividade desse tipo de extrato), seguido de um decréscimo na atividade antimicrobiana nas porcentagens mais altas de etanol.

A expectativa desse estudo baseada em inúmeras pesquisas (PARK *et al.*, 1998; PINTO, 2000; MIORIN *et al.*, 2003; KARTAL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006), era de que os extratos etanólicos apresentassem alto desempenho contra os microrganismos testados, mas os extratos etanólicos das amostras extraídas a 50°C apresentaram baixíssima ou nenhuma atividade antibacteriana, com valores de inibição que variaram de 0 a 1,2 mm. Já os extratos etanólicos a 70°C tiveram uma atuação na inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Samonella choleraesius* bem expressiva, apresentando halos de inibição de 2,0 a 3,1 mm. Essa diferenciação na atividade antibacteriana dos extratos etanólicos pode estar relacionada a temperatura utilizada no processo de extração da própolis, ou seja, à temperatura de 70°C a extração dos compostos antibacterianos da própolis foi mais efetiva do que a temperatura de 50°C.

Pinto (2000) avaliou o efeito antimicrobiano de diferentes extratos de própolis verde processados visando o fracionamento sequencial utilizando como solventes extratores água, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio (nesta ordem), sobre bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes) isoladas do leite de vaca com mastite. Neste estudo, o extrato aquoso não exerceu nenhum efeito inibidor sobre as bactérias testadas, assim como os extratos com acetato de etila e clorofórmio, mas para esses foi sugerido que o fato de o processo de extração ter sido sequencial, muitos dos princípios ativos podem ter sido extraídos pelos solventes anteriores a eles, como o etanol e o metanol. Já os extratos etanólico e o metanólico (em menor proporção) apresentaram efeito inibidor sobre as bactérias testadas. Embora no presente estudo não tenha sido feita a extração sequencial observou-se que, como já mencionado anteriormente, os extratos aquosos não foram efetivos contra as bactérias testadas. Isso mais uma vez demonstra que a água

não é capaz de solubilizar e extrair os compostos antimicrobianos presentes na própolis bruta.

Buriol *et al.* (2009) analisaram a atividade antibacteriana dos extratos de própolis obtidos com etanol 30, 70, 95% v/v e óleo de canola. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando o método de difusão em ágar. Os microorganismos empregados foram os Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocitogenes* e Gram-negativos: *Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium*; *Pseudomonas aeruginosa*. Observou-se que todos os extratos hidroalcoólicos e oleoso testados apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocitogenes*. Para *Staphylococcus aureus*, o extrato que apresentou maior atividade *in vitro* foi o obtido com etanol 30% v/v (halo de inibição de 11,40 mm), o qual apresentou também a maior concentração de compostos fenólicos. Para *Listeria monocitogenes*, a maior atividade foi apresentada pelos extratos hidroalcoólico 70% v/v e oleoso (halos de inibição de 10,88 e 10,63 mm). Verificou-se também que o extrato de própolis obtido com etanol 70% v/v apresentou atividade contra todos os gêneros testados, com exceção de *Salmonella typhimurium*. Para esta bactéria não se observou inibição do crescimento com nenhum dos extratos testados. O extrato oleoso não apresentou atividade contra *E. coli* e *P.aeruginosa*.

4- CONCLUSÕES

A própolis apresenta um grande potencial antibacteriano, mas a metodologia de preparo do extrato pode afetar a resposta do seu efeito antibacteriano.

Os melhores resultados foram apresentados pelo extrato etanólico a 70°C, indicando que o etanol nessa faixa de temperatura conseguiu extrair os princípios ativos determinantes na atuação contra as bactérias.

De uma maneira geral os extratos aquosos não foram efetivos sobre as espécies bacterianas estudadas.

A metodologia empregada no processo de extração influencia diretamente nas propriedades biológicas da própolis, ou seja, o solvente e a

temperatura utilizada são fatores que afetam as características do extrato e consequentemente nas possíveis atividades deste.

Outro fator importante a ser considerado é o grupo ao qual essa bactéria pertence, pois há uma diferenciação expressiva da atividade desse extrato frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Novas pesquisas devem ser geradas utilizando outros solventes, como por exemplo, óleos vegetais e diferentes tempos de extração, para analisar se esses novos extratos terão atividade biológica mais eficaz, ou seja, identificar uma metodologia que garanta a maior atividade dos extratos.

5-AGRADECIMENTOS

A Érika Endo e Leandro Dias Araújo pela valiosa colaboração na realização desse ensaio e ao Dr. Washington Azevedo da Silva (Laboratório de Embalagens-UFV) pela cessão dos isolados bacterianos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** (2005). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. UFPR. 186 p.

AMORIM, A. B. F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (1995). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** 3ª ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 919p.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais.** (2001). Tese de doutorado em Entomologia. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo. 137p.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R. (2009). Composição química e atividade

biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**. 32 (2): 296-302.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana de própolis vermelha brasileira**. (2008). Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 95p.

DAUGSH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. (2007). Tese de doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 265p.

FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. (1997). Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 3(2): 287-294.

FERNANDES JR, A., LOPES, M. M. R., COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C.M.; VIEIRA, E.P. (2006). Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. 36 (1): 294-297.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYAA, S.; KURUCU, S.; TOPÇUET, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal Ethnopharmacology**. 86: 69–73.

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

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

MENEZES, H.; BACCI Jr., M., OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. (1997). Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**. 28: 71-76.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M.C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. 95: 913-920.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. (2000). Classificação das propolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Revista Mensagem Doce**. 58. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: abril de 2006.

PINTO, A. F. M. A. (1996). **Doenças de Origem Microbiana Transmitidas pelos Alimentos**. Millenium *on-line*. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millenium/Millenium_4.htm>. Acesso em: 19 de abril de 2009.

PINTO, M. S. (2000). **Efeito antimicrobiano da própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vaca com mastite**. 92p. (MSc. Tese Medicina Veterinária. UFV).

SILICI, S; KUTLUCA, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**. 99 (1): 243–249.

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

TRIPHATI, P., DUBEY, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**. 32: 235–245.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. 38:369-380.

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

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. 37 (2): 99-105

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS

RESUMO

A própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas em razão das diversas atividades biológicas e farmacológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. A própolis brasileira tem composição distinta quando comparada ao resto do mundo. Atualmente a grande procura deve-se ao artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto químico inicialmente isolado de própolis brasileira, que tem despertado grande interesse em razão de sua atividade antitumoral, antimicrobiana e antioxidante. Objetivou-se nesta pesquisa analisar a composição físico-química e a atividade antioxidante da própolis bruta e os extratos etanólicos e aquosos. Foram realizadas determinações de cinzas; perda por dessecação (umidade); fenóis totais e flavonóides totais das amostras brutas; teor de compostos voláteis; do espectro de absorção dos extratos de própolis; a análise sensorial quanto aos atributos de consistência (temperatura ambiente), cor, aroma, sabor e granulometria; contagem de fungos filamentosos e leveduras das amostras brutas e dos extratos; e a atividade antioxidante. As duas própolis brutas (C e V) estudadas estão de acordo com o exigido pela legislação quanto ao percentual de cinzas, com valores de 2,6 % e 3,4%, respectivamente. Quanto à umidade a própolis V encontra-se dentro do padrão exigido 7,6% (máximo de 8%), já a própolis C apresentou valor um pouco acima do permitido 8,6%. O percentual de compostos voláteis foi de 0,63% para a própolis C e de 1,0% para a amostra de própolis V. No espectro de absorção, os extratos apresentaram uma variação de 290,6 a 299,2 nm, sendo que os etanólicos foram os que apresentaram os maiores comprimentos de onda. A própolis C e extratos etanólico e aquoso apresentaram contagem baixa para bolores e levedura (< 10 UFC/g), já a própolis V apresentou uma contagem de $4,9 \times 10^3$ UFC/g. Quanto a caracterização sensorial, as amostras de própolis brutas apresentaram

conformidade com a legislação brasileira vigente. Em relação, ao teor de fenóis, todos os extratos avaliados encontram-se dentro do que está previsto pela legislação brasileira. Os extratos aquosos apresentaram teores de flavonóides que variaram de 0,21 a 0,30% e os extratos etanólicos valores de 2,66 a 3,60%. Em relação a atividade antioxidante, observou-se que todos os extratos apresentaram uma baixa atividade, no entanto, os extratos etanólicos apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos extratos aquosos.

Palavras-chave: físico-química, própolis, antioxidante e voláteis

ABSTRACT

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS PROPOLIS

Propolis is a natural product has occupied a high position in the national and international market of bee products due to its biological and pharmacological activities. It has been shown that products from Brazilian propolis have distinct composition when compared to its rest of the world. Great search for Brazilian propolis is due to the artepillin C (acid 3,5-diprenil-4-hidroxicinamic) content, a chemical compound first isolated from Brazilian propolis, with great interest because of its antitumoral, antimicrobial and antioxidant activity. This study aimed at analyzing the crude propolis and ethanolic and aqueous extracts from two distinct Brazilian propolis. Physicochemical analyses were accomplished (ashes; lost weight on drying (humidity); total phenols and total flavonoids of the crude samples; volatile compounds contents; spectrum of absorption of propolis extracts; sensory analysis as for the consistence at room temperature, color, aroma, flavor and granulometer; counting of molds and yeasts of the crude samples and of the extracts; and antioxidant activity. Both samples of crude propolis are in agreement with Brazilian regulation as for the percentile of ashes, (2,6% and 3,4%). Moisture of the sample V is in agreement with 7,6% (maximum of 8%), however the sample C presented value of 8,6%, which is above of maximum allowed. Volatile compounds content was 0,63% on propolis C and 1,0% for propolis V. As for of the absorption spectrum, the extracts ranged from 290.6-299.2 nm, and the ethanolic extracts presented the highest

wavelengths. Propolis C and ethanolic and aqueous extracts presented low counting for molds and yeast ($<10 \text{ UFC.g}^{-1}$), while crude sample V presented a counting of $4,9 \times 10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$. The sensory characterization, both samples of crude propolis were in conformity with the limits established by the Brazilian regulation. All extracts were low in antioxidant activity, though, ethanolic extracts presented higher activity than the aqueous ones.

Keywords: physicochemical, propolis, antioxidant, volatile

1- INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina de consistência viscosa coletada por abelhas melíferas em diferentes partes de plantas, principalmente os brotos e gemas foliares. As abelhas levam a resina para a colmeia e esta é modificada com a inclusão de cera e secreções salivares (RUSSO *et al.*, 2002).

A própolis é utilizada farmacologicamente desde o final do século passado, principalmente na Romênia, Polônia, França, Alemanha, nas antigas Iugoslávia e Tchecoslováquia e outros países europeus. Diversas pesquisas demonstram que em amostras de própolis europeias a composição química é bastante similar, visto que as abelhas do hemisfério norte são muito seletivas na coleta de resinas, principalmente em plantas das espécies de *Populus*. Entretanto, a composição química das própolis produzidas na América do Sul é de especial interesse, pois há diferença na composição de compostos fenólicos de própolis de mesma origem floral de algumas regiões brasileiras (AGUIAR *et al.*, 2003).

Alguns compostos já foram identificados, sendo principalmente compostos fenólicos e a maioria pertencente a três grupos principais: (I) flavonóides (flavonóis, flavonas e flavanonas), (II) ácidos fenólicos e (III) ésteres fenólicos e suas concentrações variam dependendo da flora da região de coleta (PARK *et al.*, 1998; BANKOVA *et al.*, 1992; KOO e PARK, 1997).

Estudos desenvolvidos em praticamente todo o mundo atribuem à complexidade de sua composição propriedades farmacológicas importantes, considerando alguns compostos isoladamente ou o sinergismo existente entre eles. Dentre as inúmeras propriedades comprovadas está a atividade antioxidante (TEIXEIRA, 2003).

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (RUFINO *et al.*, 2007). Vários autores relatam que algumas propriedades biológicas, particularmente a atividade antioxidante, em extratos de própolis, se devem em parte ao seu alto conteúdo de flavonóides, compostos que podem reduzir a formação de radicais livres e conseqüentemente tem efeito protetor contra a oxidação (MORENO *et al.*, 2000; NAGAI *et al.*, 2003). Na realidade,

estes biopolifenóis não só interferem na reação de propagação, mas também na formação de radicais livres, através da quelação dos metais ou inibindo as enzimas envolvidas no início da reação (RUSSO *et al.*, 2002).

Contudo, a exemplo de muitos outros produtos naturais, falta à própolis garantia de avaliações essenciais quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, de forma a permitir o uso racional do produto. Nesse caso, as análises físico-químicas, microbiológicas, fitoquímicas e farmacológicas são necessárias para caracterização desse produto (TEIXEIRA, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização físico-química (umidade, cinzas, fenóis totais, flavonóides totais, compostos voláteis, espectro de absorção), microbiológica (contagem de fungos filamentosos e leveduras), caracterização sensorial e atividade antioxidante de duas amostras distintas de própolis bruta, comercializadas em Minas Gerais.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção das amostras de própolis e elaboração dos extratos

As amostras de própolis utilizadas neste experimento, assim como a metodologia de preparo dos diferentes extratos etanólicos e aquosos estão descritos no capítulo II, itens 2.1 e 2.2.

2.2- Análise físico-química da própolis bruta

As análises físico-químicas (cinzas; perda por dessecação (umidade); fenóis totais e flavonóides totais) da própolis bruta e dos extratos de própolis foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998).

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método espectrofotométrico, utilizando o método de reação de substâncias fenólicas com o reagente de Folin-Ciocalteau, tendo o ácido gálico como substância de referência. O teor de flavonóides foi determinado como quercetina com o uso de $AlCl_3$. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados obtidos foram comparados aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de própolis e extrato de própolis (BRASIL, 2001a; 2001b).

A análise para determinação do teor de compostos voláteis foi realizada em aparelho Clevenger, onde em um balão de 1000 mL foi adicionado 100g de própolis bruta e 500 mL de água destilada. Essa mistura foi deixada em ebulição por 12 horas e o destilado insolúvel em água foi recolhido em frasco previamente tarado, mantido em dessecador e pesado (WOISKY, 1996).

2.3- Determinação do espectro de absorção dos extratos de própolis

A análise para determinação do espectro de absorção dos dez extratos conforme descritos no capítulo 2 itens 2.1 e 2.2 (6 extratos aquosos e 4 extratos etanólicos) foram realizados segundo a metodologia proposta por Park *et al.*, 1998, em que 25µL do extrato foi diluído em 30 mL de etanol a 95%. O espectro de absorção das amostras foi determinado no comprimento de onda de 200 a 500nm em espectrofotômetro UV-1601PC SHIMADZU.

2.4- Caracterização sensorial das amostras de própolis bruta

A caracterização sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. A avaliação foi feita para as duas própolis brutas (denominadas de própolis C e própolis V), por um grupo de 10 provadores, habituados a participar de grupos de análise descritiva de diversos produtos. As amostras de própolis bruta foram apresentadas separadamente e cada provador avaliou a amostra quanto aos seguintes atributos: consistência (temperatura ambiente), cor, aroma, sabor e granulometria de acordo com a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Própolis (BRASIL, 2001a)

2.5- Análise microbiológica da própolis bruta e dos extratos

2.5.1- Fungos filamentosos e leveduras

Foi utilizado o método de contagem em placas para determinação de fungos filamentosos e leveduras, utilizando a metodologia da American Public Health Association (VANDERZANT e SPLITTS-TOESSER, 1992).

2.6- Atividade antioxidante.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Bebidas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

O experimento foi realizado conforme proposto por Teixeira *et al.* (2008), utilizando solução etanólica do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) para a avaliação da atividade antioxidante. Os dez extratos testados foram solubilizados em etanol absoluto a 200 ppm. Posteriormente, triplicatas foram preparadas na proporção 1:6 (v:v), com as soluções etanólicas dos extratos e com a solução de DPPH, mantendo-se o intervalo de três minutos entre amostras. Os controles foram feitos misturando-se etanol e DPPH, também na proporção 1:6 (v:v). Ao final do preparo, cada amostra era mantida ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Transcorrido esse tempo, efetuaram-se leituras em espectrofotômetro (MICRONAL 8542) a 517 nm, para avaliação da variação da absorbância. Como controle positivo, foi utilizado solução etanólica de quercetina a 200 ppm (TEIXEIRA, 2003).

Os resultados foram expressos, considerando-se a porcentagem de inibição promovida pelas amostras testadas na produção de radicais livres, segundo a fórmula: % inibição = ((absorbância da solução de DPPH) – (absorbância do DPPH+amostra testada) / absorbância da solução de DPPH) x 100.

2.7- Análise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados obtidos.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Cinzas, umidade e compostos voláteis

A Tabela 1 apresenta os teores de cinzas e perda por dessecação a 105 °C das duas amostras de própolis provenientes de Minas Gerais.

Tabela 1 : Teor em % (m/m) de cinzas e umidade de duas amostras bruta de própolis.

Amostras	Análises realizadas	Referência*
Cinzas		
PROPOLIS V	2,62	Máximo 5%
PROPOLIS C	3,37	
Perda por dessecação**		
PROPOLIS V	8,63	Máximo 8%
PROPOLIS C	7,77	

* Limite estabelecido pelo Regulamento Técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para identidade e qualidade de própolis (BRASIL, 2001a; 2001b).

** 105°C/3h

Comparando-se os resultados obtidos das amostras de própolis estudadas neste trabalho com os valores da legislação brasileira (BRASIL, 2001a), constatou-se que as própolis V e própolis C estão de acordo com o exigido quanto ao percentual de cinzas, pois apresentam, respectivamente, 2,62 e 3,37%. Quanto à umidade a própolis C encontra-se dentro do padrão exigido 7,77% (máximo de 8%), já a própolis V apresentou valor um pouco acima do permitido 8,63%. Este não é um valor que inutilize o material, porque a própolis é higroscópica e o manuseio dela para as análises ou até mesmo um acondicionamento incorreto podem ter afetado o teor de umidade.

A importância de se avaliar a umidade e o teor de cinzas está relacionada diretamente com a qualidade do produto, ou seja, identificando possíveis adulterações e até mesmo as condições de conservação do material (MARCUCCI, 2005).

O teor de umidade se torna mais elevado se a própolis não for armazenada de forma adequada, podendo levar a uma deterioração mais rápida do produto (SALATINO, 1999), pois se a amostra estiver com um índice maior do que o normal de água (especialmente quando se retira do freezer e se

embala) é certo que crescerão fungos sobre a mesma, tornando-a imprópria para a comercialização (MARCUCCI, 2005).

As cinzas são um constituinte natural da própolis, porém um material inorgânico, que em quantidades exageradas podem denunciar adulterações (freqüentes principalmente em amostras em pó), por exemplo, por adição de terra ao produto ou mesmo resíduo de outras extrações de própolis (WOISKY, 1996; MARCUCCI, 2005; SALATINO, 1999).

Com relação aos compostos voláteis, no presente estudo a determinação destes foi realizada nas duas amostras brutas de própolis e o resultado obtido foi de 0,63% para amostra de própolis C e de 1,0% para a amostra de própolis V.

Woisky (1996) determinou o teor de compostos voláteis de amostras de própolis de diferentes cidades de São Paulo com pasto apícola diversificado e encontrou valores que variaram de 0,28 a 0,49% de voláteis.

As substâncias voláteis são responsáveis pelo aroma característico da própolis e estão presentes numa proporção entre 2 e 5% do produto total. Teores baixos de substâncias voláteis podem denunciar condições de armazenamento por tempo excessivamente prolongado (SALATINO, 1999). Outra característica que pode ser detectada é a adulteração feita com substância volátil, como por exemplo, álcool benzílico que também pode ocorrer na composição da própolis em condições naturais, assim como o uso de eugenol que é citado como outra substância adulterante de própolis (WOISKY, 1996).

3.2- Deteterminação dos espectros de absorção dos extratos de própolis

Os espectros de absorção dos extratos etanólicos e aquosos da própolis estão apresentados na Tabela 2 e Figura 1, que foram caracterizados por espectrofotometria na região UV.

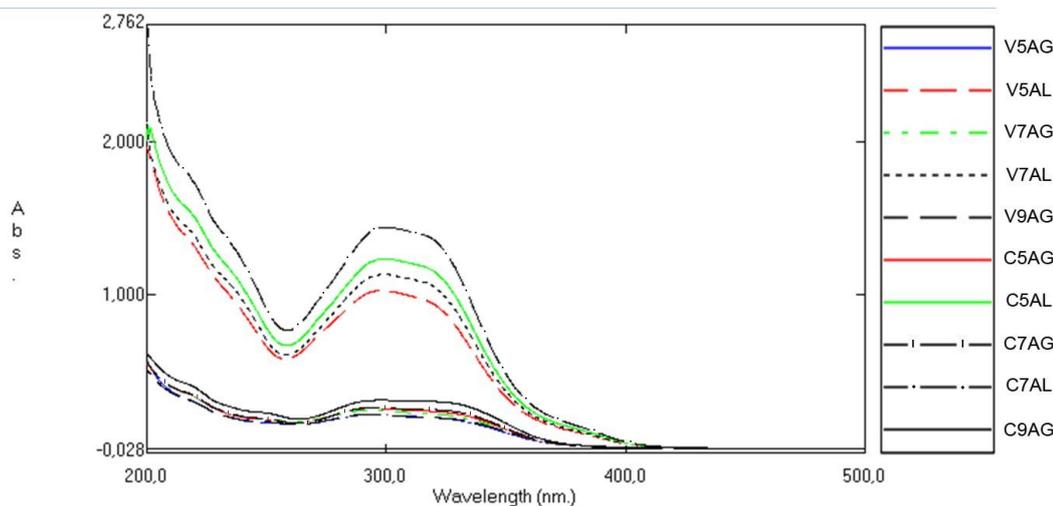


Figura 1: Espectro de absorção dos extratos etanólicos e aquosos de própolis na faixa de 200 a 500 nm.

Os extratos etanólicos apresentaram os valores de comprimento de onda de máxima absorção maiores do que os extratos aquosos. Os extratos etanólicos apresentaram valores que variaram de 298,8 a 299,2 nm, enquanto os extratos aquosos variaram de 290,6 a 297,4 nm. Os valores de absorbância são bem maiores nos extratos etanólicos, com o extrato C7AL com absorbância de 1,4415 (Tabela 2). Com esse resultado pode-se inferir que os extratos etanólicos apresentam uma quantidade maior de flavonóides. Essa variação pode ser atribuída ao solvente extrator associado a temperatura utilizada na extração.

Um aspecto observado foi que nos extratos aquosos referentes a amostra de própolis C e nos extratos alcólicos provenientes das amostras C e V, a absorção foi aumentada a medida que a temperatura de extração é aumentada. Esse perfil não ocorreu com os extratos aquosos da amostra de própolis V, pois houve uma diminuição de absorção do extrato preparado a 95°C.

Tabela 2: Absorbância e comprimento de onda (nm) de máxima absorção dos extratos etanólicos e aquosos de própolis

Tipo de extrato	Absorbância	Comprimento de onda (nm) (máx. absorção)
Própolis C extraído em água a 50°C (C5AG)	0,2620	292,6
Própolis C extraído em água a 70°C (C7AG)	0,2664	296,0
Própolis C extraído em água a 95°C (C9AG)	0,3153	297,4
Própolis V extraído em água a 50°C (V5AG)	0,2201	291,6
Própolis V extraído em água a 70°C (V7AG)	0,2478	291,0
Própolis V extraído em água a 95°C (V9AG)	0,2212	290,6
Própolis C extraído em água a 50°C (C5AL)	1,2363	298,8
Própolis C extraído em água a 70°C (C7AL)	1,4415	299,2
Própolis V extraído em água a 50°C (V5AL)	1,0300	298,2
Própolis V extraído em água a 70°C (V7AL)	1,1340	299,2

A própolis tem uma composição química variada e já foram identificadas mais de 200 substâncias em diferentes localidades, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Dentre esses, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, pois a eles é atribuída grande parte das atividades biológicas da própolis (BONHEVI *et al.*, 1994; FUNARI e FERRO, 2006).

Jurd e Geissman (1956) citados por PARK *et al* (1998) relataram que o perfil de absorção entre os comprimentos de onda de 270 - 330 nm são atribuídos aos flavonóides e fenóis.

Park *et al.* (1998) determinaram o espectro de absorção de 11 extratos (1 aquoso e 10 extratos etanólicos com concentrações de 10 a 95% de etanol) e verificaram que todas eles foram similares e apresentaram máxima absorção a 290nm. Entretanto, dependendo da concentração de etanol, o grau de absorção a 290 nm foi variável. O extrato aquoso de própolis apresentou a menor absorção e essa absorção foi aumentando a medida que a concentração de etanol foi elevada até 80%. Os extratos com 90 e 95% de etanol apresentaram diminuição na absorção a 290 nm. Entretanto, os resultados indicaram que altas concentrações de flavonóides foram liberadas pela própolis quando foi utilizada uma solução 80% de etanol como solvente extrator, concluindo que o extrato etanólico a 80% apresenta maior quantidade de flavonóides.

Aguiar *et al.* (2003) avaliaram as características físico-químicas de extratos etanólicos de própolis coletadas de diferentes locais da Mata Atlântica do Estado de Alagoas e as onze extratos avaliados apresentaram valores diferenciados (extrato AL1: 281,nm; extrato AL9: 280,0nm; extrato AL11: 282,0nm), mas basicamente todas as amostras apresentaram valores de absorção máxima em torno de 281,0 nm. Os autores definiram que esta diferença nos espectros na região UV é devido a variação química dentro de uma mesma região (litoral alagoano), pois trata-se de uma região com grande variedade de microecossistemas, como de mata e mangue, tendo nesse caso uma diversidade complexa e dinâmica que reflete na composição química de produtos como a própolis coletadas pelas abelhas.

3.3- Fenóis e flavonóides totais

A Instrução Normativa nº 3 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001b) estabelece que o extrato de própolis deve apresentar percentuais de no mínimo 0,25% (m/m) para os teores de flavonóides e no mínimo 0,50% (m/m) para o teor de fenóis.

Os resultados dos ensaios para determinação dos teores de flavonóides e fenóis totais dos extratos etanólicos e aquosos de própolis estão apresentados na Tabela 3. Os valores estão expressos como equivalentes de quercetina e de ácido gálico, respectivamente.

Todos os extratos (etanólicos e aquosos) de própolis avaliados atendem ao requisito mínimo para o teor de fenóis determinado pela legislação vigente, que é de 0,5%. Os extratos aquosos apresentaram teores de fenol que variaram de 3,37 a 4,24% e os etanólicos valores de 8,51 a 10,11%. Conforme podemos observar na Tabela 3, os extratos de própolis etanólicos apresentaram em média o dobro do teor de fenóis em relação aos extratos aquosos, indicando que o etanol possui um maior potencial de extração desse componente. Dentro do grupo dos extratos aquosos, aqueles que foram submetidos à temperatura de 95 °C (C9AG e V9AG) apresentaram os maiores valores de fenol (4,24 e 3,90%, respectivamente).

Tabela 3 – Teores de fenóis e flavonóides totais.

Amostras	Fenóis totais¹(%) (*mín: 0,50% (m/m))	Flavonóides totais² (%) (*mín: 0,25% (m/m))
Ext. aquoso a 50°C (propolis C)	3,986	0,217
Ext. etanólico a 50°C (propolis C)	9,660	3,540
Ext. aquoso a 70°C (propolis C)	3,903	0,216
Ext. etanólico a 70°C (propolis C)	10,110	3,600
Ext. aquoso a 95°C (propolis C)	4,246	0,266
Ext. aquoso a 50°C (propolis V)	3,373	0,240
Ext. etanólico a 50°C (propolis V)	8,510	2,663
Ext. aquoso a 70°C (propolis V)	3,410	0,303
Ext. etanólico a 70°C (propolis V)	8,820	2,920
Ext. aquoso 95°C (propolis V)	3,903	0,270

(Ext: Extrato; ¹Expressos como equivalentes de ácido gálico, sobre a própolis bruta (m/m); ²Expressos como equivalentes de quercetina, sobre a própolis bruta (m/m); *Limite estabelecido pelo Regulamento Técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para identidade e qualidade de própolis (BRASIL, 2001b).

Quanto ao teor de flavonóides, dos dez extratos testados, apenas três não atenderam ao valor mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (0,25%), apresentando teores de 0,21; 0,21 e 0,24, para C5AG, C7AG e V5AG, respectivamente. Os demais extratos aquosos (C9AG; V7AG e V9AG) apresentaram valores acima de 0,25%, assim como os extratos etanólicos que apresentaram valores de 2,66 a 3,60%. O padrão relacionado a temperatura referente ao teor de fenóis foi o mesmo para a determinação de flavonóides, exceto dentro do grupo de extratos aquosos da amostra V (V5AG; V7AG e V9AG), onde a amostra V7AG (submetida a 70°C apresentou o maior teor de flavonóides (0,30%)

Aldemann (2005) realizou um estudo comparativo de várias amostras de própolis de diferentes regiões e coletadas por diferentes populações de abelhas (*Apis mellifera* e de Meliponíneos) quanto ao teor de flavonóides totais e fenóis totais. O teor de flavonóides nos extratos etanólicos de quatro amostras de *Apis mellifera* foram de 16, 3, 1,5 e 0,1 %. Nos extratos aquosos os teores de flavonóides totais, das mesmas amostras de *Apis mellifera*, foram de 0,9, 1,8, 0,3 e 0,04 %. Os extratos etanólicos e aquosos das amostras de própolis de Meliponíneos apresentaram teores de flavonóides menores que 0,02 % m/m em média e não atingiram o teor mínimo exigido pela legislação. Em relação, ao teor de compostos fenólicos nos extratos etanólicos das amostras de *Apis mellifera* os teores encontrados foram de 90, 19, 40 e 11 %. Nos extratos aquosos o teor de compostos fenólicos totais para as amostras de *Apis* foram de 26, 36, 22 e 8,6 %. Os extratos etanólicos das amostras de Meliponíneos apresentam teores de compostos fenólicos de 2,0; 0,5; 0,2 e 0,3 % m/m respectivamente. O teor de compostos fenólicos nos extratos aquosos foi de 4,0; 1,0; 3,7 e 2,4 %.

Ao analisar os teores de fenóis das amostras de própolis de Meliponíneos, este mesmo autor verificou que, ao contrário do obtido para as amostras de *Apis mellifera*, os extratos aquosos apresentaram teores de fenóis totais maiores que os extratos etanólicos. Neste caso, a água foi o solvente mais eficiente na extração destes compostos. Apesar disto, a quantidade de fenóis das amostras de Meliponíneos é muito pequena quando comparada à concentração de fenóis nos extratos de própolis de *Apis mellifera*.

Entretanto, o que se observa na literatura é a alta variabilidade de resultados, pois diversas metodologias são utilizadas para determinar a

dosagem de classes de substâncias encontradas na própolis, como por exemplo, para fenóis totais e flavonóides. Assim, os resultados encontrados são diferenciados, não só pela variedade de fatores que atuam sobre a própolis, mas também pela metodologia empregada nessa determinação.

Woisky (1996) determinou o teor de fenóis totais de extratos metanólicos (extração realizada em aparelho Soxhlet) e etanólicos (amostras em álcool absoluto e amostras em álcool 70 °GL) de própolis coletadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo, aplicando o método espectrofotométrico, com duas metodologias diferentes (método de Folin-Denis e o método de Folin-ciocalteau). Para as amostras metanólicas encontrou teores de fenol entre 6,93-9,29% (Folin-Denis); 8,78-13,72% (Folin-ciocalteau). Em relação, as amostras etanólicas, os valores encontrados foram bem inferiores. As amostras em álcool absoluto e álcool 70 °GL apresentaram teores de 0,96-1,08%; 1,21-1,27% (Folin-Denis); 1,20-1,30%; 1,46-1,67% (Folin-Ciocalteau), respectivamente. Para a análise de flavonóides os valores encontrados foram 0,77-2,69% para os extratos metanólicos. Em relação aos extratos alcoólicos os resultados foram praticamente iguais (independente da concentração do solvente), variando de 0,35-0,39%.

Da Silva *et al.* (2006) determinaram o teor de fenol e flavonóides de quarenta e nove extratos de própolis brasileira produzidas em diferentes regiões geográficas, empregando a metodologia do Folin-Ciocalteau para determinação do fenol e a metodologia utilizando $AlCl_3$ para flavonóides. Os teores encontrados foram 0,41-3,90% e 0,05-0,63%, respectivamente.

González *et al.* (2003) mediram os teores de substâncias fenólicas em própolis de diferentes regiões da Argentina por três métodos colorimétricos distintos (métodos de Folin-Ciocalteau, azul de Prusia e o-fenantrolina.), e encontraram para a análise com o reagente Folin-Ciocalteau (ácido gálico como referência) os maiores valores para fenol, entre 3,25 e 33,49%. Os autores inferiram que dentre as três metodologias estudadas a que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu foi a mais estável e reprodutível.

3.4- Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Em todos os extratos avaliados (etanólicos e aquosos) e na amostra C de própolis bruta a contagem de fungos filamentosos e leveduras foi baixa (<10 UFC.g⁻¹ estimado), já a amostra bruta de própolis V apresentou uma contagem média de $4,9 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, que comparada a literatura existente para produtos contendo própolis e para mel não é expressiva, sendo considerada baixa. Nesse caso podemos considerar as amostras brutas de própolis e seus respectivos extratos dentro de padrões microbiológicos aceitáveis.

É necessário tomar cuidados especiais no consumo da própolis *in natura* ou na sua utilização em outros produtos sem um processamento adequado. Normalmente, condições de manuseio incorreto das amostras ou armazenamento logo após descongelamento (sem secagem adequada do material), podem contaminar o produto com vários tipos de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, que podem causar infecções no tubo digestivo e provocar graves lesões (MALASPINA e PALMA, 2000; MARCUCCI, 2005).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001a; BRASIL, 2001b) não exige realização de análises microbiológicas nem para própolis *in natura*, nem para o extrato, estabelecendo apenas que sejam seguidas práticas de higiene na manipulação do produto.

Gomes *et al.* (2007) avaliaram a qualidade microbiológica de barras de cereal, cuja a formulação era de soja, milho, mel e própolis. O resultado encontrado nas contagens de fungos filamentosos e leveduras nas amostras variaram de 5 a 30 UFC.g⁻¹.

Da Silva (2007) comparou a qualidade microbiológica de méis certificados pelo S.I.F e não certificados da região de Viçosa em Minas Gerais e detectou contagem de $2,9 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ (não certificados) e $3,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ (certificados).

Grosso e Belenguer (2000) obtiveram o valor médio para contagem de fungos filamentosos e leveduras de $7,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ em amostras de méis produzidas nas províncias de Boyacá e Tolima na Colômbia

3.5- Caracterização sensorial da própolis bruta

O resultado obtido (Tabela 4) nesta avaliação foi unânime para as duas própolis e estão dentro dos padrões de qualidade determinados pelo MAPA.

A própolis C, de acordo com os provadores apresentou melhor qualidade sensorial, com os atributos cor, aroma e sabor considerado agradáveis, dentro das exigências do consumidor. Já a amostra de própolis V apesar de estar dentro do padrão determinado para qualidade de própolis bruta, não foi um produto apreciado por estes provadores.

Tabela 4: Caracterização sensorial de duas amostras de própolis bruta.

Amostras	Consistência	Cor	Aroma	Sabor	Granulometria
Própolis C	Rígida	esverdeado	característico balsâmico	suave balsâmico	heterogênea
Própolis V	Maleável	Marrom	característico resinoso	fraco/ resinoso/ picante	heterogênea

A própolis C apresentou uma coloração mais uniforme e verde, já a própolis V tinha a coloração mais escura (mais para o marrom), aparentando ter uma mistura bem maior de fontes botânicas e presença de resina do que a amostra C.

A própolis verde que é encontrada em grande abundância na região de Minas Gerais, tem como uma das fontes botânicas principais a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) que possui aroma e sabor agradável e balsâmico, conferindo essas características a própolis. O hábito dos consumidores para própolis ou extrato de própolis dessa região está voltado para essas características da própolis verde, por conta disso houve uma tendência a preferirem e considerarem de melhor qualidade sensorial a própolis C.

Funari e Ferro (2006) consideram que a caracterização sensorial da própolis merece atenção, pois pode indicar o caminho analítico a se seguir ou até mesmo permitir deduções prévias de algumas características físico-químicas da amostra. Os autores citam que a própolis esverdeada, típica de algumas localidades da região sudeste do Brasil (a mais bem cotada no mercado internacional), possui uma relação entre a cor e sua composição química, rica em ácidos fenólicos e que a consistência à temperatura ambiente também pode dar indícios da relação resina/cera na própolis. Assim,

apresentando-se rígida, pode indicar um elevado teor de resinas, o que é desejável, pois as atividades biológicas constatadas para a própolis vêm sendo atribuídas a substâncias contidas nesta fração, se a mesma for maleável, pode indicar um elevado teor de cera. Por sua vez, aroma e sabor indicam se a amostra é nova ou se foi produzida pelas abelhas há muito tempo, o que tornaria estas características menos acentuadas. Finalmente, uma amostra em pedaços maiores, além de permitir a completa execução da análise sensorial, torna mais fácil a visualização de materiais estranhos, como terra e areia, que poderiam ser incorporados à própolis em pó para "aumentar sua massa", caracterizando uma adulteração.

Chaillou *et al.* (2004) avaliaram amostras de própolis argentinas quanto à cor, aroma, sabor, consistência e aspecto. As avaliações foram realizadas por 10 provadores semitreinados e determinaram que em 100% das amostras a estrutura foi considerada homogênea, em que 45% apresentaram um aspecto irregular com brilho e 30% irregulares com pouco brilho e o restante irregular opaco. Nos ensaios de consistência determinaram que 45% das amostras eram pouco macias, 40% duras e 15% macias. Em relação a cor, 65% foram consideradas marrom escuro, 20% marrom claro com tons amarelados, 10% marrom com tons castanhos e 5% marrom claro com tons castanhos. O aroma de 75% foi resinoso e o sabor da totalidade de própolis analisadas foi picante.

Funari e Ferro (2006) avaliaram amostras de própolis coletadas no município de Cabreúva (SP), que apresentaram aroma resinoso e balsâmico, cor esverdeada, sabor picante acentuado, consistência rígida à temperatura ambiente e pedaços heterogêneos, características dentro dos padrões estabelecidos na legislação brasileira.

Dentro de um mercado cada vez mais exigente, principalmente o japonês, onde a própolis brasileira é fortemente requisitada, as características sensoriais (principalmente a cor (*green propolis*), assim como a incidência de artemillin C estão entre os aspectos solicitados por esse grupo de compradores.

3.6- Atividade antioxidante

Os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante, quando comparados com o potencial da substância de controle (quercetina) avaliada

isoladamente. No entanto, os extratos etanólicos de própolis apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos extratos aquosos (Tabela 5).

Entre os extratos avaliados, os que apresentaram maior atividade foram aqueles com maiores teores de flavonóides e fenóis totais (*ver item 5.3*), sugerindo uma grande influência destes compostos na atividade anti-radical livre das amostras. Exceto, para o extrato C5AG (extrato aquoso a 50°C (propolis C)), que apesar de apresentar valores bem inferiores de fenóis e flavonóides em relação aos extratos etanólicos, apresentou um percentual de inibição de 22,35%, sendo este maior do que os extratos C7AL (20,91 %) e V5AL (22,11%).

Tabela 5: Efeito antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos de própolis

Amostras	% inibição*
Quercetina (controle)	92,38
C5AG	22,35
C5AL	23,80
C7AG	17,54
C7AL	20,91
C9AG	16,83
V5AG	15,62
V5AL	22,11
V7AG	15,38
V7AL	23,08
V9AG	17,07

(*valores médios)

A presença de um determinado composto na própolis pode determinar em grande parte o seu potencial antioxidante. Russo *et al.* (2002) analisaram extratos etanólicos de própolis com e sem a presença de éster fenílico do ácido cafeico (CAPE). Trata-se de um composto identificado como um dos mais ativos biologicamente, com propriedades antitumorais. Os extratos de própolis com CAPE mostraram um potencial de inibição maior do que os extratos sem CAPE. CAPE estudado isoladamente apresentou uma atividade

antioxidante maior do que a galangina, tais resultados sugerem que a importância significativa deste composto na atividade antioxidante da própolis.

Alguns autores desenvolveram ensaios determinando que extratos aquosos têm uma capacidade antioxidante igual e até maior do que extratos etanólicos.

Banskota *et al.* (2000) determinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos e aquosos de própolis do Brasil, Holanda, Peru e China. Neste ensaio, os extratos aquosos das própolis do Brasil e China foram mais efetivos que os metanólicos na capacidade antirradicais livres e os extratos metanólicos das própolis da Holanda e Peru foram mais efetivos do que os aquosos.

Kumazawa *et al.* (2004) avaliaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis de várias regiões do mundo (Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China (Hebei, Hubei, and Zhejiang), Hungria, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Usbequistão). Os extratos etanólicos da Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia apresentaram uma forte atividade antioxidante (60%) e esse resultado foi atribuído as altas concentrações de flavonóides e fenóis desses extratos. A atividade antioxidante da própolis brasileira foi bem inferior quando comparada a chinesa e as amostras européias. Os autores atribuem essa baixa atividade ao solvente utilizado (etanol), pois compostos como propol, isolado de extrato aquoso de própolis brasileira apresentou ser mais potente do que antioxidantes como a vitamina C e vitamina E.

Teixeira *et al.* (2003) determinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de própolis provenientes de três localidades de Minas Gerais (Itapeçerica (It), Paula Cândido (PC) e Virginópolis (V)). Os extratos metanólicos de Itapeçerica e Paula Cândido (47,65 e 50,75%, respectivamente) tiveram pronunciada atividade, diferentemente da amostra de Virginópolis (0%) que não apresentou atividade antioxidante. A substância utilizada como controle positivo foi o BHT que apresentou 63,86% de atividade antioxidante. O teor de fenóis das amostras It e PC foram de 20,5 e 21,88%, respectivamente, enquanto a amostra de V continha apenas 1,5%. Sugeriu-se que a eficiência apresentada pelos extratos de Itapeçerica e de Paula Cândido na redução do radical DPPH estaria ligada à significativa presença desses compostos. Os autores estabeleceram um paralelo entre as atividades dos extratos testados e

a atividade do BHT, observando que It e PC apresentaram 74,4 e 79,47% da atividade do BHT, respectivamente.

Aldemann (2005) avaliou a atividade antioxidante de extratos de própolis provenientes de abelhas *Apis mellifera* e de Meliponíneos. As amostras de própolis coletadas por Meliponíneos apresentaram uma atividade antioxidante muito reduzida quando comparadas com a das amostras de *Apis mellifera* e ao analisar a atividade antioxidante destas amostras em uma concentração cinquenta vezes maior que as amostras de *Apis mellifera* observou-se um aumento na ação anti-radical livres de apenas duas amostras.

Os extratos etanólicos das amostras PP4 (União da Vitória-Paraná), C-RJ (Cantagalo-Rio de Janeiro), PP2 (União da Vitória-Paraná), e PS (Palmas-Paraná) de *Apis mellifera* apresentaram capacidade antioxidante em média de 87, 45, 88 e 23%, respectivamente. Como o teor de flavonóides da amostra PS foi praticamente nulo, o teor de fenóis pode ter sido o responsável pela reduzida atividade nesta última amostra.

4-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis bruta C e V e seus respectivos extratos alcoólicos e aquosos estavam de acordo com os padrões de qualidade exigidos pela legislação brasileira vigente.

O solvente utilizado no processo de extração é um fator de grande importância que afeta algumas características do produto final. Os extratos etanólicos apresentaram maior atividade antioxidante.

A própolis tem um grande potencial de atividade antioxidante, mas sua capacidade está diretamente relacionada à sua composição química, ou seja, os teores de fenóis e de flavonóides atuam nessa propriedade biológica da própolis. Os extratos que apresentaram os valores de fenóis e flavonóides maiores apresentaram maior atividade antioxidante.

5-AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Bebidas da Universidade Federal de Viçosa, em especial a estudante de doutorado Vanessa Castro pela ajuda na condução das análises e pelas sugestões.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** (2005). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. UFPR. 186 p.

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; KOO, M. H.; PARK, Y. K. (2003). Caracterização físico-química das própolis originárias da região de Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce.** 72. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em setembro de 2005.

BANKOVA, V. S.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, J. (1992). Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatography. **Journal chromatography.** 607: 150-153.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology.** 72: 239-246.

BONHEVI, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. S. (1994). The composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. **JAOCS (Journal of the American Oil Chemists' Society).** 71 (5): 529-532.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 19 jan. 2001a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VII– Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001b.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. (2004). Estudio del propoleos de Santiago del Estero-Argentina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24(1): 11-15.

DA SILVA, M. B. L. **Diagnóstico do sistema e produção e qualidade do mel de *Apis mellifera***. (2007). Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. UFV. 97p.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidants activities. **Food Chemistry**. 99 (3) 431-435.

FURANI, C. S.; FERRO, V. O. (2006). Análise de própolis. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26 (1): 171-178.

GOMES, G.V.L.; ROSA, M. R.; SANTA, O. R. D. (2007). **Uma alternativa saudável para barra de cereais**. In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica. Universidade Estadual de Maringá. Disponível em: <<http://www.ppg.uem.br/default.asp?id=14&mnu=3>>. Acesso em: março de 2009.

GONZÁLEZ, M.; GUZMÁN, B.; RUDYK, R.; ROMANO, E.; MOLINA, M. A. A. (2003). Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. **Latin American Journal Pharmacology**. 22 (3): 243-248

GROSSO, G. S.; BELENGUER, J. A. S. (2000). **Estudio analítico comparativo de las propiedades fisicoquímicas de mieles de *Apis mellifera* en algunas zonas apícolas de los departamentos de Boyacá y**

Tolima. Disponível em: <[http:// www.beekeeping.com/articulos/salamanca](http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca)>. Acesso em: julho de 2006.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoids aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. (1997). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 61: 367-369.

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

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. (2000). **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. In: Congreso Internacional de Própoleos. Argentina. Disponível em: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>. Acesso em: novembro de 2006.

MARCUCCI, M.C. (2005). Controle de qualidade da própolis. **Mensagem Doce**. 48. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: dezembro de 2008.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. 71: 109-114.

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. 18(3): 313-318.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. (2007). **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Comunicado Técnico. 127: 1-4. EMBRAPA: Fortaleza.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**. 73 (Suppl. 1): S21–S29.

SALATINO, A. (1999). **Controle de qualidade para a própolis brasileira**. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/bols/1998_2001/rede481.htm>. Acesso em: abril de 2009.

TEIXEIRA, E. W. (2003). **Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais e suas atividades biológicas**. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. UFV. 171 p.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRIS, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. (2008). Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **eCAM (Evidence-based Complementary and Alternative Medicine)**. 177: 1-9.

VANDERZANT, C.; SPLITTS-TOESSER, D. F. (1992). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington-DC: American Public Health Association. 1219 p.

WOISKY, R. G. (1996). **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação (Mestrado). Faculdades de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. 37 (2): 99-105

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)