UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

NATHÁLIA URSOLI FERREIRA BAPTISTA

**Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes
própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas**

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

NATHÁLIA URSOLI FERREIRA BAPTISTA

Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes
própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 26/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Baptista, Nathalia Ursoli Ferreira.

Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas. Ribeirão Preto, 2016.

78 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: De Martinis, Elaine Cristina Pereira.

1. Própolis. 2. Atividade antibacteriana 3. Adesão e invasão celular. 4. Microscopia eletrônica de varredura.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Nathália Ursoli Ferreira Baptista

Título do trabalho: Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*A minha família pelo incentivo,
cuidado, amor e compreensão
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTO

A Deus, pela saúde, perseverança e sabedoria que me proporcionou durante esta etapa de minha vida. “Eu sou a videira, vós, os ramos. Quem permanece em mim, e eu, nele, esse dá muito fruto; porque sem mim nada podeis fazer.” (João 15:5).

Aos meus pais, Roberto Luiz Ferreira e Ana Lúcia Ferreira, pelo apoio constante e todo esforço dedicado para concretização dos meus estudos e sonhos pessoais.

Ao meu marido, Pedro Baptista, pela compreensão e encorajamento diários.

Às minhas irmãs, Roberta Ferreira e Fernanda Melo, pela amizade, cuidado e troca de experiências.

A minha orientadora, Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis pelos conhecimentos compartilhados, orientação recebida, paciência e acolhimento.

Aos colegas Manoel Tavares e Antonio Carlos Meda pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Às colegas Andresa Berretta e Edna Barizon pelo incentivo, confiança e conversas esclarecedoras.

Aos técnicos e colegas Lucas Sousa, Vanessa Maciel e Luiz Fernando Chaim por toda ajuda, companheirismo e experiências partilhadas.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Controle de Qualidade da empresa Apis flora por tornarem o cotidiano mais agradável e por ajudarem direta ou indiretamente neste trabalho.

RESUMO

BAPTISTA, N. U. F. **Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A própolis é uma resina elaborada por abelhas que há anos tem sido utilizada na medicina popular devido as suas atividades biológica sendo que estas são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos. Apesar disto, o mecanismo de ação da própolis permanece obscuro e a maioria dos estudos de atividade antimicrobiana realizados utilizaram métodos clássicos *in vitro*, que embora confirmem esta ação, não explicam como ela ocorre. Neste estudo foram avaliadas as características físico-químicas dos extratos de própolis verde, dourada, vermelha e extrato padronizado comercial (EPP-AF®). Também foi verificada a atividade antibacteriana destes extratos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49.619 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10.031 utilizando metodologia de microdiluição em caldo e avaliação em cultura de células eucarióticas. Finalmente, foi avaliada a influência do extrato de própolis verde em concentrações bactericidas na morfologia das bactérias citadas. Os resultados obtidos mostraram que todos os extratos possuem grande quantidade de compostos fenólicos, entretanto a própolis vermelha apresentou melhor atividade antimicrobiana para todas as bactérias avaliadas, com concentração bactericida mínima entre 0,19 - 0,77mg/ml . Apesar disto, o extrato de própolis vermelha foi o mais instável, havendo perda significativa dos flavonoides, uma das principais substâncias pertencentes aos compostos fenólicos relacionados à atividade antimicrobiana. Além disso, verificou-se que o extrato de própolis não influenciou na adesão e invasão bacteriana em células de carcinoma de laringe humano (HEp-2). As morfologias das bactérias tratadas com própolis avaliada por microscopia eletrônica de varredura evidenciou lise na superfície das bactérias gram-positivas e alteração morfológica na gram-negativa. A partir dos dados obtidos foi possível caracterizar diferentes extratos de própolis e confirmar a sua atividade antimicrobiana. Além disso, embora o mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado, os resultados indicam que ele está relacionado a danos estruturais provocados pela própolis e não a uma ação direta na adesão e invasão bacteriana nas células eucarióticas.

Palavras-chave: Própolis, Atividade antibacteriana, Adesão e invasão celular, Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

BAPTISTA, N. U. F. **Study of chemical composition and antimicrobial activity of different propolis and evaluation in eukaryotic cell culture.** 2016. 78 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Propolis is a resin produced by bees used since antiquity in folk medicine because of biological properties, especially due to phenolic compounds. However, the mechanism of action of propolis is unknown and the majority of studies on antimicrobial activity were based on *in vitro* classical methods that confirmed this action, but do not explain how. This present work compared the chemical composition of green, golden, red and commercial extract of propolis (EPP-AF®). Also antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Microdilution method and cell culture experiments were carried out. Finally, it evaluated the influence of bactericidal concentration of green propolis on the morphology of bacteria. The results indicated there were high levels of phenolic compounds in all extracts, however red propolis presented the best antimicrobial activity against all bacteria studied, with bactericide concentration in the range of 0.19 - 0.77mg/ml. Nevertheless, red propolis extract was the most unstable, with significant loss of flavonoids, one the main substances associated with antimicrobial activity. Furthermore, the extract of propolis did not influence the adhesion and invasion of bacteria in human larynx carcinoma cell (HEp-2). The study of scanning electron microscopy of bacteria treated with propolis showed cell lysis in the gram-positive and morphological changes in the gram-negative bacteria. This study contributed to characterize and confirm antimicrobial activity of different propolis extracts. Although the mechanism of action was not completely elucidated, the results indicate that the antimicrobial activity is associated with bacterial cell damage by propolis and it is not due to influence direct of propolis on bacterial adhesion and invasion of the eukaryotic cells.

Keywords: Propolis, Antibacterial activity, Cell adhesion and invasion, Scanning electron microscopy.

RESUMEN

BAPTISTA, N. U. F. **Estudio de la composición química y la actividad antimicrobiana de diferentes propóleos y evaluación en células eucarióticas en cultivo**. 2016. 78 f. Disertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

El propóleo es una resina producida por abejas que durante años ha sido utilizada en la medicina popular debido a sus actividades biológicas, esto se atribuye principalmente a los compuestos fenólicos. A pesar de esto, el mecanismo de acción sigue siendo desconocido y los estudios de actividad no son claros y la mayoría son utilizados en los métodos clásicos *in vitro*, los cuales confirman esta acción pero no explican la forma en que se produce. En este estudio se evaluaron las características físicas y químicas de los extractos de propóleo verde, dorado, rojo y un extracto comercial estandarizado (EPP-AF®). La actividad antibacteriana de estos extractos también se observó contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 usando la metodología de microdilución en caldo y evaluación en cultivo celular. Por último, se evaluó la influencia del extracto de propóleo en concentraciones bactericidas en la morfología de las bacterias mencionadas. Los resultados mostraron que todos los extractos contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos, sin embargo el propóleo rojo mostró mejor actividad antimicrobiana para todas las bacterias evaluadas con la concentración bactericida entre 0,19 - 0,77mg/ml. A pesar de esto, el extracto de propóleo rojo fue el más inestable con una pérdida significativa de flavonoides, una de las principales sustancias presentes en los compuestos fenólicos relacionados con la actividad antimicrobiana. Además, se encontró que el extracto de propóleo no influyó en la adhesión e invasión de las células bacterianas aisladas de laringe. La morfología de las bacterias tratadas con propóleo fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido, la cual mostró lisis en la superficie de bacterias gram-positivas y un cambio morfológico en las bacterias gram-negativas. A partir de los datos obtenidos fue posible caracterizar los diferentes tipos de propóleos y confirmar su actividad antimicrobiana. Además, aunque el mecanismo de acción no se ha aclarado completamente, los resultados indican que se relaciona con un daño estructural del propóleo y no por una acción directa sobre la adhesión e invasión bacteriana en las células eucarióticas.

Palabras clave: Propóleo, Actividad antibacteriana, Adhesión e invasión celular, Microscopía electrónica de barrido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos compostos encontrados nos extratos de própolis...	30
Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato de própolis dourada	31
Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato de própolis verde	32
Figura 4. Perfil cromatográfico do extato de própolis vermelha.....	33
Figura 5. Perfil cromatográfico do extrato de própolis EPP-AF®	34
Figura 6. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis dourada nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	35
Figura 7. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis verde nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	35
Figura 8. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis vermelha nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	36
Figura 9. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis EPP-AF® nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	36
Figura 10. Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de própolis expressa em sólidos solúveis.....	37
Figura 11. Concentração bactericida mínima (CBM) após colocar uma alíquota de 10µl de cada poço das concentrações testadas nos experimentos de microdiluição em caldo.....	38
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de própolis dourada, verde, vermelha e EPP-AF® no tempo de exposição de duas horas..	40
Figura 13. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de própolis dourada, verde, vermelha e EPP-AF® no tempo de exposição de 24 horas	40
Figura 14. “Time kill curve” de <i>S.aureus</i> na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC como diluente	42
Figura 15. “Time kill curve” de <i>K.pneumoniae</i> na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC como diluente	43

Figura 16. “Time kill curve” de <i>S.pneumoniae</i> na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC com 5 % de sangue de cavalo como diluente.....	43
Figura 17. Adesão bacteriana em células HEp-2 pré-tratadas com 100µg/ml de EPVD..	45
Figura 18. Adesão bacteriana em células HEp-2 tratadas com 100µg/ml de EPVD .	46
Figura 19. Invasão de bacteriana em células HEp-2 pré-tratadas com 100µg/ml de EPVD.	47
Figura 20. Invasão bacteriana em células HEp-2 tratadas com 100µg/ml de EPVD.	48
Figura 21. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das bactérias <i>S.aureus</i> , <i>S.pneumoniae</i> e <i>K.pneumoniae</i> sem tratamento e após tratamento com concentrações bactericidas mínimas do EPVD	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos diferentes extratos de própolis	26
Tabela 2 – Teores de sólidos solúveis nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	27
Tabela 3 – Comparação da quantidade de compostos fenólicos totais nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.....	27
Tabela 4 – Teores de flavonoides totais nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM	Concentração bactericida mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPD	Extrato de própolis dourada
EPP-AF®	Extrato de própolis padronizado
EPVD	Extrato de própolis verde
EPVM	Extrato de própolis vermelha
HEp-2	Células de carcinoma epidermóide de laringe humana
ISO	International Organization for Standardization
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHA	Müller Hinton agar
MHC	Müller Hinton caldo
PBS	Tampão phosphate buffered saline
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

p/v	Peso por volume
%	Porcentagem
µg/ml	Micrograma por mililitro
mg/ml	Miligrama por mililitro
kV	Quilovolt
®	Marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
RESUMEN	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Própolis - Um breve histórico	2
1.2. Os diferentes tipos de própolis.....	3
1.3. Atividades biológicas atribuídas à própolis.....	4
1.4. Propriedades biológicas de compostos isolados presentes na própolis.....	6
1.5. Uso clínico da própolis	8
1.6. Mecanismo da ação antimicrobiana da própolis	9
1.7. Estudos em cultura de células eucarióticas	9
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. METODOLOGIA	16
4.1. Etapa 1: Avaliação da composição físico-química, atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos.....	16
4.1.1. Obtenção dos extratos de própolis.....	16
4.1.2. Caracterização físico-química	17
4.1.2.1. Dosagem de sólidos solúveis.....	17
4.1.2.2. Dosagem de fenóis	17
4.1.2.3. Dosagem de flavonóides.....	17
4.1.2.4. Caracterização Química por CLAE	18
4.1.3. Atividade antimicrobiana	18
4.1.4. Cultivo celular.....	19
4.1.5. Avaliação da citotoxicidade da própolis	19

4.2 Etapa 2: Avaliação do crescimento bacteriano, infecções celulares e morfologia em microscopia eletrônica de varredura	20
4.2.1. Avaliação do crescimento bacteriano (curva de morte ou “time kill curve”) na presença de própolis.....	20
4.2.2. Adesão celular	21
4.2.2.1. Determinação do tempo de adesão	21
4.2.2.2. Pré-tratamento com própolis.....	21
4.2.2.3. Tratamento com própolis.....	21
4.2.3. Invasão celular	22
4.2.3.1. Determinação do tempo de invasão.....	22
4.2.3.2. Pré-tratamento	22
4.2.3.3. Tratamento.....	23
4.3. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura.....	24
4.4 Análises estatísticas.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Etapa 1: Avaliação físico-química, antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos	26
5.1.1. Caracterização físico-química	26
5.1.2. Caracterização por CLAE	29
5.1.3. Atividade antimicrobiana	37
5.1.4. Avaliação da citotoxicidade dos extrato de própolis.....	39
5.2 Etapa 2: Avaliação do crescimento bacteriano, infecções celulares e morfologia em microscopia eletrônica de varredura	41
5.2.1. Avaliação do crescimento bacteriano na presença de própolis – “Time Kill Curve”	42
5.2.2. Adesão celular	44
5.2.2.1. Determinação do tempo de adesão	44
5.2.2.2. Pré-tratamento com própolis.....	44
5.2.2.3. Tratamento com própolis.....	45
5.2.3. Invasão celular	47
5.2.3.1. Determinação do tempo de invasão.....	47
5.2.3.2. Pré-tratamento	47
5.2.3.3. Tratamento.....	48

5.2.4 Avaliação da morfologia bacteriana por microscopia eletrônica de varredura	49
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Devido ao uso prolongado e indiscriminado de antibióticos, há uma pressão seletiva exercida por esses fármacos favorecendo a emergência de bactérias resistentes a vários antimicrobianos. Dentre os mecanismos de resistência destacam-se as mutações cromossômicas e a aquisição de genes de resistência a antimicrobianos por conjugação (TAVARES et al., 2013). Para evitar o uso abusivo de antimicrobianos no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou a prescrição e dispensação destes medicamentos (BRASIL, 2011).

Antimicrobianos naturais geralmente possuem uma complexa composição química que dificulta o desenvolvimento de cepas resistentes, maior segurança e baixo custo sendo uma alternativa interessante para novos tratamentos. Dentro deste contexto, considerando o uso popular consolidado da própolis, esta se torna uma opção interessante para o estudo e desenvolvimento de um medicamento antimicrobiano.

1.1. Própolis - Um breve histórico

A palavra própolis deriva do grego onde *pro* significa para ou em prol e *polis* comunidade. De fato as abelhas a utilizam para proteger a colmeia, reparar frestas e embalsamar a carcaça de invasores. A própolis utilizada comercialmente geralmente é coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* e formada por material resinoso e balsâmico dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores, além das secreções salivares das mesmas (PEREIRA; SEIXAS; DE AQUINO NETO, 2002). É composta por mais de 300 constituintes, como flavonoides, terpenos, óleos essenciais e resinas. Apesar disto, suas atividades biológicas estão associadas principalmente à presença de fenilpropanóides (DE VECCHI; DRAGO, 2007).

Desde a antiguidade a própolis já era utilizada pela medicina popular, os egípcios, por exemplo, a utilizavam para embalsamar mortos, os gregos e romanos a aplicavam em feridas e contusões. Na Idade Média foi utilizada como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e pelos Incas como um agente antipirético. Finalmente, a partir do século XVII a própolis se tornou muito popular na Europa devido a sua atividade antibacteriana (TORETI et al., 2013). Na África do Sul, no século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes. Já

no século XX, durante a Segunda Guerra Mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas. Além disso, a antiga URSS utilizou a própolis tanto em medicina humana como veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose. Atualmente, além do uso na medicina popular, a própolis é empregada em alimentos e cosméticos (PEREIRA; SEIXAS; DE AQUINO NETO, 2002).

1.2. Os diferentes tipos de própolis

A composição química da própolis é influenciada principalmente pelas condições climáticas e flora visitada pelas abelhas para sua elaboração (BANKOVA et al., 1998; KRÓL et al., 2013). Isto faz com que seja possível a obtenção de diferentes tipos de própolis como dourada, amarela, verde, vermelha e marrom. Devido a grande biodiversidade brasileira já foram encontradas diversos tipos de própolis no território nacional, e embora seja difícil uma padronização, atualmente a própolis brasileira está classificada em 13 grupos que variam de acordo com o local de coleta e a composição química (MACHADO et al., 2016). Devido às diferenças na composição química da própolis, as atividades biológicas podem variar conforme a região de coleta da mesma. (TORETI et al., 2013).

A própolis verde é produzida no cerrado, rica em derivados prenilados do ácido p-cumárico e tem como origem botânica principal o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Isto foi comprovado tanto pela observação de colmeias produtoras, como pelo perfil químico dos extratos produzidos a partir das folhas de *Baccharis* e da própolis verde, onde foi possível identificar os derivados prenilados do ácido p-cumárico característicos desta própolis (SHIGENORI et al., 2006). A própolis verde pode ser encontrada na região sul de Minas Gerais e em algumas cidades do interior do estado de São Paulo. Dentre os constituintes geralmente presentes destacam-se drupanina, crisina, pinocembrina, ácido p-cumárico, artepillin C e bacharina (TORETI et al., 2013). Muitas atividades biológicas já foram atribuídas a própolis verde como antioxidante, antitumoral, antiúlcera, imunomoduladora e antimicrobiana. Por esse motivo, existe um interesse muito grande nesta matéria-prima e já há disponíveis no mercado diversos produtos alimentícios com esta própolis que visam promover a saúde (SILVA et al., 2008).

A própolis vermelha é proveniente de colmeias localizadas no caule dos

arbustos de manguezais, situados no nordeste do Brasil destacando-se os estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia. Sua origem botânica é atribuída a *Dalbergia ecastophyllum*, sendo que os principais constituintes da própolis vermelha são os isoflavonóides (BATISTA et al., 2012; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Devido à rica presença de flavonoides, são atribuídas a este tipo de própolis as atividades antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (ALENCAR et al., 2007).

A própolis denominada dourada ainda não possui uma origem botânica definida e não foram encontrados na literatura indexada para este trabalho estudos sobre suas composição e atividades biológicas.

1.3. Atividades biológicas atribuídas à própolis

Existem diversos trabalhos que comprovam as atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumoral, anestésica e antioxidante da própolis.

A maioria dos estudos de atividade antimicrobiana foi conduzida utilizando testes clássicos *in vitro* como micro ou macrodiliuição em caldo e difusão de disco contra cepas patogênicas. O teste de difusão de disco é realizado semeando em meio de cultura sólido a bactéria de interesse e colocando-se em contato um disco de papel que contém o agente antimicrobiano. O halo formado entre o disco e o crescimento bacteriano determina a atividade antimicrobiana. Já nos testes de micro ou macrodiliuição é feita diluição em série do antimicrobiano em meio de cultura líquido e posteriormente adiciona-se o microrganismo teste. O resultado é dado de acordo com a menor concentração necessária para inibição do crescimento do microrganismo. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) disponibiliza manuais com estes métodos padronizados para avaliação da atividade antimicrobiana, sendo reconhecido e utilizado em todo o mundo (CLSI, 2012).

O efeito hepatoprotetor da própolis foi comprovado em cultura de células e em experimentos com animais que foram submetidos à hepatite. Também foram relatados efeitos antitumorais tanto em cultura de células como em animais que tiveram um tecido carcinogênico implantado, mostrando que os compostos fenólicos foram mais tóxicos contra células tumorais (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001).

Rocha et al. (2013) também demonstraram a atividade antioxidante da própolis tanto no extrato alcoólico tradicional como no aquoso, sugerindo que o uso deste produto pode auxiliar a prevenir doenças provocadas pelos radicais livres.

Com relação ao efeito anti-inflamatório há diversos mecanismos já descritos, indicando que ocorre diminuição da infiltração de células inflamatórias, supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos e modulação da cascata do ácido araquidônico (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001).

Barrientos et al. (2013) realizaram um estudo com 20 amostras de própolis provenientes de diversos produtores apícolas das regiões do sul e central do Chile contra cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, utilizando o método de microdiluição em caldo. Os autores concluíram que todos os extratos eram capazes de inibir o crescimento das cepas de *Streptococcus* sp., porém as concentrações variaram para cada um dos extratos utilizados, mostrando a necessidade de padronização dos extratos e da metodologia de análise.

Nascimento et al. (2013) validaram o método de macrodiluição em caldo e difusão de disco com modificações para avaliar a atividade antimicrobiana da própolis. Neste estudo foram utilizados *Staphylococcus aureus* como representante do grupo de gram-positivos, *Pseudomonas aeruginosa* como representante do grupo de gram-negativos e *Streptococcus pneumoniae* que também é um gram-positivo, porém fastidioso. Foi mostrado que estes métodos clássicos podem ser utilizados para o estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis.

Scazzocchio et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis contra 263 cepas bacterianas de isolados clínicos sendo 140 *Staphylococcus* spp. (35 *S. aureus*, 63 *S. epidermidis*, 7 *S. hominis*, 18 *S. haemolyticus*, 10 *S. warnerii*, 4 *S. capitis*, 3 *S. auricularis*), 64 *Streptococcus* spp. (30 *S. viridans*, 15 *S. β -haemolyticus*, 19 *S. pneumoniae*) e 59 *Enterococcus faecalis*, os autores puderam verificar a ação antimicrobiana da própolis em duas situações: em sinergismo com os antibióticos ampicilina, gentamicina e estreptomicina, diminuindo a concentração inibitória mínima dos mesmos e também como droga única de escolha.

Finalmente, dentre os estudos realizados com própolis, foi demonstrado que esta possui maior atividade antimicrobiana contra microrganismos gram-positivos do que contra gram-negativos. Além disso, foram testados compostos isolados mostrando que estes também possuem ação antimicrobiana (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

1.4. Propriedades biológicas de compostos isolados presentes na própolis

Há vários estudos que correlacionam às atividades biológicas da própolis com a sua composição química. A pinocembrina, por exemplo, possui atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e neuroprotetora. Sua atividade antitumoral foi demonstrada em células de câncer do cólon e está relacionada à indução da perda de potencial de membrana mitocondrial com a liberação de citocromo C e a ativação de caspase-3 e -9 (CZYŻEWSKA et al., 2016). Também foram realizados estudos com as bactérias *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *S. lentus*, e *Klebsiella pneumoniae* observando-se alterações na composição de membrana e lise celular. Além disso, nos microrganismos *S. aureus*; *E. coli*, *Candida albicans*, *B. subtilis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Streptococcus mutans*, *Neisseria gonorrhoeae* houve inibição enzimática da glucosiltransferase. Nos fungos como *Penicillium italicum* e *C. albicans* a pinocembrina interferiu na homeostase energética e causou danos na membrana celular (RASUL et al., 2013). Ainda, a pinocembrina possui atividade antimicrobiana contra *Streptococcus sp.* e o ácido p-cumarico e artepillin C contra *Helicobacter pylori* (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

O artepillin C também foi testado isoladamente contra 18 microrganismos, incluindo fungos e bactérias. A atividade antimicrobiana variou de 7,8 a 500µg/ml, sendo que dentre os patógenos estudados houve importante atividade contra *Microsporum gypseum*, *Arthroderma benhamiae*, *B. subtilis*, *Corynebacterium equi*, *Micrococcus lysodeikticus*, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Thermoactinomyces intermedius* (AGA et al., 1994).

Foi avaliada a atividade antimicrobiana da formononetina contra as bactérias gram-positivas *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, gram-negativa *P. aeruginosa* e fungos *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. O composto teve ação antimicrobiana frente a todos patógenos avaliados, principalmente contra os fungos, apresentando concentração inibitória de apenas 25µg/ml (DAS NEVES et al., 2016).

A atividade antitumoral dos compostos apigenina, pinocembrina, crisina, e galangina foi demonstrada pela inibição da proliferação de quatro linhagem de

células tumorais sendo células de câncer da mama MCF-7 e MDA-MB-231, câncer de pulmão A549 e células de câncer do cólon humano HeLa. O principal mecanismo de inibição está relacionado a apoptose por ativação da caspase 3 e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (XUAN et al., 2016).

Além disso, a galangina e o ácido p-cumárico exerceram efeitos inibidores do crescimento de células CAL-27, uma linhagem tumoral de células da língua humana. A crisina foi relatada como um agente potente para induzir a apoptose em muitas linhagens de células tumorais através da ativação de caspases e supressão de proteínas anti-apoptóticas. Ainda sobre a atividade antitumoral, relatou-se que o ácido cafeico induziu a apoptose de células cancerígenas do pulmão e também apresentou efeitos antiproliferativos contra células cancerígenas do cólon e fibrosarcoma (CZYŻEWSKA et al., 2016).

Também foi reportada a crisina atividade anti-inflamatória. Em experimento realizado com lesão medular em ratos, a crisina foi capaz de inibir NF- κ B p65, TNF- α , IL-1 β , IL-6, bem como os níveis de óxido nítrico (JIANG et al., 2014).

Krol et al. (1996) atribuem como principal mecanismo de ação anti-inflamatório da própolis o sequestro de radicais livres gerados pelos neutrófilos durante a inflamação, sendo que esse processo também auxilia na regeneração do tecido lesado. O autor verificou a capacidade de 19 compostos isolados da própolis em sequestrar radicais livres, concluindo que todos estes apresentaram atividade antioxidante, alguns inibiram em 100% os radicais e outros tiveram uma atividade menor com apenas 5% de inibição. As substâncias estudadas foram ácido salicílico, ácido cafeico, 3,4-dimetoxi-cinâmico, ácido isoferúlico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácidos o- m- e p-cumárico, ácido gálico, crisina, apigenina, acacetina, galangina, kaempferol, kaempferida e quercetina.

A aromadendrina possui atividade antioxidante comprovada em experimentos conduzidos com células embrionárias de rim (HEK-293). Este composto foi capaz de neutralizar a elevação de radicais livres de oxigênio induzida pelo oxidante hidroperóxido de t-butilo (FUNARI et al., 2011). Semelhantemente, estudos conduzidos com células da retina (RGC-5) mostraram a capacidade antioxidante dos compostos 3,4-dicafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico, ácido cafeico, artemillin C e drupanina em inibir os radicais livres peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila (NAKAJIMA et al., 2009).

Além disso, em lesão celular induzida por tetracloreto de carbono em cultura de hepatócitos de rato, os derivados do ácido dicafeoilquinico mostraram ação hepatoprotetora (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001).

Com relação à atividade imunomodulatória, estudos realizados com macrófagos mostraram que o ácido cafeico e os derivados do ácido dicafeoilquinico aumentaram a mobilidade dessas células, o que pode contribuir para a resposta imunológica (TATEFUJI et al., 1996).

1.5. Uso clínico da própolis

Um dos principais usos clínicos da própolis está associado à prevenção e tratamento das infecções do trato respiratório. A microbiota da cavidade oral e vias aéreas superiores é bastante diversificada destacando-se os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma* e outros. Quando há supressão ou redução da microbiota normal da região, há o aparecimento das espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Considerando a presença desses microrganismos no ambiente a pneumonia nosocomial é frequentemente causada por bactérias não residentes, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *P.aeruginosa* e *S. aureus*, enquanto que a pneumonia bacteriana adquirida na comunidade é normalmente causada por patógenos que residem na mucosa orofaríngea (BANSAL et al., 2013).

Com relação aos ensaios clínicos, a atividade da própolis em infecções do trato respiratório também já foi relatada. Em um estudo duplo cego realizado em Israel com 430 crianças entre um e cinco anos de idade, metade recebeu um placebo e a outra uma preparação herbal contendo extrato de *Echinacea*, própolis e vitamina C durante 12 semanas. Ao final, foi possível observar que esta preparação contendo própolis foi capaz de diminuir em média 50% das ocorrências de infecções do trato respiratório, bem como o tempo de convalescência da doença (COHEN et al., 2004). Embora neste trabalho a própolis não tenha sido a única escolha de tratamento, o tamanho do grupo utilizado para o estudo (430 crianças) e as evidências da atividade antimicrobiana *in vitro* sugerem que esta realmente contribuiu na prevenção das infecções e que possa ser utilizada no futuro como um medicamento em infecções respiratórias.

Além da atividade antimicrobiana, a própolis também auxilia na recuperação de diversas doenças respiratórias devido a sua ação anti-inflamatória. O extrato aquoso de própolis foi administrado em pacientes adultos diagnosticados com asma, onde foi capaz de diminuir a frequência de ataques noturnos e aumentar a capacidade respiratória. Além disso, foram mensurados parâmetros imunológicos como citocinas e eicosanoides, mostrando que a própolis diminuiu citocinas pro-inflamatórias, prostaglandinas E2 e leucotrienos (KHAYYAL et al., 2003).

1.6. Mecanismo da ação antimicrobiana da própolis

Apesar do uso tradicional da própolis, há necessidade de estudos para elucidar seu mecanismo de ação. A literatura mostra que a atividade antimicrobiana da própolis está relacionada principalmente a bactérias gram-positivas e atribuída a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos. Apesar disto, ainda não se conhece uma relação entre a estrutura dessas substâncias e a atividade antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001).

Alguns autores acreditam que ocorre um sinergismo entre os flavonoides, ácidos fenólicos e seus derivados. Há evidências de que constituintes da própolis podem interferir no processo de divisão celular bacteriana através da desorganização do citoplasma causando lise celular (MACHADO et al., 2016).

1.7. Estudos em cultura de células eucarióticas

Existe a demanda da sociedade civil para a diminuição do uso de animais em pesquisas e no Brasil foi implantado a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) representando um estímulo para o uso de ensaios alternativos em substituição aos animais (BRASIL, 2012). A cultura *in vitro* de células eucarióticas é o principal modelo para esta substituição. Há muitas vantagens no uso de cultura de células, destacando-se o controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia de recursos financeiros (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2010).

Durante o processo infeccioso a adesão e invasão da célula hospedeira são etapas fundamentais para o sucesso da infecção, e faltam informações na literatura sobre a possível influência da própolis neste processo. Os trabalhos sobre o efeito

da própolis em cultura de células geralmente estão associados às ações anti-inflamatória e citotóxica, com destaque às atividades biológicas da própolis verde. Szliszka et al. (2013) realizaram um estudo com macrófagos e extrato alcoólico de própolis verde com concentrações entre 5 e 50µg/mL e foram comprovadas as atividades antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica. Um dos componentes ativos da própolis verde é o artepillin C e naquele estudo foi mostrado que esta substância isolada adicionada a cultura de macrófagos foi capaz de eliminar radicais livres e inibir a produção de várias citocinas.

Umthong et al. (2011) avaliaram a atividade antitumoral da própolis proveniente da Tailândia em estudos *in vitro* com cinco linhagens diferentes de células tumorais (Chago, KATO-III, SW620, BT474 e Hep-G2) e duas linhagens não tumorais (fibroblasto HS27 e CH-fígado). A viabilidade celular foi mensurada utilizando o teste de brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazlio (MTT), e os autores relataram que houve inibição da proliferação apenas das células tumorais.

Devido às propriedades atribuídas à própolis e sabendo que as mesmas podem variar em sua composição, neste trabalho foram selecionadas amostras de própolis verde, vermelha e dourada para o estudo da composição e atividade antimicrobiana.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do amplo uso da própolis na medicina popular, faltam informações sobre seu mecanismo de ação, o que dificulta sua aplicação como medicamento. Além disso, extratos de própolis podem ser importantes economicamente e permitir o desenvolvimento de um tratamento alternativo contra infecções bacterianas do trato respiratório.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar a composição físico-química e a atividade antibacteriana dos extratos de própolis verde (EPVD), vermelha (EPVM), dourada (EPD) e extrato comercial padronizado (EPP-AF®) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49.619 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10.031, bem como verificar o comportamento da própolis na prevenção e tratamento de infecções induzidas em cultura de células.

3.2. Objetivos específicos

- Preparo dos extratos de própolis verde (EPVD), vermelha (EPVM) e dourada (EPD);
- Caracterização físico-química dos extratos;
- Avaliação da atividade bactericida dos extratos de própolis contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae* pelo método de microdiluição em caldo;
- Avaliação da citotoxicidade da própolis em células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2);
- Estudo da interferência da própolis na adesão e invasão bacteriana em cultura de células HEp-2.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

Este estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira foi realizada uma triagem para verificar a composição físico-química dos EPD, EPVD, EPVM e EPP-AF®, a atividade antimicrobiana de cada um dos extratos contra as bactérias *S.aureus*, *S.pneumoniae* e *K.pneumoniae* e ensaios de citotoxicidade nas células HEp-2. Na segunda etapa foi selecionado um dos extratos e realizada a “time kill curve” das bactérias supracitadas na presença de própolis, estudo da influencia da própolis na adesão e invasão dessas bactérias em células HEp-2 e avaliação da morfologia das mesmas na presença de própolis utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura.

4.1. Etapa 1: Avaliação da composição físico-química, atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos

4.1.1. Obtenção dos extratos de própolis

As matérias primas utilizadas nessa pesquisa foram doadas pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda., assim como o extrato comercial EPP-AF® (patente PI 0405483-0, Revista de Propriedade Industrial No. 1778 de 01/02/2005). As própolis verde, dourada e vermelha foram devidamente trituradas em moinho de facas, tamizadas a 1,7mm e colocadas em um recipiente juntamente com solução hidroalcoólica entre 70 e 80%, conforme Park e Ikegaki (1998). A proporção utilizada inicialmente foi de 1:3 (própolis : solução hidroalcoólica). Essa mistura foi submetida à agitação mecânica intermitente por 8 horas e após a decantação, o extrato de própolis foi filtrado em papel de filtro simples e em membrana com poro de 0,45µm, a fim de esterilizar os extratos. Semelhante, foi feito uma segunda extração com a massa de própolis retida no filtro, porém utilizou-se a proporção de 1:2 (própolis : solução hidroalcoólica). Novamente o extrato foi filtrado sob as mesmas condições e misturou-se as duas frações. Finalmente, os extratos foram padronizados para que o teor alcoólico estivesse entre 60 e 70°GL e sólidos solúveis em aproximadamente 11% p/v.

4.1.2. Caracterização físico-química

Para cada um dos extratos foram dosadas as quantidades de sólidos solúveis, flavonoides, fenóis e perfil químico por cromatografia líquida de alta performance (CLAE). As análises foram realizadas logo após a obtenção dos extratos, tempo 0 (T0) e após 18 meses de estocagem (T18) a $24 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ ao abrigo da luz.

4.1.2.1. Dosagem de sólidos solúveis

Pesou-se em vidro relógio uma massa conhecida de extrato de própolis e posteriormente esta foi seca em estufa a temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 150 minutos. A amostra foi transferida para um dessecador e o peso avaliado. O processo de secagem e pesagem foi repetido por no mínimo mais um intervalo de 30 minutos até obter-se peso constante (FERRO; FUNARI, 2006).

4.1.2.2. Dosagem de fenóis

Foi realizada diluição de 1:100 do extrato em água purificada e posteriormente uma alíquota de 1ml foi transferida para balão de 50ml contendo 10ml de água purificada, 2,5ml do reagente de Folin-Denis e 5 mL da solução de carbonato de cálcio saturado 35% p/v. Completou-se o volume com água e essa solução foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, por exatamente 30 minutos. Após, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (UVmini-1240 spectrophotometer-Shimadzu, Tokyo, Japan) no comprimento de onda de 760 nm. A absorbância obtida foi comparada com uma solução padrão de ácido gálico a 0,005mg/ml (FERRO; FUNARI, 2006).

4.1.2.3. Dosagem de flavonóides

Foi realizada diluição de 1:10 do extrato em metanol P.A. (Synth) e posteriormente uma alíquota de 0,4ml dessa solução foi submetida a reação com 0,5ml de cloreto de alumínio a 5% p/v em metanol. Essa solução foi deixada em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e após foi feita leitura em espectrofotômetro (UVmini-1240 spectrophotometer-Shimadzu, Tokyo, Japan) no comprimento de

425nm. A absorbância obtida foi comparada com uma solução padrão de quercetina a 0,2mg/ml conforme descrito por Woisky (1996).

4.1.2.4. Caracterização Química por CLAE

As análises cromatográficas dos extratos de própolis foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Prominence) equipado com controlador CBM – 20 A, uma bomba quaternária modelo LC-20AT, detector com arranjo de diodos modelo SPD-M20A e software LC-Solution Multi-PDA. Foi utilizada coluna Shim-Pack CLC-ODS (C₁₈), Shimadzu 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 µm, diâmetro de poro de 100 Å. Foi utilizada fase móvel com gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, pH 2,7, fluxo de 0,8ml/minuto, detecção em 275nm e tempo de corrida de 70 minutos (ROCHA et al., 2012).

O preparo da amostra foi realizado dissolvendo aproximadamente 200 mg dos extratos em balão de 10ml com 5ml metanol (J.T.Baker grau HPLC) e completou-se o volume com ácido fórmico 0,1% v/v. Posteriormente a amostra foi filtrada em membrana com poro de 45 µm e 10µl foi injetado para análise (ROCHA et al., 2012). Foram pesquisadas a presença de: compostos fenólicos derivados do cafeoilquínico, ácido caféico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, aromadendrina, drupanina, isosakuranetina, kaempferol, quercetina, rutina, formononetina, pinocembrina, crisina, galangina, artemillin C e bacharina (GARDANA et al., 2007).

4.1.3. Atividade antimicrobiana

Foi estudada a atividade antimicrobiana dos diversos extratos de própolis frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49.619 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10.031. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida com base na metodologia de microdiluição em caldo descrita pelo CLSI documento M07-A9 (2012) com algumas modificações.

Utilizando-se placa de 96 poços foi feita a diluição seriada dos extratos em Mueller Hinton caldo (MHC, Difco) para avaliação da CBM de *S.aureus* e *K.pneumoniae* e MHC com 5% de sangue de cavalo (Ebe-Farma) para *S.pneumoniae*. Após, adicionou-se 5.10⁵ bactérias/ml e as placas foram incubadas a

36 $\pm$ 1°C de 16 a 20 horas. Após este período uma alíquota de 10 μ l de cada poço foi adicionada em placa contendo meio sólido Müeller Hinton agar (MHA, Difco) para avaliação da CBM das bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* e incubadas a 36 $\pm$ 1°C por 24 horas. Para a bactéria *S.pneumoniae* as alíquotas de 10 μ l foram adicionadas em agar sangue e as placas incubadas em jarra anaeróbica com gerador para microaerofilia (Probac) na temperatura de 36 $\pm$ 1°C por 24 horas. O controle foi obtido substituindo-se os extratos de própolis por uma solução hidroalcoólica a 70% submetida ao mesmo processo de diluição.

4.1.4. Cultivo celular

Para o estudo em cultura de células foi utilizada a HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humano), gentilmente doadas pelo professor Dr. Eurico de Arruda Neto do Laboratório de Patogênese Viral do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂, utilizou-se como meio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias até que houvesse 70% de confluência na garrafa para cultura de células. As células foram desprendidas da garrafa utilizando-se tripsina (Sigma-Aldrich) diluída 10 vezes em PBS (phosphate buffered saline) na temperatura de 37°C por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer e 10⁵ células/poço foram transferidas para placas de cultura de tecidos com 12mm de diâmetro e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂. O meio foi removido e as células lavadas duas vezes com tampão PBS (GOMES et al., 2012).

4.1.5. Avaliação da citotoxicidade da própolis

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, foram adicionadas às culturas de células extrato de própolis nas concentrações de 20 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml e 500 μ g/ml em sólidos solúveis. Para a obtenção dessas soluções, os extratos foram diluídos 1:10 em dimetilsulfóxido P.A. (DMSO, Sigma-Aldrich) e posteriormente no meio DMEM até a concentração desejada. O controle foi obtido

substituindo-se os extratos de própolis por uma solução hidroalcoólica a 70% submetida ao mesmo processo de diluição.

Após adição dos extratos, as células foram incubadas por 2 e 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂, foi feita quantificação de células viáveis pela contagem em câmara de Neubauer utilizando uma solução a 0,4% do corante azul de tripan (Sigma-Aldrich) que colore apenas células mortas, pois estas não são capazes de excluir o corante. Além de avaliar a morte celular, também foi comparada a morfologia das células em relação ao controle não tratado.

4.2 Etapa 2: Avaliação do crescimento bacteriano, infecções celulares e morfologia em microscopia eletrônica de varredura

4.2.1. Avaliação do crescimento bacteriano (curva de morte ou “time kill curve”) na presença de própolis

Foi avaliada a “time kill curve” das bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* na ausência e presença de EPVD nas concentrações de 20µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml em sólidos solúveis. As soluções foram preparadas diluindo-se os extratos de própolis em MHC (Difco) para *S.aureus* e *K.pneumoniae* e MHC com 5% de sangue de cavalo (Ebe-Farma) para *S.pneumoniae*. O controle foi preparado da mesma maneira, substituindo-se o extrato de própolis por solução hidroalcoólica a 70%.

Após obtenção das soluções de própolis e controle nos meios de cultura, foram adicionadas 1.10⁶ UFC/ml de cada uma das bactérias estudadas e as amostras foram incubadas a 36 ±1°C. Foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 2, 6 e 24 horas e realizada contagem de UFC/ml através da diluição seriada em PBS e posterior semeadura em MHA para *S.aureus* e *K.pneumoniae* e agar sangue para *S.pneumoniae*. O agar sangue foi preparado adicionando-se 5% de sangue de carneiro (Ebe-Farma) no meio MHA (Difco). As placas de MHC foram incubadas a 36 ±1°C por 24 horas e as de agar sangue a 36 ±1°C em microaerofilia por 24 horas.

4.2.2. Adesão celular

4.2.2.1. Determinação do tempo de adesão

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, foram adicionadas 1×10^7 bactérias/poço, ou seja, 1:100 células:bactérias e a placa foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ durante 30 minutos, 1 e 2 horas. Após, as células foram lavadas com PBS duas vezes e tripsinizadas. Foi feita diluição em série (100µl:900µl) até 10⁻⁸ em PBS e uma alíquota de 10µl de cada diluição foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias aderidas.

4.2.2.2. Pré-tratamento com própolis

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, foi adicionado extrato de EPVD na concentração de 100µg/ml, bem como controle utilizando solução hidroalcoólica a 70%. As diluições foram preparadas conforme descrito no item 4.1.5. As culturas foram incubadas por duas horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂.

Em seguida, as células foram infectadas na proporção de 1:100, ou seja, 1×10^7 bactérias/poço e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante uma hora para *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae*, e durante duas horas para *S.aureus*. Após, as células foram lavadas com PBS duas vezes e tripsinizadas (GOMES et. al, 2012).

Foi feita diluição em série (100µl:900µl) até 10⁻⁸ utilizando PBS e uma alíquota de 10µl de cada diluição foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias viáveis aderidas. Para as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* foi utilizado MHA e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, já para *S.pneumoniae* utilizou-se agar sangue e as placas foram incubadas em microaerofilia a 36°C por 24 horas.

4.2.2.3. Tratamento com própolis

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, as mesmas foram infectadas na proporção de 1:100, ou seja, 1×10^7 bactérias/poço e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante uma hora para *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae*, e durante duas horas para *S.aureus* (GOMES et al., 2012).

Após, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado o controle e EPVD na concentração de 100µg/ml. As diluições foram preparadas conforme descrito no item 4.1.5. A cultura foi incubada por 6 horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS duas vezes e tripsinizadas. Foi realizada diluição em série (100µl:900µl) até 10⁻⁸ em PBS e uma alíquota de 10µl foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias viáveis aderidas. Para as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* foi utilizado MHA e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, já para *S.pneumoniae* utilizou-se agar sangue e as placas foram incubadas em microaerofilia a 36°C por 24 horas.

4.2.3. Invasão celular

4.2.3.1. Determinação do tempo de invasão

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, foi adicionado 1x10⁷ bactérias/poço, ou seja, 1:100 células:bactérias e a placa foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ durante 2, 3 e 4 horas. Após, as células foram lavadas com PBS duas vezes e foram adicionados 500µL de meio DMEM com gentamicina a 1mg/ml. As culturas foram incubadas por uma hora a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi descartado e as células lavadas com PBS duas vezes. Foram adicionados 200µL de PBS com triton a 0,1% e foi realizada diluição em série (100µl:900µl) até 10⁻⁸ utilizando PBS. Uma alíquota de 10µl de cada diluição foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias invasoras. Para as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* foi utilizado MHA e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, já para *S.pneumoniae* utilizou-se agar sangue e as placas foram incubadas em microaerofilia a 36°C por 24 horas.

4.2.3.2. Pré-tratamento

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, foi adicionado o controle e EPVD na concentração de 100µg/ml. As diluições foram preparadas conforme já descrito no item 4.1.5. As placas foram incubadas por duas horas.

As células foram infectadas na proporção de 1:100, ou seja, adicionou-se $1,0 \times 10^7$ bactérias/poço (GOMES et al., 2012). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante três horas.

Posteriormente as células foram lavadas com PBS duas vezes e adicionou-se 500µL de meio DMEM com gentamicina a 1mg/ml. A placa foi incubada por uma hora a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi descartado e as células lavadas com PBS duas vezes. Adicionou-se 200µL de PBS com triton a 0,1% e foi realizada diluição em série (100µl:900µl) até 10^{-8} utilizando PBS. Uma alíquota de 10µl de cada diluição foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias invasoras. Para as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* foi utilizado MHA e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, já para *S.pneumoniae* utilizou-se agar sangue e as placas foram incubadas em microaerofilia a 36°C por 24 horas.

4.2.3.3. Tratamento

Após obtenção das culturas celulares conforme item 4.1.4, as células foram infectadas na proporção de 1:100, ou seja, adicionou-se $1,0 \times 10^7$ bactérias/poço (GOMES et al., 2012). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante três horas.

Após, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado o controle e EPVD na concentração de 100µg/ml. As diluições foram preparadas conforme já descrito no item 4.1.5. As placas foram incubadas por seis horas.

Posteriormente as células foram lavadas com PBS duas vezes e adicionou-se 500µL de meio DMEM com gentamicina a 1mg/ml. A placa foi incubada por uma hora a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi descartado e as células lavadas com PBS duas vezes. Adicionou-se 200µL de PBS com triton a 0,1% e foi realizada diluição em série (100µl:900µl) até 10^{-8} utilizando PBS. Uma alíquota de 10µl de cada diluição foi adicionada em meio sólido para contagem de bactérias invasoras.

Para as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* foi utilizado MHA e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, já para *S.pneumoniae* utilizou-se agar sangue e as placas foram incubadas em microaerofilia a 36°C por 24 horas.

4.3. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura

Foram preparadas suspensões nas concentrações de 5×10^5 UFC/ml das bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* previamente reativadas por 24 horas. Adicionou-se a estas suspensões uma lamínula de vidro e EPVD na concentração bactericida para cada uma das cepas. Estas suspensões foram incubadas por 18 – 24 horas. O controle foi preparado da mesma maneira, porém foi utilizado solução hidroalcoólica a 70% em substituição à própolis.

Após o período de incubação, as lamínulas de vidro foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) com suporte da equipe técnica do laboratório multiusuário de microscopia eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Para isso as mesmas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 e fixadas por duas horas com glutaraldeído 3% e tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foi realizada desidratação gradual em álcool 30%, 50%, 70% e 100%, com ciclos de 15 minutos cada.

As lamínulas foram secas em Critical Point Dryer (Bal-Tec, CPD 030) e revestidas com ouro. A MEV foi realizada no equipamento Jeol JSM -6610 LV com voltagem de aceleração entre 20 e 25kV.

4.4 Análises estatísticas

Os valores obtidos correspondentes das triplicatas realizadas nas análises físico-químicas de sólidos solúveis, teores de fenóis e flavonoides totais foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão e avaliados pelo modelo estatístico ANOVA one-way e teste de Bonferroni, considerando nível crítico de $p < 0,05$ (95%). A análise da atividade antimicrobiana, citotoxicidade e “time kill curve” foram avaliadas pelo modelo estatístico ANOVA two-way e teste de Bonferroni, considerando nível crítico de $p < 0,05$ (95%). Para os ensaios de adesão e invasão celular, foi utilizado o teste t de Student considerando nível crítico de $p < 0,05$ (95%) para determinar diferença estatística entre os grupos controle e tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Etapa 1: Avaliação físico-química, antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos

5.1.1. Caracterização físico-química

Para cada um dos extratos foram dosados sólidos solúveis, fenóis e flavonoides totais. Os resultados estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Características físico-químicas dos diferentes extratos de própolis.

Extrato de própolis	Sólidos solúveis (%p/v)	^a Fenóis * (mg/ml)	^b Flavonoides * (mg/ml)
Dourada	11,16 ± 0,10	18,51 ± 0,07	7,42 ± 0,23
Verde	11,63 ± 0,10	20,07 ± 0,01	6,27 ± 0,25
Vermelha***	9,72 ± 0,20	14,99 ± 0,05	9,76 ± 0,10
EPP-AF®	11,31 ± 0,05	19,26 ± 0,02	5,00 ± 0,01

*** Indica que houve forte diferença estatística apenas para o extrato de própolis vermelha; * indica que houve diferença estatística entre todos os extratos estudados, conforme ANOVA one-way, teste de Bonferroni, $p < 0,05$. ^a Fenóis expressos em ácido gálico; ^b Flavonoides expressos em quercetina.

Os extratos de própolis no Brasil são fiscalizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001 do MAPA preconiza que os extratos de própolis contenham mínimo de 11% p/v de sólidos solúveis, mínimos de 4,6mg/ml de fenóis totais e 2,3mg/ml de flavonoides totais. Com relação aos sólidos solúveis, apenas o extrato de EPVM estava fora da especificação exigida, porém é importante destacar que esta matéria prima é relativamente nova, sendo possível que a quantidade de sólidos solúveis de 11% p/v não seja a mais indicada para sua caracterização. Já as quantidades de flavonoides totais e fenóis totais de todos os extratos estão adequadas e muito acima do mínimo exigido.

A literatura evidencia que as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana atribuídas à própolis se devem principalmente aos compostos fenólicos (MARCUCCI et al., 2001), sendo assim o EPVD com maior quantidade desses seria o mais promissor.

No entanto, dentro dos compostos fenólicos a classe dos flavonoides tem sido descrita como a mais importante pela atividade antimicrobiana da própolis (MARCUCCI et al., 2001) e o objetivo principal deste trabalho é encontrar qual extrato possui maior ação antibacteriana. Neste contexto, o EPVM merece destaque, pois apesar de apresentar o menor teor de fenóis totais, exibiu maior quantidade de flavonoides totais.

Com fim de verificar a estabilidade dos extratos obtidos, após 18 meses de armazenamento a temperatura de $24 \pm 2,5$ °C e ao abrigo da luz, foram repetidas as mesmas análises físico-químicas, conforme mostrado nas tabelas 2 a 4.

Tabela 2 – Teores de sólidos solúveis nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.

Extrato de própolis	Sólidos solúveis (%p/v)		Variação (%) em relação a T0
	T0	T18	
Dourada	11,16 $\pm$ 0,10	11,27 $\pm$ 0,10	0,98
Verde	11,63 $\pm$ 0,10	11,58 $\pm$ 0,10	0,42
Vermelha	9,72 $\pm$ 0,20	9,87 $\pm$ 0,16	1,54
EPP-AF®	11,31 $\pm$ 0,05	11,26 $\pm$ 0,05	0,44

Os resultados encontrados para sólidos solúveis foram satisfatórios, ou seja, todos os extratos mantiveram a proporção de sólidos solúveis, indicando que não houve perda dos compostos solúveis ou ainda evaporação do diluente durante o armazenamento.

Tabela 3 – Comparação da quantidade de compostos fenólicos totais nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.

Extrato de própolis	^a Fenóis (mg/ml)		Variação (%) em relação a T0
	T0	T18	
Dourada	18,51 $\pm$ 0,07	18,46 $\pm$ 0,06	0,27
Verde	20,07 $\pm$ 0,01	18,45 $\pm$ 0,02	8,07
Vermelha	14,99 $\pm$ 0,05	13,94 $\pm$ 0,04	7,00
EPP-AF®	19,26 $\pm$ 0,02	14,89 $\pm$ 0,01	22,69

^a Fenóis expressos em ácido gálico.

Atualmente os extratos de própolis são comercializados como alimentos apícolas, entretanto, devido as suas atividades biológicas há uma tendência de que no futuro sejam comercializados como medicamentos específicos, ou seja, produtos farmacêuticos, tecnicamente obtidos ou elaborados com finalidade profilática, curativa ou paliativa. Visando esta finalidade, é necessário que os extratos de própolis mantenham os teores das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas, no caso os fenóis, incluindo os flavonoides. No Brasil a ANVISA é responsável pela fiscalização dos produtos medicamentosos e preconiza que nos estudos de estabilidade a variação dos marcadores ativos e analíticos não ultrapasse de 10% (IN nº4 de 18/06/2014). Embora neste trabalho não tenha sido realizado um estudo completo de estabilidade, pode-se adotar este valor como um parâmetro para avaliar a qualidade dos extratos durante o armazenamento e conforme mostrado na tabela 3 houve uma redução importante no EPP-AF® (22,69%) indicando degradação dos compostos fenólicos.

Tabela 4 – Teores de flavonoides totais nos tempos 0 e 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz.

Extrato de própolis	^a Flavonoides (mg/ml)		Variação (%) em relação a T0
	T0	T18	
Dourada	7,42 ± 0,23	7,64 ± 0,20	2,96
Verde	6,27 ± 0,25	6,24 ± 0,20	0,47
Vermelha	9,76 ± 0,10	5,24 ± 0,07	46,31
EPP-AF®	5,00 ± 0,01	5,17 ± 0,01	3,40

^a Flavonoides expressos em quercetina.

Houve uma redução de 46,31% nos teores de flavonoides totais do EPVM, indicando degradação dessa importante classe de substâncias relacionada a atividade antimicrobiana da própolis. Além disso, essa variação está bem acima do intervalo indicado pela ANVISA nos estudos de estabilidade. É importante ressaltar que os extratos foram armazenados ao abrigo da luz em temperatura de 24°C e talvez para o EPVM, a temperatura de armazenamento deveria ter sido menor para evitar a degradação dos flavonoides. Conforme já discutido, essa própolis é relativamente nova e ainda carece de estudos que relatem as melhores condições de armazenamento.

Com base nos resultados obtidos nas caracterizações físico-químicas, o EPVM seria o mais promissor devido ao alto teor de flavonoides, porém a queda da quantidade dos mesmos compromete o uso desse extrato, e assim as EPVD e EPD possuem melhores perspectivas.

5.1.2. Caracterização por CLAE

A análise cromatográfica dos extratos revelou a presença de diversas substâncias com atividades biológicas. A figura 1 mostra a estrutura química dos compostos fenólicos encontrados.

Ácido cafeico

Ácido p-cumárico

3,5-dicafeoilquinico

4,5-dicafeoilquinico

Aromadenrina

Formononetina

Pinocembrina

Drupanina

Crisina

Galangina

Artepelin-C

Bacharina

Figura 1. Estrutura química dos compostos encontrados nos extratos de própolis. (Fonte: AGA et al.,1993; DAS NEVES et al.,2016; MARCUCCI et al.,2001; TORETI et al., 2013)

As análises cromatográficas dos extratos de própolis estão mostradas nas figuras de 2 a 5.

Figura 2: Perfil cromatográfico do extrato de própolis dourada; 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- aromadendrina, 4- pinocembrina, 5- crisina, 6- galangina e 7- bacharina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10 μ l do extrato de própolis dourada na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionaria coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida de 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013)

Apesar da origem botânica desconhecida da própolis dourada, o extrato apresentou diversos compostos fenólicos já descritos, especialmente associados à própolis europeia. As atividades biológicas destes compostos já foram apresentadas na introdução deste trabalho. Entretanto vale ressaltar que o ácido p-cumárico, galangina e pincembrina possuem atividades antimicrobianas contra diversos microrganismos (BANSKOTA; KADOTA; TEZUKA, 2001).

Figura 3: Perfil cromatográfico do extrato de própolis verde; 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- 3,5 dicafeoilquínico, 4- 4,5 dicafeoilquínico, 5- aromadendrina, 6- drupanina, 7- artepillin C e 8- baccarina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10 μ l do extrato de própolis verde na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida de 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013)

O EPVD possui como marcadores característicos o artepillin C e baccarina, que também podem ser encontrados na planta de origem *Baccharis dracunculifolia*, indicando a autenticidade da matéria-prima utilizada. Além disso, o ácido p-cumárico e o artepillin C possuem ação antimicrobiana e ambos estão presentes, o que torna este extrato interessante para os estudos da atividade antimicrobiana.

Figura 4. Perfil cromatográfico do extrato de própolis vermelha; 1- formononetina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10 μ l do extrato de própolis vermelha na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida de 70 minutos, fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013)

Não foi possível identificar os principais marcadores do EPVM no comprimento utilizado de 275nm, com exceção da formononetina que também está presente na planta de origem *Dalbergia ecastophyllum* e possui ação antimicrobiana. A propolis vermelha contém uma grande quantidade de flavonóides e apesar de não terem sido identificados os compostos que eluíram entre 40 e 50 minutos de corrida, a proximidade dos picos com o flavonóide formononetina, sugerem que estes também possam pertencer a esta classe com grande potencial antimicrobiano (MACHADO et al., 2016). Uma alternativa metodológica que poderia auxiliar na identificação dos compostos seria cromatografia acoplada a espectrofotometria de massas. Os resultados obtidos poderão ser comparados aos bancos de dados disponíveis. Alencar et al. (2007) utilizou a cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa para estudar a propolis vermelha brasileira e os compostos identificados em maior quantidade foram as isoflavonas medicarpina, homopterocarpina e 4,7-dimetoxi-2-isoflavonol, sendo que estes compostos possuem atividades antimicrobianas descritas.

Figura 5. Perfil cromatográfico do extrato de própolis EPP-AF®; 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- 3,5 dicafeoilquínico, 4- 4,5 dicafeoilquínico, 5- aromadendrina, 6- crisina, 7- artepillin C e 8- bacharina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10µl do extrato de própolis EPP-AF® na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionaria coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida de 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013).

O extrato comercial EPP-AF® é elaborado a partir de uma mistura composta principalmente de propolis verde e marrom, sendo possível detectar novamente a presença de bicharina e artepillin C, típicos da propolis verde, bem como outras substâncias que também apresentam atividades biológicas já descritas. Novamente, para a finalidade antimicrobiana os compostos ácido p-cumárico e artepillin C são os de maior interesse.

A fim de avaliar a estabilidade dos marcadores, após 18 meses foi realizada nova análise em CLAE, conforme mostrado nas figuras de 6 a 9.

Figura 6. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis dourada nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz. A curva superior indicada pela letra A se refere à análise realizada no tempo 0 e B após 18 meses, sendo 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- aromadendrina, 4- pinocembrina, 5- crisina, 6- galangina e 7- bacharina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10µl dos extratos de própolis dourada na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013).

Foi possível verificar a presença de todos os marcadores nos dois tempos, além da similaridade do perfil químico, mostrando a estabilidade deste extrato.

Figura 7. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis verde nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz. A curva superior indicada pela letra A se refere à análise realizada no tempo 0 e B após 18 meses, sendo 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- 3,5 dicafeoilquinico, 4- 4,5 dicafeoilquinico, 5- aromadendrina, 6- drupanina, 7- artepillin C e 8- bacharina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10µl dos extratos de própolis verde na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013).

Novamente foi possível verificar a presença de todos os marcadores encontrados no tempo 0, ocorrendo poucas alterações. Portanto o extrato armazenado era adequado para a continuidade dos estudos.

Figura 8. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis vermelha nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz. A curva superior indicada pela letra A se refere à análise realizada no tempo 0 e B após 18 meses, sendo 1- formononetina. As setas indicam a ausência de um dos picos. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10µl dos extratos de própolis vermelha na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013).

A formononetina foi encontrada nas duas análises, entretanto, apesar de não terem sido elucidadas as substâncias que eluíram nos tempos de 40 a 50 minutos, houve uma mudança no perfil cromatográfico pela ausência de um dos picos, conforme indicado pela seta na figura 8. Esse resultado sugere que pode ter ocorrido degradação de um dos compostos, o que também foi coerente com a queda nas quantidades de flavonóides obtidos entre os tempos 0 e após 18 meses, conforme mostrado na tabela 4.

Figura 9. Comparação do perfil cromatográfico do extrato de própolis EPP-AF® nos tempos 0 e após 18 meses de armazenamento na temperatura de 24°C ao abrigo da luz. A curva superior indicada pela letra A se refere à análise realizada no tempo 0 e B após 18 meses, sendo 1- ácido cafeico, 2- ácido p-cumárico, 3- 3,5 dicafeoilquínico, 4- 4,5 dicafeoilquínico, 5- aromadendrina, 6- crisina, 7- artepillin C e 8- bacharina. O cromatograma foi obtido pela injeção de 10µl dos extratos de própolis EPP-AF® na concentração de 1mg/ml, utilizando-se como fase estacionária coluna Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ e fase móvel com eluição por gradiente metanol:água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v, tempo de corrida 70 minutos fluxo 0,8ml/minuto e detecção a 275nm (ROCHA et al.,2013).

A comparação do perfil cromatográfico do EPP-AF® revelou a presença de todos os marcadores encontrados inicialmente, mas provavelmente houve degradação parcial da crisina (composto 6) pois foram observados novos picos próximos a este composto entre os tempos de 50 e 55 minutos.

Em resumo, a caracterização por CLAE revelou a presença de compostos com atividade antimicrobiana em todos os extratos, no entanto, os EPD e EPVD foram mais estáveis.

5.1.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos diversos extratos de própolis foi testada frente às bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* e a CBM encontrada para cada extrato estão expressas na figura 10. Também foi verificada a atividade antimicrobiana da solução hidroalcoólica a 70% utilizada como controle negativo, sendo que esta apresentou ação antimicrobiana até 8,75 % ou poço 4. Este valor foi superior as CBM obtidas pelos extratos de própolis que em todos os casos mostraram atividade a partir do poço 5, ou seja, a atividade bactericida pode ser atribuída a própolis e não ao etanol presente no extrato. A figura 11 ilustra os resultados obtidos mostrando a presença e ausência de crescimento das bactérias estudadas por meio de teste de microdiluição em caldo.

Figura 10. Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de própolis expressa em sólidos solúveis. As colunas demarcadas com * indicam que houve diferença estatística conforme ANOVA two-way, teste de Bonferroni, $p < 0,05$. Os resultados foram obtidos pela análise da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo (CLSI, 2012).

Figura 11. Concentração bactericida mínima (CBM) após colocar uma alíquota de 10 μ l de cada poço das concentrações testadas nos experimentos de microdiluição em caldo. As colunas da esquerda para direita se referem aos microrganismos *S.aureus*, *S.pneumoniae* e *K.pneumoniae*, respectivamente. As linhas no sentido superior ao inferior se referem respectivamente aos extratos de própolis dourada, verde, vermelha e EPP-AF®. A leitura das placas é realizada no sentido horário, onde a primeira alíquota superior representa a maior concentração avaliada e a última a menor.

A figura 11 revela que todas as própolis tiveram maior atividade contra *S.pneumoniae*, o que foi evidenciado pela ausência de crescimento desta bactéria na maioria das concentrações avaliadas.

A literatura descreve que a própolis possui atividade antimicrobiana melhor contra gram-positivos e esse comportamento foi observado para os EPD, EPVD e EPP-AF®, sendo que os dois primeiros tiveram resultados próximos aos relatados por outros autores que encontraram valores de CBM entre 0,8 - 1,6mg/ml para *S.aureus*, concentração inibitória mínima de 0,62mg/ml para *S.pneumoniae* e CBM acima de 1,6mg/ml para *Escherichia coli*, representante do grupo dos gram-negativos (MACHADO et al., 2016; SCAZZOCCHIO et al., 2005).

Com relação ao EPVM obteve-se CBM semelhantes tanto para as bactérias gram-positivas como para a gram-negativa, e nossa hipótese é de que o alto teor de flavonoides encontrados nesse extrato tenha contribuído para a melhor atividade antimicrobiana. Outro trabalho também relatou resultados onde a própolis vermelha obteve CBM igual para gram-positivo e gram-negativo, sendo de 0,256mg/ml para *S.aureus* e *P.aeruginosa* (DAS NEVES, et al., 2016). Machado et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana da própolis vermelha provenientes dos estados de Sergipe e Alagoas, obtendo CBM de 0,4mg/ml a 1,6mg/ml frente as bactérias *E.coli* e *S.aureus*. Estes relatos indicam que os resultados encontrados no presente trabalho de 0,19mg/ml, 0,39mg/ml e 0,77mg/ml para *S.pneumoniae*, *S.aureus* e *K.pneumoniae* respectivamente, estão coerentes com a literatura.

Assim, os resultados obtidos revelaram que todas as própolis possuem atividade contra as bactérias gram-positivas estudadas, porém apenas a vermelha teve ação antimicrobiana relevante contra *K.pneumoniae*.

5.1.4. Avaliação da citotoxicidade dos extrato de própolis

Foi avaliada a citotoxicidade dos extratos de própolis em cultura de células HEp-2 nas concentrações de 20µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 500 µg/ml em sólidos solúveis nos tempos de exposição de duas e 24 horas. Na concentração de 500 µg/ml todos os extratos apresentaram alta toxicidade, ocorrendo 100% de morte celular nos dois tempos avaliados. As figuras 12 e 13 mostram os resultados obtidos para todas as outras concentrações avaliadas.

Figura 12. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de própolis dourada, verde, vermelha e EPP-AF® no tempo de exposição de duas horas. Os resultados mostram a porcentagem das células HEp-2 não viáveis após duas horas de exposição nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml em sólidos solúveis. A coluna demarcada com * indica que houve diferença estatística conforme ANOVA two-way, teste de Bonferroni, $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 13. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de própolis dourada, verde, vermelha e EPP-AF® no tempo de exposição de 24 horas. Os resultados mostram a porcentagem das células HEp-2 não viáveis após 24 horas de exposição nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml em sólidos solúveis. A linha demarcada indica 30% de células não viáveis. As colunas demarcadas com * indicam que houve diferença estatística conforme ANOVA two-way, teste de Bonferroni, $p < 0,05$ em relação ao controle.

A International Organization for Standardization (ISO) descreve métodos de ensaio para avaliação biológica de produtos para saúde incluindo a citotoxicidade *in vitro*. Na norma ISO 10993-5: 2009 são consideradas tóxicas as concentrações dos produtos avaliados onde há perda da viabilidade celular em pelo menos 30%. Além disso, no mesmo documento também há informações para análises qualitativas, ou

seja, mesmo que não ocorra morte celular a presença de grânulos, mudança no tamanho celular, alterações morfológicas e integridade da membrana devem ser consideradas para avaliação da citotoxicidade.

Foi possível observar que no tempo de duas horas de exposição todos os extratos nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml não apresentaram citotoxicidade relevante segundo os critérios da norma ISO 10993-5:2009, pois não houve alterações morfológicas e o número de células não viáveis foi menor que 30% em todos os casos. Além disso, a análise estatística mostrou que apenas o EPVM na concentração de 200 µg/ml resultou em uma toxicidade superior ao controle, com valor de aproximadamente 10%.

No tempo de 24 horas na concentração de 20 µg/ml apenas o EPP-AF® foi mais tóxico que o controle. Entretanto se considerarmos os valor de 30% nenhum dos extratos de própolis apresentou citotoxicidade relevante, além disso, a morfologia celular permaneceu inalterada e semelhante ao controle. Na concentração de 100 µg/ml, os EPVM e EPP-AF® mostraram citotoxicidade superior ao controle, além disso, algumas das células com EPVM possuíam grânulos em abundancia e morfologia arredondada. Por fim, na concentração de 200 µg/ml os EPD, EPVM e EPP-AF® foram mais tóxicos que o controle. Somado a isto, se considerarmos os critérios da ISO 10993-5:2009 os EPD e EPVM foram severamente tóxicos inviabilizando 100% das células. Já os extratos de EPVD e EPP-AF® apesar de não apresentarem valores superiores a 30% de células não viáveis, nas células tratadas com 200 µg/ml houve a presença de grânulos e morfologia alterada para arredondada.

Com base nestes resultados o EPVD foi o mais tolerado para ser utilizado nos experimentos com HEp-2.

5.2 Etapa 2: Avaliação do crescimento bacteriano, infecções celulares e morfologia em microscopia eletrônica de varredura

Apesar de o EPVM ter a melhor CBM para as bactérias estudadas, a alta citotoxicidade e instabilidade físico-química não permitiu que o mesmo fosse escolhido para a segunda etapa deste projeto. Assim, devido ao alto teor de

compostos fenólicos, estabilidade e baixa citotoxicidade, o EPVD foi selecionado para os estudos de infecção celular e MEV.

5.2.1. Avaliação do crescimento bacteriano na presença de própolis – “Time Kill Curve”

Foi avaliada a “time kill curve” das bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* na ausência e presença do EPVD nas concentrações de 20µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml em sólidos solúveis a fim de determinar se haveria alguma interferência no crescimento bacteriano. Apesar de essas concentrações estarem bem abaixo dos valores CBM, conforme figura 10, estas foram selecionadas com base nos experimentos de toxicidade celular. Os resultados estão mostrados nas figuras 14 a 16.

Figura 14. “Time kill curve” de *S.aureus* na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC como diluente. * $p < 0,05$, ANOVA two-way, teste de Bonferroni.

Apesar de essas concentrações estarem abaixo da CBM (1,81 mg/ml), pode-se observar que após seis horas de incubação as concentrações de 100 µg/ml e 200 µg/ml diminuíram o crescimento do *S.aureus* comparado ao controle e isto permaneceu até 24 horas. Assim, mesmo não havendo um efeito bactericida nestas concentrações, o fato de interferir no desenvolvimento desta bactéria ainda é um resultado interessante, pois a resposta imune somada a este efeito pode contribuir

para controlar infecções por *S.aureus*. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para que haja essa comprovação.

Figura 15. "Time kill curve" de *K.pneumoniae* na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC como diluente. A análise estatística ANOVA two-way, teste de Bonferroni mostrou que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tempos e concentrações utilizados em relação ao controle.

De acordo com a análise de atividade antimicrobiana a *K.pneumoniae* foi a mais resistente ao EPVD e as concentrações utilizadas não foram suficientes para inibir o crescimento desta bactéria.

Figura 16. "Time kill curve" de *S.pneumoniae* na ausência e presença de extrato de própolis verde nas concentrações de 20 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando MHC com 5 % de sangue de cavalo como diluente. * $p < 0,05$, ANOVA two-way, teste de Bonferroni.

Para *S.pneumoniae*, semelhantemente ao que ocorreu com *S.aureus* após seis horas de incubação houve inibição do crescimento bacteriano, neste caso em todas as concentrações avaliadas. Porém com 24 horas de incubação isto não foi observado. *S.pneumoniae* possui cápsula de polissacarídeos como um dos seus principais fatores de virulência (LÓPEZ, 2004) e a expressão da cápsula e crescimento de *S.pneumoniae* podem ser influenciados por fatores externos, tais como disponibilidade de oxigênio e açúcares (WEISER et al., 2001; CARVALHO et AL., 2013). Assim, uma hipótese é que a presença de baixas concentrações de EPVD pode ter influenciado a expressão da cápsula e o crescimento de *S.pneumoniae*, conforme mostrado na figura 16. Embora a *K.pneumoniae* também apresente cápsula, por ser um microrganismo gram-negativo a própolis não foi muito eficiente para sua inibição, assim não foi possível observar alterações no crescimento desta bactéria.

A partir desses resultados, foi escolhido o tempo de seis horas e a concentração de 100 µg/ml para os experimentos de adesão e invasão em células eucarióticas.

5.2.2. Adesão celular

5.2.2.1. Determinação do tempo de adesão

Nos estudos de adesão celular foi verificado que após uma hora as bactérias *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* já haviam aderido à superfície das células HEp-2, sendo que não houve diferença na quantidade de adesão após duas horas, e portanto, este tempo foi escolhido para estas bactérias. Entretanto, para o *S.aureus* houve aumento na adesão após duas horas, sendo este tempo escolhido no estudo de adesão de *S.aureus*.

5.2.2.2. Pré-tratamento com própolis

Após prévio tratamento das células com EPVD a 100 µg/ml, bem como controle sem tratamento, foi observada a influência da adesão bacteriana conforme a figura 17.

Figura 17. Adesão bacteriana em células HEp-2 pré-tratadas com 100µg/ml de EPVD. As células HEp-2 foram expostas durante duas horas ao EPVD e posteriormente infectadas com as bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae*. As colunas representam o número de bactérias aderidas na superfície das células HEp-2. As análises estatísticas realizadas pelo teste t de Student obtiveram $p>0,05$ indicando que não houve diferença entre os grupos controle e tratado.

Foi constatado que o pré-tratamento com EPVD não interferiu significativamente no número de bactérias que aderiram nas células HEp-2. Isso indica que o mecanismo de ação antibacteriano do EPVD não está relacionado a formação de uma camada protetora que impede a ligação das bactérias na superfície celular.

5.2.2.3. Tratamento com própolis

Neste modelo, as células eucarióticas foram infectadas com as bactérias estudadas e posteriormente tratadas com 100 µg/ml de EPVD. Os resultados foram comparados com o controle sem tratamento, conforme a figura 18.

Figura 18. Adesão bacteriana em células HEp-2 tratadas com 100µg/ml de EPVD. As células HEp-2 foram infectadas com as bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* e posteriormente tratadas com o EPVD. As colunas representam o número de bactérias aderidas na superfície das células HEp-2. As análises estatísticas realizadas pelo teste t de Student obtiveram $p > 0,05$ indicando que não houve diferença entre os grupos controle e tratado.

Sabe-se que a adesão do microrganismo a célula hospedeira é o primeiro passo para a invasão, entretanto semelhantemente ao pré-tratamento, não houve diferença entre os grupos tratados e controle. Esses dados indicam que o mecanismo de ação antimicrobiana da própolis não está relacionado com a inibição das adesinas bacterianas, o que poderia impedir as interações na superfície celular.

A maioria dos trabalhos realizados para verificar a interferência da adesão bacteriana na presença da própolis utilizou superfícies físicas de materiais e com concentrações semelhantes ou mais altas que a CBM ou ainda na oromucosa para avaliar a influencia da formação de biofilmes em tratamento odontológico. Portanto, embora este resultado não seja positivo, ele contribuiu para somar aos estudos que visam avaliar a atividade antimicrobiana da própolis contra a adesão bacteriana.

Um dos poucos trabalhos disponíveis foi realizado por Drago et al. (2007) que comparou a adesão do *Streptococcus pyogenes* em células da cavidade oral. Neste estudo o autor utilizou concentrações de própolis correspondentes a 25% e 12,5% da necessária para inibir o crescimento bacteriano, e mostrou que na concentração menor algumas cepas tiveram a mesma resposta do controle. No presente trabalho a concentração de 100 µg/ml corresponde respectivamente a 5,5%, 1,4% e 11,0% das CBM necessárias para matar as bactérias *S.aureus*, *K.pneumoniae* e *S.pneumoniae* o que torna os resultados coerentes com o estudo descrito.

5.2.3. Invasão celular

5.2.3.1. Determinação do tempo de invasão

Foi avaliada a invasão das bactérias estudadas nos tempos de 2, 3 e 4 horas. Observou-se que após 3 horas não houve diferença na quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* que invadiram as células HEp-2.

Esta metodologia não permitiu avaliar a invasão do *S.pneumoniae*, pois esta bactéria foi muito sensível ao surfactante utilizado (Triton 0,1%). Nos ensaios realizados ela resistiu a apenas 30 segundos na presença de 0,1% do surfactante e este tempo não foi suficiente para romper a membrana celular da HEp-2 liberando as bactérias invasoras. Assim para avaliar a invasão do *S.pneumoniae* seria ideal utilizar outra metodologia, como por exemplo, fixar as células invadidas e realizar contagem em microscopia. No entanto, os resultados da adesão nos indicam que a ação da própolis não está relacionada com a adesão e invasão bacteriana.

5.2.3.2. Pré-tratamento

Foi adicionado o EPVD na concentração de 100µg/ml e posteriormente foram adicionadas as bactérias para testar a capacidade de invasão celular. Os resultados na presença e ausência de própolis estão mostrados na figura 19.

Figura 19. Invasão bacteriana em células HEp-2 pré-tratadas com 100µg/ml de EPVD. As células HEp-2 foram expostas durante duas horas ao EPVD e posteriormente infectadas com as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae*. As colunas representam o número de bactérias que invadiram as células HEp-2. As análises estatísticas realizadas pelo teste t de Student obtiveram $p > 0,05$ indicando que não houve diferença entre os grupos controle e tratado.

O pré-tratamento com EPVD não interferiu na invasão das bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae*. Estes resultados foram coerentes com os obtidos no experimento de adesão, mostrando que provavelmente o mecanismo de ação da própolis não está relacionado à formação de uma camada protetora que impede a invasão dessas bactérias. Apesar destes resultados, não se pode descartar totalmente a hipótese de que o uso prévio da própolis impede a adesão e invasão bacteriana, pois há estudos relatando a atividade imunomodulatória da própolis, onde esta é capaz de aumentar a mobilidade de macrófagos (TATEFUJI et al., 1996), o que poderia impedir o desenvolvimento da infecção bacteriana. Entretanto, para comprovarmos essa ação indireta da própolis nas infecções bacterianas seria necessário repetir os experimentos de adesão e invasão em uma cultura de células mistas, ou seja, com macrófagos e HEp-2.

5.2.3.3. Tratamento

Neste experimento, as células foram primeiramente infectadas pelas bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* e posteriormente tratadas com 100µg/ml de EPVD. A figura 20 mostra os resultados obtidos comparados ao controle não tratado.

Figura 20. Invasão bacteriana em células HEp-2 tratadas com 100µg/ml de EPVD. As células HEp-2 foram infectadas com as bactérias *S.aureus* e *K.pneumoniae* e posteriormente tratadas com EPVD. As colunas representam o número de bactérias que invadiram as células HEp-2. As análises estatísticas realizadas pelo teste t de Student obtiveram $p > 0,05$ indicando que não houve diferença entre os grupos controle e tratado.

O processo de adesão e invasão das bactérias em células hospedeiras ocorre através da ligação de adesinas e invasinas, geralmente proteínas de superfície, que facilitam a aderência e posterior penetração das bactérias nas células (DI MARTINO, et al., 1995; RIGHINI, et al., 2006). Novamente não ocorreu diferença significativa entre os grupos controle e tratado, sugerindo que o mecanismo de ação da própolis não está relacionado à inibição da invasão das bactérias estudadas. Semelhantemente aos trabalhos de adesão, também há poucos relatos sobre a relação entre a própolis e a invasão celular de bactérias, e, portanto, estes resultados também contribuem para somar aos estudos que visam avaliar a atividade antimicrobiana da própolis em infecções.

5.2.4 Avaliação da morfologia bacteriana por microscopia eletrônica de varredura

O aspecto das bactérias estudadas com e sem tratamento do EPVD estão mostrados na figura 21.

Figura 21. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das bactérias *S.aureus*, *S.pneumoniae* e *K.pneumoniae* sem tratamento e após tratamento com concentrações bactericidas mínimas do EPVD. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no equipamento Jeol JSM - 6610 LV com voltagem de aceleração entre 20 e 25kV, aumento de 30.000 vezes.

S.aureus possui forma de cocos com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e apresenta-se geralmente agrupados em forma de cachos de uva, conforme pode ser observado no controle na figura 21 (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Após o tratamento, as células apresentaram rachaduras na superfície indicando que a morte desta bactéria pode estar relacionada com a lise celular e perda do equilíbrio osmótico.

S.pneumoniae também são cocos e com aproximadamente 0,5 a 1,2 μm de diâmetro, porém dispõem-se aos pares (diplococos) ou em cadeias curtas (TRABULSI, L. A.; ALTERTHUM, 2008). Semelhantemente aos resultados encontrados para *S.aureus*, no tratado foi possível observar rachaduras na superfície bacteriana indicando que a morte celular provocada pela própolis pode estar relacionada com a lise celular e perda do equilíbrio osmótico.

A *K.pneumoniae* tem forma de bacilo e mede cerca de 0,5 μm por 2 μm (TRABULSI, L. A.; ALTERTHUM, 2008). Conforme já discutido, o extrato de EPVD teve pouca atividade contra esta bactéria, sendo que foi necessário utilizar uma alta CBM. Observando a figura 21, não encontramos as rachaduras presentes nas bactérias gram-positivas tratadas, entretanto verificou-se alterações morfológicas principalmente no tamanho da bactéria quando comparada ao controle.

Bactérias gram-negativas possuem uma parede celular bem mais complexa do que as gram-positivas, que são compostas basicamente por uma espessa camada de peptideoglicanos. As gram-negativas possuem uma camada de peptideoglicano, periplasma e membrana externa com lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas, esta estrutura complexa pode ser um dos principais motivos da resistência a própolis. Embora seja mais complexa, a parede das bactérias gram-negativas é menos rígida e assim, se considerarmos que a própolis também foi capaz de produzir lise nestas células, a diminuição do tamanho poderia ser explicada pela perda do conteúdo citoplasmático e consequente deformação celular.

Em um estudo realizado com biofilmes de *S.aureus* e *E.coli* tratados com própolis a 20% foi possível observar em MEV que esta alta concentração de própolis causou danos severos na parede celular das duas bactérias confirmando que a própolis é capaz de causar lise nas células bacterianas (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2016).

Com relação ao mecanismo de ação da própolis, embora ainda não esteja claro, sabe-se que o extrato é rico em compostos fenólicos e é provável que a atividade antimicrobiana esteja relacionada a estes. Os compostos fenólicos são capazes de interagir com a parede celular e membrana dos microrganismos, além de alterar a permeabilidade da membrana celular permitindo assim a perda de macromoléculas. Dessa forma, os resultados morfológicos observados pela MEV estão coerentes com os danos causados pelos compostos fenólicos já descritos na literatura, mostrando que o EPVD foi capaz de danificar a estrutura das células bacterianas (BAJPAI et al., 2008).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Todos os extratos estudados apresentaram adequada quantidade de substâncias ativas que foram evidenciadas pelas análises de fenóis totais, flavonoides totais e caracterização em CLAE, sendo assim é provável que estes contenham as ações biológicas atribuídas à própolis. Apesar disto, os EPVD e EPD mostraram melhor estabilidade dos compostos ativos.

Os EPVD, EPD e EPP-AF® tiveram atividade antimicrobiana importante apenas para as bactérias gram-positivas estudadas. Já o EPVM apresentou atividade para todos patógenos avaliados, mas são necessários estudos mais aprofundados dos marcadores presentes a fim de garantir o controle da qualidade deste extrato.

Nos experimentos de infecção conduzidos com células HEp-2 o EPVD não foi capaz de inibir a adesão e invasão bacteriana, assim é provável que o mecanismo de ação antimicrobiano da própolis não esteja relacionado a adesão e invasão das bactérias estudadas.

A análise por MEV da morfologia das bactérias tratadas com concentrações bactericidas do EPVD mostrou que este foi capaz de danificar os microrganismos *S.aureus*, *S.pneumoniae* e *K.pneumoniae*, indicando que mecanismo de ação antimicrobiano provavelmente esteja relacionado com danos estruturais e consequente perda do conteúdo intracelular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945–946, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico**. 2014.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361–367, 1998.

BANSAL, M.; KHATRI, M.; TANEJA, V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. **Journal of Medicine and Life**, v. 6, n. 3, p. 244 - 248, 2013.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561–571, 2001.

BARRIENTOS, L. et al. Chemical and botanical characterization of chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 577–585, 2013.

BATISTA, L. L. V. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n. 6, p. 515–20, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa - INT Nº 3/2001**. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 20/2011**. 2011.

BRASIL. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). **Portaria – PRT Nº 491/2012**. 2012.

BRYAN, J.; REDDEN, P.; TRABA, C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 192–198, 2016.

CARVALHO, S. M. et al. Pyruvate oxidase influences the sugar utilization pattern and capsule production in *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–18, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; Approved standard – 11th Ed.** CLSI, 2012. (CLSI document M02-A11).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved standard — 9th Ed.** CLSI, 2012. (CLSI document M07-A9).

COHEN H.A. et al. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v.158, n. 3, p.217-222, 2004

CZYŻEWSKA, U. et al. Proapoptotic activity of propolis and their components on human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL-27). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1 - 14, 2016.

DAS NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016.

DE VECCHI, E.; DRAGO, L. Propolis antimicrobial activity: what's new? **Le Infezioni in Medicina**, v. 15, n. 1, p. 7–15, 2007.

DI MARTINO, P. et al. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4336–4344, 1995.

DRAGO, L. et al. *In vitro* antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1914–1921, 2007.

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

FUNARI, C. S. et al. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2052–2061, nov. 2011.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. EPSJV; IOC, 2010.

GARDANA, C. et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 390–399, 2007.

GOMES, B. C. et al. In Vitro Evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 6, p. 1083–1089, 2012.

International Standard (ISO) 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, v. 3 Ed, p. 42, 2009.

JIANG, Y. et al. Chrysin suppressed inflammatory responses and the inducible nitric oxide synthase pathway after spinal cord injury in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12270–9, 2014.

JORGE, R. et al. Brazilian Propolis: Seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n.12, p. 889–893, 2008.

KHAYYAL, M. T. et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 93–102, 2003.

KROL, W. et al. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 1, p. 19–25, 1996.

KRÓL, W. et al. Propolis : Properties, application, and its potential. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1 - 2, 2013.

KUREK-GÓRECKA, A. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78–101, 2014.

LÓPEZ, R. *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: One long argument. **International Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 163–171, 2004.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.

MARCUCCI, M. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethanopharmacology**, v. 74, p. 105–112, 2001.

NAKAJIMA, Y. et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 4, 2009.

NASCIMENTO, A. P. et al. Methodologies for the evaluation of the antibacterial activity of propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.20, p. 2344–2350, 2013.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85–90, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extract of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230–2232, 1998.

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

RASUL, A. et al. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ROCHA, B. A. et al. Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterisation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ROCHA, B. A. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 87–94, 2012.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327–33, 2006.

SHIGENORI, K. M. Y. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740–742, 2006.

SINHA, B.; HERRMANN, M. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. **Thrombosis and Hemostasis**, v. 94, n. 2, p. 266 – 277, 2005.

SZLISZKA, E. et al. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SZLISZKA, E. et al. Inhibition of inflammatory response by artemisinin C in activated RAW264.7 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

TATEFUJI, T. et al. Isolation and Identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 7, p. 966–970, 1996.

TAVARES, L. S. et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: Resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–11, 2013.

TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

TRABULSI, L. A.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

UMTHONG, S. et al. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v.11, n.37, p. 1-8, 2011.

WEISER, J. N. et al. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5430–5439, 2001.

WOISKY, R. G. R. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**.1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

WOJTYCZKA, R. D. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9623–9640, 2013.

XUAN, H. et al. Bioactive components of Chinese propolis water extract on antitumor activity and quality control. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–9, 2016.