

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

# OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO AQUOSA E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Denis Jansen Lemos Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química** 

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020



Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

# OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO AQUOSA E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Denis Jansen Lemos Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química** 

Orientadora Profa. Dra. Delia Rita Tapia Blácido

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

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.

# FICHA CATALOGRÁFICA

# Costa, Denis Jansen Lemos

Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato – Ribeirão Preto, SP, 2020.

81p:30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP – Área de concentração: Departamento de Química.

Orientadora: Tapia-Blácido, Delia Rita

1. Própolis. 2. Flavonoides. 3. Compostos Fenólicos. 4. Antioxidante.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Costa.	Denis	Jansen	Lemos
Costa		Jansen	

**Título:** Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Delia Rita Tapia Blácido

Aprovado	em:
Aprovado	CIII.

#### Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento	Assinatura	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento	Assinatura	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento	Assinatura	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento	Assinatura	

# **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão por sempre acreditarem em mim, pelo carinho e pela atenção.

"Ain't about how fast I get there Ain't about what's waiting on the other side It's the climb"

Miley Cyrus (2009)

#### **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho. Sou imensamente grato por todo apoio, atenção e carinho que recebi durante meu mestrado.

Agradeço a Deus, primeiramente, pela oportunidade de realizar este mestrado, me guiando e me dando força, e por todas as coisas boas que me proporcionou.

Aos meus pais Carlos e Silvana, que me sempre me incentivaram a estudar e por serem os maiores exemplos de vida que eu tenho. À meu irmão Wilbert, meu melhor amigo, que sempre me ajuda quando preciso.

À minha orientadora Professora Delia Rita Tapia Blácido, por me receber em seu laboratório, por toda a paciência e atenção, por me motivar e me ajudar durante todo o meu mestrado. Sou eternamente grato por tudo que aprendi.

Ao Guilherme, por ter me apresentado o laboratório, me ensinado a usar os equipamentos, por ser a pessoa mais paciente, alegre e motivadora que já conheci, por ser um grande amigo que vou levar pra vida toda.

À Julia, que me ajudou em todas as etapas na realização deste mestrado. Eu não teria conseguido fazer todas as analises se não fosse por ela. Pelo apoio e companhia nos congressos que participamos.

Aos meus amigos do laboratório, por todos os bons momentos que passamos juntos. À Janaína, ao Bruno, à Patricia, a Jhenifer e ao Fernando pelo amizade e por tudo que me ensinaram. Sou muito grato a todos vocês.

Ao Bruno, a Amanda e a Max pela amizade, por me acompanharem durantes as aulas de pós graduação e ao seminários, pela companhia e passeio em congressos e viagens.

Agradeço todos os técnicos da faculdade, essenciais para a pesquisa desenvolvida. Ao Rodrigo (MEV), Lariani (atividade antimicrobiana) e Simone pela disponibilidade e paciência sempre que precisei usar equipamentos fora do laboratório da professora Delia.

Aos técnicos Rodrigo e Camila e aos professores Paulo Sobral, Milena e Cynthia da FZEA de Pirassununga, pelo auxilio e disponibilidade dos equipamentos para a realização do teste de parâmetros de cor.

À professora Márcia Eliana da FCFRP, por me receber em seu laboratório e me ensinar a realizar os testes de atividade antimicrobiana, sou muito grato por toda a paciência e atenção que recebi.

Aos meus amigos fitness Artur, Jose, Thiago e Vinicius por sempre me motivarem, me ouvirem e sempre me chamarem pras aulas de Zumba e Fitdance.

Aos amigos da casa 109 que conheci através do Guilherme. Em especial ao Alan e a Thais, por serem grandes amigos e companheiros.

Agradeço aos funcionários do departamento Lâmia, Dias, Josi e Camila por todo auxílio durante a pesquisa.

À Vale do Mel, em especial ao senhor Ivan e a Lívia por acreditarem e confiarem em mim e por todo o incentivo que recebi durante esta pesquisa.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

# SUMÁRIO

Univ	ersidade de São Paulo	i
Univ	ersidade de São Paulo	i
DED	ICATÓRIA	iv
AGR	ADECIMENTOS	vi
RES	UMO	x
ABS	TRACT	xi
1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. I	Própolis	18
2.2.	Composição química da própolis	20
2.3. I	Propriedades biológicas da própolis	22
2.3.1	. Atividade Antioxidante	22
2.3.2	. Atividade Antimicrobiana	23
2.3.3	. Outras propriedades	24
2.4.	Comercialização da Própolis	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. I	Material	28
3.2. 0	Obtenção das frações de própolis	28
3.3. (	Obtenção do extrato etanólico das frações de própolis	29
3.4.	Obtenção do extrato aquoso das frações de própolis	29
3.5.	Caracterização das frações e dos extratos de própolis	30
3.5.1	. Distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis	30
3.5.2	. Parâmetros de cor da própolis	31
3.5.3	. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.5.4	. Teor de umidade das frações da própolis in natura	32
3.5.5	. Determinação de cinzas das frações da própolis in natura	32
3.5.6	. Atividade antioxidante por DPPH das frações da própolis in natura	33
3.5.7	. Atividade antioxidante por ABTS dos extratos de própolis	33
3.5.8	. Massa mecânica dos extratos das frações da própolis	35
3.5.9	. Teor de ceras dos extratos etanólicos de própolis	35
3.5.1	0. Teor de sólidos solúveis dos extratos de própolis	35
3.5.1	1. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis	36

3.5.	12. Teor de flavonoides totais dos extratos de própolis	37
3.6.	Produção e caracterização dos extratos otimizados	39
3.6.	1. Determinação da qualidade microbiológica dos extratos	39
3.6.	2. Determinação da atividade antimicrobiana usando o teste do Halo	39
3.7.	Análise estatística	40
3.7.	1. Teste de comparação de médias	40
	2. Metodologia de Superfície de Resposta para a otimização da extração aquosa polis	
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
	Caracterização físico-química das frações de própolis e de seus extratos etanólic	
	1. Aspecto visual das frações de própolis	
4.1.	2. Rendimento e distribuição do tamanho de partículas das frações da própolis	43
4.1.	3. Parâmetros de cor das frações de própolis	45
4.1.	4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das frações de própolis	47
	5. Umidade e cinzas das frações de própolis	
	6. Massa mecânica, teor de cera e extrato seco (sólidos solúveis) dos extra nólicos das frações de própolis	
4.1.	7. Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides	51
4.1.	8. Atividade antioxidante por DPPH e ABTS	54
4.2.	Otimização da extração aquosa de própolis utilizando a metodologia de superfície	de
4.2.	1. Massa mecânica e extrato seco (sólidos solúveis) dos extratos aquosos	57
4.2.	2. Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides	63
4.2.	3. Perfil de desejabilidade para o extrato aquoso de própolis	68
4.3.	Caracterização dos extratos otimizados de própolis	69
	1. Massa mecânica, extrato seco (sólidos solúveis), compostos fenólicos e teor conóides dos extratos otimizados.	
4.3.	2. Qualidade microbiológicas dos extratos otimizados	71
	3. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos otimizados usando o te	73
5	CONCLUSÃO	76
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Costa, Denis Jansen Lemos. Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato. 2020. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

#### **RESUMO**

A própolis é uma substância resinosa com importante conteúdo de compostos bioativos e ceras que protegem a colmeia contra fungos, bactérias e insetos. Para o uso da própolis como remédio terapéutico é necessário realizar uma extração etanólica, na qual é removida parte de sua cera e preservado seus polifenóis. Entretanto, existe uma limitação no consumo desse extrato devido à concentração de álcool nele presente. Portanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver a extração de própolis em meio aquoso para o uso comercial. Para isso, a própolis in natura foi moída em liquidificador e peneirada usando peneiras de 35 Mesh, 45 Mesh, 80 Mesh e 100 Mesh, as quais foram caracterizadas. Assim, foram determinados o tamanho de partículas, os parâmetros de cor das frações, a umidade, cinzas, teor de ceras, atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides das frações de própolis. Os extratos etanólicos das frações de menor tamanho de partícula (Frações A e B) apresentaram menor teor de compostos fenólicos (A: 2,86 mg/mL) e menor teor de cera (B: 3,39%). Por outro lado, a fração com maior tamanho de partícula (G) apresentou maior teor de compostos fenólicos (5,35mg/mL), flavonoides e atividade antioxidante. Assim, o processo de moagem e peneiragem permitiu a separação das ceras da própolis, mas também provocou perdas de compostos bioativos. Na etapa seguinte do trabalho, foi realizada a otimização do processo de extração aquosa da própolis através de um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>, que permitiu avaliar o efeito do tamanho de partícula, tempo de extração e concentração de álcali sobre o pH, massa mecânica, teor de sólidos solúveis, teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides do extrato. A concentração de álcali demonstrou ser a variável com maior influência sobre o extrato, enquanto o tamanho de partícula não teve influência significativa sobre os parâmetros avaliados. A metodologia de superfície de resposta permitiu otimizar as condições para a preparação do extrato aquoso de própolis. O extrato otimizado apresentou alto rendimento de extração (sólidos solúveis: 11,8% e massa mecânica: 33,1%), alto teor de compostos bioativos (Teor de flavonoides: 4,3mg/mL e teor de compostos fenólicos: 19,8mg/mL) e atividade contra o crescimento do microorganismo S. Aureus.

**PALAVRAS CHAVE:** própolis, extração, cera, flavonoides, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

Costa, Denis Jansen Lemos. Optimization of propolis extraction in aqueous solution and characterization of the extract. 2020. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

#### **ABSTRACT**

Propolis is a resinous substance with an important content of bioactive compounds and beewax. It protects the hive against fungi, bacteria and insects. An ethanol extraction must be conducted for propolis to be used as a therapeutic drug. During this extraction, part of the beewax is removed, while the polyphenols are preserved. However, the consumption of this extract is limited due to the concentration of alcohol that it contains. This work aims to develop the extraction of propolis in aqueous solution for commercial use. For this purpose, propolis in natura was ground in a blender, sieved through 35mesh, 45-mesh, 80-mesh, and 100- mesh sieves, and characterized after this. Then, particle size, color parameters of the fractions, moisture, ash, beewax content, antioxidant activity, and total phenolics and flavonoids in the propolis fractions were determined. The ethanolic extracts of the fractions with the smallest particle size (Fractions A and B) had lower content of phenolic compounds (A: 2.86 mg/mL) and beewax (B: 3.39%). On the other hand, the fraction with the largest particle size (G) had higher content of phenolic compounds (5.35 mg/mL), flavonoids, and antioxidant activity. Thus, the grinding and screening processes allowed beewax to be separated from propolis, but it also caused loss of bioactive compounds. In the next step, the aqueous extraction process was optimized for propolis through a Central Rotational Compound Design 2<sup>3</sup>, which allowed particle size, extraction time and alkali concentration effects on pH, mechanical mass, soluble solids content, phenolic compounds content, and flavonoids content in the extract to be evaluated. The alkali concentration was the variable that influenced the extract the most, while particle size did not affect the evaluated parameters significantly. The response surface methodology allowed us to optimize the conditions for the preparation of the aqueous propolis extract. The optimized extract showed high extraction yield (soluble solids: 11.8% and mechanical mass: 33.1%), high content of bioactive compounds (Flavonoida content: 4.3mg / mL and Phenolics content: 19.8mg / mL), and biological activity against the growth of the S. Aureus pathogen.

**KEYWORDS:** propolis, extraction, beewax, flavonoids, phenolic compounds, antioxidant activity.

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Abelha coletando a resina para produção de própolis
Figura 2: Estrutura molecular dos flavonóides
Figura 3: Artepilina C e Ácido cafeoilquínico
<b>Figura 4:</b> Estrutura do flavonoide galangina (a esquerda) e do ácido fenil ester caféico (a
direita)25
<b>Figura 5:</b> Extratos comercias de própolis
<b>Figura 6:</b> Própolis <i>in natura</i> e suas frações
<b>Figura 7:</b> Distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis <i>in natura</i> 43
<b>Figura 8:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
<b>Figura 9:</b> Curva Padrão para quantificação de Compostos Fenólicos expressos em Ácido Gálico
<b>Figura 10:</b> Curva Padrão para quantificação de Flavonoides expressos em Quercetina
Figura 11: Diagrama de Pareto para (a) Massa Mecânica e (b) extrato seco58
Figura 12: Gráfico de Superfície de Resposta para a Massa Mecânica em função do
tempo e da concentração de NaOH61
Figura 13: Gráfico de Superfície de Resposta para o Teor de Extrato Seco em função do
tempo e da concentração de NaOH62
Figura 14: Diagrama de Pareto para (a) Teor de Compostos Fenólicos e (b) Teor de
Flavonóides64
Figura 15: Gráfico de Superfície de Resposta para o Teor de Compostos Fenólicos em
função do tempo e da concentração de NaOH67

Figura	16:	Perfil	para	previsão	de	valores	e	desejabilidade	do	extrato	aquoso	de
própolis												68
Figura	<b>17:</b> I	Determ	inação	o da prese	nça	de micro	org	anismos nos ext	rato	os	···········	72
Figura	<b>18:</b> <i>A</i>	Ativida	de ant	imicrobia	na o	dos extra	tos	s de própolis			······ <i>'</i>	74

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Matriz do planejamento DCCR 2 <sup>3</sup> para a extração aquosa do própolis30
<b>Tabela 2:</b> Frações da Própolis in natura moída
<b>Tabela 3:</b> Diâmetro médio, d50 e d90 das frações de própolis in natura
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros de cor (L*, a*, b* e ΔE*) das frações de própolis46
<b>Tabela 5:</b> Teor de umidade e teor de cinzas das frações de própolis49
Tabela 6: Massa mecânica, teor de ceras e extrato seco (sólidos solúveis) dos extratos         etanólicos das frações de própolis
Tabela 7: Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides dos extratos etanólicos das frações de própolis
<b>Tabela 8:</b> Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos das frações de própolis54
Tabela 9: Resultados do planejamento DCCR 2³ para a extração aquosa da própolis
<b>Tabela 10:</b> Coeficiente de regressão e análise de variância ANOVA para Massa Mecânica e Teor de Extrato Seco para os extratos aquosos produzidos pelo planejamento DCCR 2 <sup>3</sup>
<b>Tabela 11:</b> Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para as variáveis de resposta Teor de Compostos Fenólicos e teor de Flavonoides para os extratos aquosos produzidos pelo planejamento DCCR 2 <sup>3</sup>
Tabela 12: Caracterização dos extratos de própolis otimizados
<b>Tabela 13:</b> Teor de Compostos Fenólicos e Teor de Flavonoides após 30 dias71

#### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste projeto é otimizar o processo de extração aquosa de própolis, utilizando a metodologia de superfície de resposta e o Delineamento Central Composto Rotacional 2<sup>3</sup>, avaliando os efeitos da concentração de hidróxido de sódio, a granulometria e tempo de extração sobre o rendimento e características dos extratos obtidos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a maceração e peneiragem da própolis in natura a fim de obter diferentes granulometrias deste material;
- Caracterizar as frações de própolis in natura em base a seu tamanho de partícula, parâmetros de cor, micrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teor de umidade, teor de cinzas e atividade antioxidante por DPPH;
- Obter e caracterizar os extratos etanólicos das frações de própolis em função a sua atividade antioxidante por ABTS, teor de ceras, massa mecânica, teor de sólidos solúveis, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides;
- Avaliar o efeito da concentração de hidróxido de sódio, granulometria e tempo de extração aquosa sobre o pH, massa mecânica, extrato seco, teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides dos extratos;
- Otimizar a extração aquosa de própolis utilizando um Deineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> a fim de obter um extrato com maior rendimento e maior concentração de compostos bioativos;
- Realizar a caracterização dos extratos otimizados e avaliar a atividade antimicrobianda em função ao tempo;
- Validar as condições otimizadas e compará-las com extratos comerciais.

# 1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa de composição complexa sintetizada pelas abelhas a partir dos mais diversos produtos coletados em brotos de árvores, resinas, mucilagens, treliças e outras fontes vegetais (MONROY, 2017; ANDRADE, 2017).

Essa substância é alterada pelas enzimas contidas na saliva das abelhas e utilizada para cobrir as entradas na colmeia a fim de protegê-la contra fungos, bactérias e insetos (BERROUKCHE et al., 2017). É comum encontrar nas colmeias pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação, devido à ação antimicrobiana da própolis, o que impede a decomposição do cadáver (PEREIRA, 2008).

A composição da própolis depende do tipo de planta, das resinas e das espécies de abelhas. Portanto é um produto que pode variar de composição segundo a fonte de origem. Em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal; 30% de cera; 10% de óleos essenciais e aromáticos; 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo também restos orgânicos. É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais (PARK et al., 2002; LUSTOSA et al., 2008; MATSUDA, 2006).

Existem diferentes tipos de própolis cujas características diferem quanto a sua origem botânica e espécie de abelha produtora. Só no Brasil foram identificados 12 tipos, sendo cinco delas encontradas na região Sul, uma na região Sudeste e seis no Nordeste, entre elas a própolis Verde, a própolis Marrom, a própolis Vermelha, a própolis Amarela, a própolis Preta e a geoprópolis. A principal fonte da própolis encontrada na região sudeste é *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), *Hyptis divaricata* e *Dalbergia ecastophyllum* (Rabo-de-bugio) são as principaisfontes da própolis nordestina e *Populus nigra* (álamo) é a principal fonte de resina da própolis encontrada na região Sul do Brasil.

A própolis Verde, exclusiva do sudeste brasileiro, popularizou-se no Brasil e no exterior por fortalecer o sistema imunológico e apresentar eficiência no combate de diversas doenças. Grande parte da própolis verde produzida no Brasil é exportada para diversas regiões do mundo, principalmente para a China e o Japão, para consumo e estudo.

A própolis Marrom, também conhecida como tradicional ou própolis comum é encontrada e produzida em todas as regiões do Brasil. Sua origem botânica diverge de

acordo com a região em que é produzida e sua coloração pode variar entre marrom claro e marrom esverdeado (ANDRADE et al., 2017). Sua coloração mais escura é causada, na maioria das vezes, por sua exposição a luz e ao calor que causa sua oxidação e também perda de grande parte de seus compostos voláteis, dentre eles, os responsáveis pela atividade biológica no corpo humano. Esta variedade de própolis, embora seja abundante em todo o Brasil, possui uma menor atividade biológica quando comparada a própolis verde e a própolis vermelha.

A própolis *in natura* precisa passar por um processo de purificação para ser utilizada. Nesse processo é removido sua cera e preservado seus polifenóis. A técnica mais popular de obtenção do extrato de própolis é a extração alcóolica devido à alta solubilidade de seus polifenóis em etanol (ANDRADE et al., 2017). A extração aquosa é pouca explorada e conhecida.

Considerando a própolis como uma substância natural rica em componentes benéficos à saúde humana e pouco explorada na forma de extrato aquoso, este trabalho justifica-se pelo estudo e otimização do processo de extração aquosa dos compostos bioativos presentes na própolis *in natura*, o qual pode permitir sua aplicação industrial e desenvolvimento de um produto comercial.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

# 2.1. Própolis

A própolis é uma substância resinosa de coloração escura, coletada pelas abelhas a partir de várias origens botânicas (ANDRADE, 2017; BERROUKCHE et al., 2017).

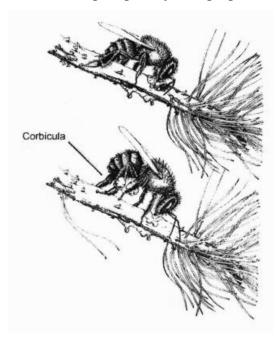
O material coletado pelas abelhas é transportado até a colmeia onde é misturado com cera de abelha, produzindo uma substância com características adesivas e antissépticas usadas nas entradas e ao redor da colmeia a fim de protegê-la de fungos, bactérias e insetos. As abelhas também utilizam a própolis para embalsamar insetos invasores, impedindo sua decomposição e evitando o crescimento de microrganismos dentro da colmeia (ANDRADE, 2017; BERROUKCHE et al., 2017).

Seu nome é derivado do grego em que pro- significa "em defesa de" e -polis, "cidade"; isto é, em defesa da cidade ou da colmeia (PEREIRA, 2008).

As abelhas encontradas no Brasil são provenientes de uma hibridização entre as abelhas europeias (*Apis mellifera* e *Apis mellifera lingustica*) com abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*). As espécies brasileiras de *Apis mellifera* são chamadas de africanizadas (MATSUDA, 2006).

As abelhas utilizam suas mandíbulas para cortar e coletar o material resinoso e balsâmico de botões de flores, pétalas, folhas, caules e cascas de arvores. O material coletado é transferido para as patas traseiras onde são armazenados em espaços chamados corbiculas (Figura 1). Esse material é levado até a colmeia onde outra abelha o retira deste compartimento, usando suas mandíbulas e acrescenta secreções e enzimas (MATSUDA, 2006).

**Figura 1.** Abelha coletando a resina para produção de própolis.



Fonte: (MATSUDA, 2006; WINTSON, 1987).

A própolis é espalhada nas paredes internas e cavidades da colmeia com o intuito de fechar buracos e rachaduras, consertar e reforçar a colmeia tornando-a resistente contra a entrada de invasores. As abelhas também utilizam a própolis para embalsamar pequenos invasores que elas tenham matado, mas não conseguiram carregar para fora da colmeia, como vespas e mariposas (MATSUDA, 2006).

No Brasil, existem muitas fontes de matéria prima para produção de própolis, sendo as principais: os alecrins, pinheiros, eucalipto, laranjeiras, figueiras, pessegueiros e ameixeiras. A própolis verde é a sua variedade mais conhecida, produzida pela *Apis mellifera* a partir da *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim-do-campo)(ANDRADE, 2017).

As características da própolis, tais quais, sua cor, aroma e sabor diferem quanto à sua origem botânica (JAFARI et al., 2017). Seu sabor é característico, variando de balsâmico a picante, dependendo de sua origem. Sua coloração pode variar entre o marrom escuro, verde e o marrom avermelhado (ANDRADE et al., 2017). Sua consistência em baixas temperaturas, de -20 a 4°C é quebradiça, todavia se torna dúctil e maleável quando aquecida. Seu ponto de fusão varia entre 60-70°C podendo chegar a 100°C em alguns casos (TAPIA, 2017).

Muitos de seus constituintes, tais como materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos são solúveis em solventes orgânicos como: éter, etanol,

acetona e tolueno. A parte insolúvel geralmente é composta por matéria orgânica, tecidos vegetais, grãos de pólen e outras impurezas (MATSUDA, 2006).

# 2.2. Composição química da própolis.

Sua composição química é complexa e varia de acordo com a ecologia da flora da região em que é produzida, com o período de coleta da resina (PARK et al., 2002), e também com a variabilidade genética das abelhas que a produz (LUSTOSA et al., 2008).

Para controlar sua qualidade e saber sua aplicação terapêutica é necessária a análise de sua composição química, saber sua origem geográfica e principalmente sua fonte botânica. Alguns de seus compostos com atividade biológica são encontrados em todas as suas variações, enquanto outros ocorrem apenas em própolis provenientes de uma determinada origem botânica (LUSTOSA et al., 2008).

Estudos realizados com própolis de diversas fontes botânicas e origens geográficas identificaram mais de 400 compostos químicos diferentes, entre eles estão ácidos fenólicos, flavonóides, terpenos, aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres, hidrocarbonetos, álcoois aromáticos, cetonas, sesquiterpenos, quinonas, cumarinas, esteroides e aminoácidos (BERROUKCHE et al., 2017; TAPIA, 2017).

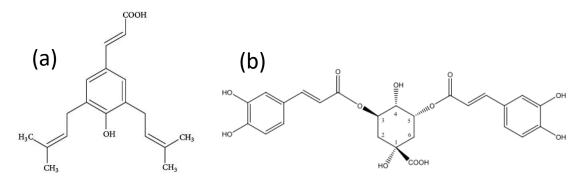
O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais, destacam-se pela sua alta atividade antioxidante. Estes metabolitos são uma importante classe de polifenóis presentes na própolis, que em sua maioria possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental rearranjados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, onde dois anéis aromáticos (A e B) (Figura 2) estão ligados por 3 átomos de carbono (C) (Figura 2), podendo ou não formar um terceiro anel conforme exemplifica a Figura 2 (MATSUDA, 2006):

Figura 2. Estrutura molecular dos flavonóides.

Fonte: Elaboração Própria. Estrutura molecular dos flavonoides formada por 2 anéis aromáticos representados por A e B ligados pelos 3 carbonos em C.

Estudos mostram que a própolis verde, provenientes do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) possui uma composição rica em compostos fenólicos derivados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C, e em ácidos cafeoilquínicos3 (COELHO, 2013), como mostrado na Figura 3:

Figura 3. Artepilina C e Ácido cafeoilquínico.



Fonte: Elaboração própria. (a) Refere-se a Artepilina C e (b) refere-se ao Ácido cafeoilquínico.

As própolis obtidas na América do Norte e outras zonas temperadas são compostas principalmente de flavonóides (pinocembrina, pinobanksina, quercetina, crisina e galangina), ácidos fenólicos e seus ésteres (FALCÃO et al., 2010). A própolis mediterrânea apresenta alta concentração de terpenóides e é encontrada em muitas regiões como a Grécia (POPOVA et al., 2010; ÇELEMLI et al., 2013), Suíça (BANKOVA et al., 2002), Malta (POPOVA et al., 2011), Turquia (DURAN et al., 2011; SILICI et al., 2007) e Argélia (PICCINELLI et al., 2013).

#### 2.3. Propriedades biológicas da própolis

A própolis apresenta várias propriedades medicinais e pode ser utilizada em tratamento de diversas afecções como: inflamações, infecções de garganta, infecções urinárias, úlceras, doenças do coração, diabetes e até mesmo o câncer (ANDRADE et al., 2017; PEREIRA, 2008).

As própolis coletadas em diferentes regiões possuem atividades biológicas distintas, pois sua atividade está diretamente ligada à presença de compostos bioativos, que diferem de acordo com a região de coleta. É comum encontrar própolis com atividades: antimicrobiana, antioxidante, antisséptica, antimicótica, bacteriostática, cicatrizante, anestésica, anti-inflamatória, antitumoral, anticarcinogênica e antiviral (MATSUDA, 2006; ANDRADE et al., 2017; MONROY et al., 2017; PEREIRA, 2008)

#### 2.3.1. Atividade Antioxidante

Muitos estudos já foram realizados com a própolis, principalmente para avaliar o potencial bioativo de seus compostos e sua atividade antioxidante. ANDRADE et al. (2017) fez uso do sistema UHPLC-MS/MS para identificação e quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides. Esse trabalho mostrou que extratos de própolis possuem altos teores de flavonoides e ácidos fenólicos, responsáveis pela alta capacidade antioxidante da própolis.

Os processos oxidativos das células produzem radicais livres que são maléficos a saúde humana, acarretando no desenvolvimento de câncer, doenças degenerativas do coração, diabetes, falhas renais, fragilidade óssea e o envelhecimento. Os radicais livres atuam formando ligações cruzadas no DNA e nas proteínas essenciais, provocando danos celulares. Quando o DNA é danificado, é necessário que a célula repare os danos, mas nem sempre isto é feito corretamente. A primeira solução para este problema seria evitar os oxidantes (geradores de radicais livres), mas a fonte pode ser muito grande: através de radiciação, resíduos de pesticidas em alimentos, frituras, álcool, etc. Uma segunda opção seria suprir o organismo com antioxidantes, que previnem os danos causados por radicais livres. Os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, presentes na própolis, possuem propriedades antioxidantes e como consequência, a capacidade de eliminar radicais livres (DAUGSCH, 2007).

#### 2.3.2. Atividade Antimicrobiana

A própolis também apresenta atividade antibacteriana, a qual é atribuída principalmente a ação dos flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres encontrados em sua resina. Seu mecanismo de ação é muito complexo e pode estar associado ao efeito sinérgico entre flavonoides, hidrácidos e sesquiterpenos (MATSUDA, 2006).

ZABAIOU et al. (2017) estudou as atividades antifúngica e antibactericida da própolis e seus efeitos sobre doenças neurodegenerativas e em terapias para tratamento de câncer. Em seus estudos foi citado que o uso terapêutico da própolis pode aumentar a eficácia da quimioterapia e reduzir alguns efeitos colaterais do tratamento.

De acordo com MARCUCCI et al. (1998) estudos realizados em extratos demonstraram que a própolis possui atividade antimicrobiana maior contra bactérias Gram-positivas e uma atividade limitada em bactérias Gram-negativas (LUSTOSA et al., 2008). O motivo desta menor atividade contra bactérias Gram-negativas ainda não é totalmente compreendido, mas pode estar relacionado a resistência destas bactérias pelo fato delas possuírem uma parede celular mais complexa e com um maior teor lipídico em relação as bactérias Gram-positivas (LUSTOSA et al., 2008).

Estudos com a própolis verde demonstraram atividades contra bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, e *Streptococcus salivarius* (FERREIRA & NEGRI, 2018)

Em testes *in vitro* já foi possível observar a atividade fungicida e fungistática de extratos de própolis contra leveduras causadoras de onicomicoses (LUSTOSA et al., 2008) e também em três morfotipos de *Candida albicans* e fungos filamentosos causadores de dermatofitose (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes*) (FERREIRA & NEGRI, 2018).

A própolis verde também já demonstrou atividade antiviral contra H1N1 influenza vírus devido a presença do ácido cafeoilquinico (Figura 3) (FERREIRA & NEGRI, 2018).

#### 2.3.3. Outras propriedades

A própolis também é conhecida pela sua atividade anti-inflamatória. Esta atividade pode estar associada à presença dos flavonoides, especialmente a galangina e ao ácido fenil ester caféico, ambos representados na Figura 4. Sua atividade anti-inflamatória ocorre pela inibição de enzimas ciclooxigenases (COX, COX-1 e COX-2) devido à presença destes compostos presentes na própolis (FERREIRA J. M., NEGRI, G. 2018).

A presença de flavonoides e compostos fenólicos também conferem a própolis atividade cicatrizante. Em um estudo realizado usando um creme à base de própolis em ferimentos demonstrou uma cicatrização mais rápida do que a cicatrização em ferimentos tratados com uma pomada cicatrizante a base de sulfadiazina de prata (LUSTOSA et al., 2008).

Há relatos de que a própolis reduz os níveis de colesterol no sangue e também pode diminuir a pressão arterial. Já demonstrou atividade contra os protozoários *Toxoplasma gondii, Trichomonas spp., Giardia lambli* e *Trypanosoma cruzi* podendo inclusive ser utilizada como uma alternativa para o tratamento da doença de Chagas. Estudos realizados com a própolis vermelha demonstraram atividade contra leishimania (LUSTOSA et al., 2008).

A própolis também está se popularizando na área odontológica, sendo um dos componentes presentes em cremes dentais e enxaguantes bucais com fins de prevenção de cáries e no tratamento de gengivites (LUSTOSA et al., 2008).

**Figura 4.** Estrutura do flavonoide galangina (a esquerda) e do ácido fenil ester caféico (a direita).

Fonte: Elaboração própria.

# 2.4. Comercialização da Própolis

A própolis, popularizada como um medicamento coadjuvante, é comercializada em diversos tipos de formulações farmacêuticas como cápsulas, sprays, extrato aquoso e extrato alcoólico (Figura 5).

Figura 5. Extratos comercias de própolis.



Fonte: Vale do mel, 2011. (a) refere-se ao extrato etanólico de própolis verde, (b) refere-se ao extrato seco da própolis verde produzido sob a forma de cápsulas, ambos comercializados pela Vale do mel (Copyright ® 2011 Vale do Mel).

De acordo com a literatura (MARCUCCI *et al*, 1998; MATSUDA, 2006), as principais análises físico-químicas para o controle de qualidade da própolis são:

- a) Análises sensoriais: coloração, aparência (viscosidade, dureza), aroma, etc;
- b) Teor de cera: o teor pode variar de acordo com a origem da própolis;
- c) Teor de resíduo (massa mecânica): resíduo seco proveniente da extração alcoólica da própolis;
- d) Teor de extrato etanólico: também chamado de extrato seco, ou teor de sólidos solúveis. É obtido após a extração da própolis em etanol e retirada de sua cera e do resíduo;
- e) Umidade: este parâmetro é muito importante, pois uma alta umidade favorece o crescimento de fungos, o que torna a própolis imprópria para o consumo;
- f) Teor de cinzas: quantifica metais presentes como potássio, sódio, chumbo, cobre, zinco, estanho, entre outros;
- g) Propriedades redutoras: é a análise do poder antioxidante da própolis;
- h) Teor de compostos fenólicos totais: compostos bioativos como ácidos (caféico, felúrico, p-cumarico, etc), ésteres (cafeato de feniletila, p-cumarato de benzila, etc) e flavonoides (quercetina, canferol, galangina, pinocembrina, etc);
- Teor de flavonoides totais: compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante da própolis, avaliada pelo teor de quercetina.

Os requisitos físico-químicos e provas qualitativas indicadas pela legislação brasileira para o padrão de identidade e qualidade da própolis bruta são (BRASIL, 2001; MATSUDA, 2006):

- a) Umidade: máximo de 8% (m/m);
- b) Cinzas: máximo de 5% (m/m);
- c) Cera: máximo de 25% (m/m);
- d) Massa mecânica: máximo de 40% (m/m);
- e) Flavonóides: mínimo de 0,5% (m/m);
- f) Solubilidade em etanol: mínimo de 35% (m/m).

Os requisitos físico-químicos indicados pela legislação brasileira para o padrão de identidade e qualidade do extrato alcoólico da própolis são (BRASIL, 2001; MATSUDA, 2006):

- a) Extrato seco: mínimo de 11% (m/v);
- b) Cera: máximo de 15% do extrato seco (m/m);
- c) Flavonóides: mínimo de 0,25% (m/m);
- d) Compostos fenólicos: mínimo de 0,50% (m/m);
- e) Teor alcoólico: máximo de 70°GL (v/v).

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material

A própolis estudada foi a própolis verde, referente a florada de *Baccharis dracunculifolia* da cidade de Muzambinho-MG, coletada em setembro de 2017. A matéria prima foi cedida pela empresa Apiários Vale do Mel Indústria e Comércio LTDA e foi armazenada no Laboratório de Biopolímeros Agroindustriais do Departamento de Química -FFCLRP (Ribeirão Preto, SP) a -20 °C.

## 3.2. Obtenção das frações de própolis

A própolis *in natura* congelada a -20°C foi batida em um liquidificador doméstico (Oster) e depois peneirada utilizando peneiras de 35 Mesh, 45 Mesh, 80 Mesh e 100 Mesh, obtendo-se frações com diferentes tamanhos de partícula. As frações foram nomeadas como A, B, C, D, e G e correspondem à fração que foi retida na peneira de 35 Mesh (G), fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh (D), fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh (C), fração que ficou retida na peneira de 100 Mesh (B) e a fração que passou pela peneira de 100 Mesh.

As frações de própolis foram caracterizadas quanto ao seu tamanho de partícula, parâmetros de cor, micrografia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teor de umidade, teor de cinzas e atividade antioxidante por DPPH.

## 3.3. Obtenção do extrato etanólico das frações de própolis

O extrato etanólico das frações de própolis *in natura* foi produzido a partir de 2 g de própolis, o qual foi colocado em um balão de fundo redondo com 100 mL de etanol 70%. Esta mistura foi submetida a refluxo por 6 horas em uma manta aquecedora a 60°C, e após, filtrada em um papel de filtro seco (SILVA, 2013).

O extrato etanólico das frações de própolis foi caracterizado em função a sua atividade antioxidante por ABTS, teor de ceras, massa mecânica, teor de sólidos solúveis, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides. Essas metodologias são descritas nos próximos itens.

# 3.4. Obtenção do extrato aquoso das frações de própolis

O extrato aquoso das frações de própolis foi produzido a partir de 10 g de própolis com diferentes tamanhos de partículas (x<sub>1</sub>), o qual foi colocado em um erlenmeyer com 50 mL de solução de hidróxido de sódio a diferentes concentrações (x<sub>3</sub>). As misturas foram submetidas a agitação a diferentes tempos (x<sub>2</sub>) previsto de acordo com o protocolo do ensaio em temperatura ambiente, e após, filtrada em um papel de filtro seco (SILVA, 2013).

As extrações aquosas foram realizadas segundo a matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) (Tabela 1), onde foi avaliado o efeito das variáveis: tamanho de partícula (x<sub>1</sub>: A, C, D, G e N)), tempo de extração (x<sub>2</sub>: 2, 4, 7, 10 e 12 h) e concentração de álcali (x<sub>3</sub>: 1,6, 5, 10, 15 e 18,4%) sobre o pH do extrato, teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides, massa mecânica (resíduo da extração) e teor de sólidos solúveis (extrato seco).

O extrato aquoso das frações de própolis foi caracterizado em função de sua massa mecânica, teor de sólidos solúveis, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides seguindo os mesmos procedimentos como foi realizado para o extrato etanólico.

**Tabela 1.** Matriz do planejamento DCCR 2<sup>3</sup> para a extração aquosa do própolis.

Ensaio	Fração	Tempo (h)	NaOH em (g/L)
1	C (-1)	4 (-1)	5 (-1)
2	G (1)	4 (-1)	5 (-1)
3	C (-1)	10(1)	5 (-1)
4	G (1)	10(1)	5 (-1)
5	C (-1)	4 (-1)	15 (1)
6	G (1)	4 (-1)	15 (1)
7	C (-1)	10(1)	15 (1)
8	G (1)	10(1)	15 (1)
9	A (-1,68)	7 (0)	10 (0)
10	N (1,68)	7 (0)	10 (0)
11	D (0)	2 (-1,68)	10 (0)
12	D (0)	12 (1,68)	10 (0)
13	D (0)	7 (0)	1,6 (-1,68)
14	D (0)	7 (0)	18,4 (1,68)
15	D (0)	7 (0)	10 (0)

Fonte: Elaboração própria. Os valores entre parênteses representam os valores codificados pela matriz estatística, e os valores fora dos parênteses representam os valores reais. Os ensaios de 1 à 14 foram realizados em duplicata. O ensaio 15 foi realizado em triplicata. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 100 Mesh; N representa a fração que foi apenas triturada, sem ser peneirada.

#### 3.5. Caracterização das frações e dos extratos de própolis

# 3.5.1. Distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis

A distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis foi determinada por difração de laser com espalhamento estático de luz (DLS) usando um Difratômetro Laser (BeckmanCoulter, LS 13320, EUA), em módulo tornado para análise de amostras.

# 3.5.2. Parâmetros de cor da própolis

Os parâmetros de cor das frações de própolis *in natura* foram avaliados com auxílio de um colorímetro portátil MiniScan XE (Hunterlab, Riston, Virginia, EUA) de acordo com o método HUNTERLAB (1997). Para determinar a cor, os valores de L\*, a\* e b\* foram obtidos de acordo com as coordenadas da escala CIE Lab (*Commission Internationale* de 1'Eclairage L\*, a\*, b\*). O parâmetro L\* representa a luminosidade que varia de 0 a 100, sendo que valores mais próximos a 100 representam amostras mais claras, e os valores próximos a 0, as mais escuras. A cromaticidade é definida por a\*, coordenada que varia do vermelho (+a\*) ao verde (-a\*), e por b\*, coordenada que varia do amarelo (+b\*) ao azul (-b\*). As medidas foram conduzidas em triplicata. A cor foi expressa como a diferença de cor total (ΔΕ\*) e foi calculada pela equação 1:

$$\Delta E * = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$
 (1)

Onde:  $\Delta E^*$ : diferença total da amostra em relação a um padrão ou referência.  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$  e  $\Delta L^*$  são as diferenças entre os parâmetros das amostras e do branco ( $a^*$  =-0,77,  $b^*$ =1,40,  $L^*$ =93,49, valores referentes a uma amostra de amido).

#### 3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As frações de própolis foram recobertas com ouro usando o metalizador e evaporador Bal-Tec SCD 050, e depois submetidas ao Microscópio eletrônico de varredura (MEV) (ZEISS, EVO-50), com a voltagem de aceleração de 20,00 kV.

## 3.5.4. Teor de umidade das frações da própolis in natura

A determinação de umidade foi realizada segundo o método gravimétrica nº 920.151 da AOAC (AOAC-920.151, 1997). 1,0 g de amostra foi pesada em um cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi colocada em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, Q314M292, Brasil) a 105°C durante 1 hora. O teor de umidade foi calculado pela equação 2:

$$\%Umidade = \frac{M\acute{a}gua}{MA}x100 \tag{2}$$

Sendo:  $M_{água}$ : massa de água (a diferença entre a massa da amostra úmida e a amostra seca) e  $M_A$ : massa da amostra úmida.

# 3.5.5. Determinação de cinzas das frações da própolis in natura

A determinação de cinzas foi realizada segundo o método gravimétrico nº 923.03 da AOAC (AOAC-923.03, 1997). 1,0 g de amostra foi incinerada em uma mufla (QUIMIS, Q318M24, Brasil) a 650°C por 2 horas. O teor de cinzas foi calculado pela equação 3:

$$\%Cinzas = \frac{Mc}{MA}x100 \tag{3}$$

Sendo:  $M_C$ : massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho contendo as cinzas e o cadinho vazio) e  $M_A$ : massa da amostra.

## 3.5.6. Atividade antioxidante por DPPH das frações da própolis in natura

A atividade antioxidante da própolis pode ser medida através da reação do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) com os flavonoides da própolis. A solução metanólica do radical DPPH possui coloração púrpura e absorve no comprimento de onda (λ) 517nm. Quando esta solução entra contato com flavonoides é reduzida a DPPH<sub>2</sub> de coloração amarelada. Esse decréscimo na absorbância em 517nm é monitorado para o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante usando a equação 4:

$$\%AA = 1 - \frac{A(amostra)}{A(contole)}$$
 (4)

Onde: *A(amostra)*: valor de absorbância da amostra obtido e *A(controle)*: Valor de absorbância da solução metanólica de DPPH 0,06mM (Branco).

As amostras foram preparadas pesando 200 mg de própolis *in natura* e adicionando 4mL de metanol, deixando em agitação por 3 horas em temperatura ambiente e protegido de luz. Em um tubo falcon, adiciona-se 500 μL do extrato metanólico de própolis e 2 mL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM. Após 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente e protegido da luz, foi obtida a absorbância do DPPH remanescente a 517 nm.

#### 3.5.7. Atividade antioxidante por ABTS dos extratos de própolis

Além do método de DPPH, a atividade antioxidante pode ser determinada através da estabilização do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) na presença de um reagente oxidante. Essa metodologia é utilizada para medir a atividade antioxidante tanto de compostos hidrofílicos, quanto lipofílicos (RUFINO, 2014).

A solução de radical ABTS· $^+$  foi preparada a partir de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 mM com 88  $\mu$ L de solução de  $K_2SO_5$  140 mM. Após 16 horas em um ambiente escuro e refrigerado, foi retirado 1 mL desta solução e diluído em etanol até obter uma absorbância de 0,70  $\pm$  0,05 a 734nm (RUFINO, 2014).

A curva de calibração pode ser construída usando soluções de Trolox em etanol com concentrações variando entre  $100 \, \mu M$  e  $2000 \, \mu M$ , e pela leitura de suas absorbâncias em espectrofotômetro com  $\lambda = 734 \, \text{nm}$  (RUFINO, 2014).

No tubo de cada amostra foi adicionado 3 mL da solução de radical ABTS· $^+$  e 30  $\mu$ L da solução padrão de Trolox. No tubo branco foi utilizado apenas etanol. Após aguardar 6 min sob agitação, cada amostra foi submetida ao espectrofotômetro com  $\lambda$  = 734 nm em uma cubeta de vidro referenciada pela cubeta contendo o branco (RUFINO, 2014).

A equação da reta da curva padrão obtida para a obtenção da atividade antioxidante expressa em mg/mL de equivalente em Trolox, bem como o valor de seu  $R^2$  esta apresentada a seguir:

$$y = -1,16187x + 0,84155$$
  $R^2 = 0,997$  (5)

Onde: x representa o valor da absorbância, e y representa a atividade antioxidante expressa em mg/mL de equivalente em Trolox. O  $R^2$  é o coeficiente de determinação que varia de 0 a 1, indicando, em porcentagem, o quanto este modelo consegue explicar os valores observados.

O procedimento para análise dos extratos é semelhante ao utilizado na construção da curva padrão:

No tubo de cada amostra, foi adicionado 3 mL da solução de radical ABTS· $^+$  e 30  $\mu$ L da amostra diluída 20 vezes. No tubo branco foi utilizado apenas etanol. A diluição foi necessária, pois os extratos de própolis possuem alta atividade antioxidante. Após aguardar 6 min sob agitação, a absorbância de cada amostra foi medida em um espectrofotômetro a  $\lambda=734$  nm usando uma cubeta de vidro referenciada pela cubeta contendo o branco.

Com os valores obtidos das análises e a reta obtida pela curva padrão foi possível determinar as concentrações de flavonoides em cada extrato. O valor final de *y* obtido por essa equação deve ser multiplicado por 20 para correção da diluição realizada.

#### 3.5.8. Massa mecânica dos extratos das frações da própolis

A massa mecânica é a massa da própolis que ficou retida no processo de filtração para obter o extrato. O papel filtro é previamente seco na estufa a 105°C até peso constante e tarado. Posteriormente filtra-se o extrato, e seca-se o papel de filtro com o substrato na estufa até peso constante (SILVA, 2013). Por fim, calcula-se a percentagem da massa mecânica usando a equação 6:

$$\%Massa\ Mec \\ anica = \frac{Mr}{Mp}x100$$
 (6)

Sendo: *Mr*: massa do resíduo sólido seco resultante da extração (diferença entre a massa do papel de filtro contendo o resíduo e este vazio) e *Mp*: massa de própolis inicial.

#### 3.5.9. Teor de ceras dos extratos etanólicos de própolis

Após o extrato ser filtrado, o mesmo foi colocado no freezer a -20°C por 12 horas para decantar a cera. O extrato foi então centrifugado durante 10 minutos a 0°C na velocidade de 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e armazenado. A cera foi seca em estufa a 80°C durante 1 hora e sua massa foi aferida para determinar o teor cera, usando a equação 7:

$$\%Cera = \frac{Mc}{Mp}x100 \tag{7}$$

Onde: *Mc*: massa do resíduo de cera e *Mp*: massa de própolis inicial.

# 3.5.10. Teor de sólidos solúveis dos extratos de própolis

Inicialmente, pesa-se uma placa de Petri em balança analítica, coloca-se 1,0 mL do extrato de própolis *in natura* na placa e registra-se a sua massa. Este procedimento foi

realizado em triplicata para cada amostra de extrato etanólico de própolis. Posteriormente, as placas de Petri foram secas em estufa a 80°C por meia hora. As placas foram esfriadas em um dessecador e pesadas. Para o cálculo do teor de sólidos solúveis (também chamado de extrato seco) nos extratos foi utilizado a equação 8:

$$\%S\'olidos Sol\'uveis = \frac{Mf}{Mp} x 100$$
 (8)

Onde: *Mf*: massa do extrato seco (Massa da placa com extrato seco menos a massa da placa previamente registrada) e *Mp*: massa de própolis inicial.

#### 3.5.11. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis

A concentração dos ácidos fenólicos pode ser determinada usando o reagente de Folin-Ciocalteu e Carbonato de Sódio (ANDRADE et al., 2017; MONROY et al., 2017). Nesta técnica, o Tungstênio e o Molibdênio, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu (no estado de oxidação 6+), quando em contato com certos agentes redutores, no caso os ácidos fenólicos, são reduzidos formando os chamados Molibdênio azul e Tungstênio azul, cuja coloração permite determinar a concentração dessas substancias redutoras por espectrofotometria (SOUZA, 2007; ANDRADE et al., 2017).

A curva de calibração para ácidos fenólicos foi construída usando soluções de ácido gálico com concentrações variando entre 0,5 mg/mL e 3,0 mg/ml, e posteriormente, pela leitura de suas absorbâncias em espectrofotômetro com  $\lambda$ = 760 nm (SILVA, 2013; ANDRADE et al., 2017).

No tubo de cada amostra foi adicionado 4,25 mL de água, 10  $\mu$ L da solução padrão, 250  $\mu$ L de Folin (1:1) e 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20% m/v). No tubo branco foi adicionado 4,25 mL de água, 250  $\mu$ L de Folin (1:1) e 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20% m/v). Após aguardar uma hora, cada amostra foi submetida ao espectrofotômetro com  $\lambda$  = 760 nm em uma cubeta de vidro referenciada pela cubeta contendo o branco (SILVA, 2013).

Com os valores obtidos foi possível traçar um gráfico e obter uma equação de reta para ser aplicada no cálculo das concentrações de compostos fenólicos nos extratos obtidos da caracterização da própolis *in natura*.

A equação da reta, determinada pela construção da curva padrão, para obtenção do teor de compostos fenólicos expressos em mg/mL de ácido gálico, bem como o valor de seu R<sup>2</sup> esta apresentada a seguir:

$$y = 3,6078x + 0,1365$$
  $R^2 = 0,9896$  (9)

Onde, *x* representa o valor da absorbância, e *y* representa a concentração de ácidos fenólicos expressos em mg/mL de equivalente de ácido gálico. O R<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação, que varia de 0 a 1, indicando, em percentagem, o quanto este modelo consegue explicar os valores observados.

O procedimento para análise dos extratos é semelhante ao utilizado na construção da curva padrão:

No tubo de cada amostra, foi adicionado 4,25 mL de água,  $10~\mu L$  do extrato diluído 2 vezes,  $250~\mu L$  de Folin (1:1) e  $500~\mu L$  de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20% m/v). Foi feito um tubo branco no qual foi adicionado 5,0 mL de água e  $10~\mu L$  do extrato diluído 2 vezes. A diluição foi necessária para que os valores obtidos de absorção não ultrapassassem o intervalo da curva padrão. Após aguardar uma hora, a absorbância de cada amostra foi obtida em um espectrofotômetro usando  $\lambda = 760~\text{nm}$  em uma cubeta de vidro referenciada pela cubeta contendo o branco (SILVA, 2013).

Com os valores obtidos das análises e a reta obtida pela curva padrão foi possível determinar as concentrações de compostos fenólicos em cada extrato. O valor final de "y" obtido por essa equação deve ser multiplicado por 2 para correção da diluição realizada.

#### 3.5.12. Teor de flavonoides totais dos extratos de própolis

O teor de flavonoides totais foi medido por espectrofotometria pela sua reação com cloreto de alumínio, na qual, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em etanol resultando em uma intensificação da absorção em comprimentos de onda maiores do que na ausência do alumínio (ANDRADE et al., 2017; MONROY et al., 2017; SILVA, 2013).

A curva de calibração para flavonoides pode ser construída usando soluções de quercetina em etanol 70% com concentrações variando entre 0,05 mg/mL e 0,60 mg/mL, e pela leitura de suas absorbâncias em espectrofotômetro com  $\lambda$ = 425 nm.

No tubo de cada amostra, foi adicionado 4,8 mL de etanol 70%, 100  $\mu$ L da solução padrão e 100  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> (10% m/v). No tubo branco foi adicionado 4,9 mL de etanol 70% e 100  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> (10% m/v). Após aguardar meia hora, foi lida a absorbância de cada amostra usando um espectrofotômetro a  $\lambda$  = 425 nm em uma cubeta de vidro referenciada pela cubeta contendo o branco.

A partir dos valores obtidos foi possível obter a equação da reta da curva padrão para ser aplicada no cálculo do teor de flavonoides nos extratos obtidos da caracterização da própolis *in natura*.

A equação da reta, determinada pela construção da curva padrão, para obtenção do teor de flavonoides expressos em mg/mL de quercetina, bem como o valor de seu  $R^2$  esta apresentada a seguir:

$$y = 0.6273x - 0.0016$$
  $R^2 = 0.9981$  (10)

Onde, x representa o valor da absorbância, e y representa a concentração de flavonoides expressos em mg/mL de equivalente de quercetina. O  $R^2$  é o coeficiente de determinação, que varia de 0 a 1, indicando, em percentagem, o quanto este modelo consegue explicar os valores observados.

O procedimento para análise dos extratos é semelhante ao utilizado na construção da curva padrão:

 $100~\mu L$  das amostras diluída 5 vezes foram adicionadas de 4,8 mL de etanol 70% e de  $100~\mu L$  de AlCl<sub>3</sub> (10%~m/v). O branco contém 4,9 mL de etanol 70% e  $100~\mu L$  de AlCl<sub>3</sub> (10%~m/v). A diluição da amostra foi necessária para que os valores de absorção não ultrapassassem o intervalo da curva padrão. Após aguardar meia hora, foi realizada a leitura da absorbância de cada amostra usando e do branco a  $\lambda = 425~nm$ .

Com os valores de absorbância foi possível determinar as concentrações de flavonoides em cada extrato utilizando a equação da curva padrão (equação 10). O valor final de "y" obtido por essa equação deve ser multiplicado por 5 para correção da diluição realizada.

#### 3.6. Produção e caracterização dos extratos otimizados

A partir dos resultados obtidos pelo DCCR, foi possível produzir 03 extratos otimizados, que foram caracterizados quanto à massa mecânica, teor de sólidos solúveis, teor de flavonoides e teor de compostos fenólicos totais, como descrito nos itens anteriores. Além disso, foram realizados os testes microbiológicos para avaliar a qualidade microbiológica dos extratos e a atividade antimicrobiana.

#### 3.6.1. Determinação da qualidade microbiológica dos extratos

Este teste foi realizado para verificar a presença de bactérias e fungos nos extratos otimizados aquosos de própolis. O teste também foi realizado para um extrato etanólico comercial para fins de comparação.

Em placas de Petri esterilizadas foram adicionados 20 mL de meio de cultura Agar Triptona de Soja, TSA (favorável para crescimento de bactérias) e em outras placas foram adicionados 20 mL do meio de cultura Agar Batata Dextrose, PDA (favorável para crescimento de fungos) e armazenadas em geladeira a 10°C. Após 24 horas, foi adicionado 100 μL de extrato sobre a superfície das placas. O extrato foi espalhado usando uma alça de Drigalski esterilizada, e após isso, as placas contendo TSA foram incubadas a 37°C e as placas contendo PDA foram incubadas a 28°C, ambas por 48 horas. Após este período, as placas foram fotografadas.

#### 3.6.2. Determinação da atividade antimicrobiana usando o teste do Halo

Inicialmente, os microrganismos foram ativados utilizando a técnica de semeadura em superfície com um meio de cultura adequado. A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, as bactérias gram-negativas tais como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram inoculadas em meio de cultura TSA (Trypticase Soy Agar) e incubadas a 37°C por 24 horas. Enquanto, a levedura *Candida albicans* foi inoculada em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e incubada a 28°C também por 24 horas. Após o tempo de incubação, cada meio foi re-suspenso em solução fisiológica 0,9% (p/v)

até obter-se turvação equivalente ao padrão 1 da escala de Mac Farland, correspondente a aproximadamente 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL.

Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi adicionada sobre a superfície das placas contendo meios de cultura e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos 03 extratos aquosos otimizados foi empregado o método de difusão em ágar utilizando discos brancos estéreis de 6 mm de diâmetro. Para o disco controle foi utilizado 20µL de solução aquosa de NaOH com pH próximo ao pH dos extratos otimizados. Nas placas também foram colocados discos contendo 20 µL de cada extrato de própolis otimizado.

Nas placas foram distribuídos 05 discos, usando pinças esterilizadas, sempre na mesma ordem e respeitando as distancias para evitar interferência entre os possíveis halos de inibição. Após este procedimento, as placas foram fechadas, invertidas e incubadas a 37°C para bactérias e 28°C para leveduras durante 48 horas. Placas contendo só o meio de cultura e os microrganismos também foram incubadas para controle do teste. Após o período e incubação, as placas foram fotografadas.

#### 3.7. Análise estatística

#### 3.7.1. Teste de comparação de médias

Para avaliar as diferenças significativas entre as características físico-químicas das frações de própolis foi realizado a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey utilizando um nível de significância de 5% (p<0,05). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software PAST.

# 3.7.2. Metodologia de Superfície de Resposta para a otimização da extração aquosa da própolis

Para otimizar o processo de extração aquosa de própolis foi elaborado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)  $2^3$  com um total de 31 ensaios, sendo 08 pontos fatoriais (-1 e +1), 6 pontos axiais (-1.68, +1,68), e 3 pontos centrais (0,0,0). O DCCR permitiu avaliar o efeito dos fatores de estudo: tamanho de partícula (x<sub>1</sub>), tempo de extração (x<sub>2</sub>) e concentração da solução de NaOH (x<sub>3</sub>) sobre o pH do extrato, o teor de compostos fenólicos, o teor de flavonoides, a massa mecânica (resíduo da extração) e o teor de sólidos solúveis (extrato seco) (ver Tabela 1).

A análise estatística foi realizada usando o programa STATISTICA 10.0 (StatSoft), que possibilita a determinação dos efeitos dos fatores e de suas interações sobre as propriedades medidas nos extratos.

Esta análise também permite ajustar os dados experimentais a um modelo matemático polinomial de segunda ordem (Equação 11), cuja significância é avaliada pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste F considerando 95% de intervalo de confiança. Os modelos significativos e preditivos nos permitem obter a superfície de resposta para cada variável medida.

$$Y_{i=} b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2$$

$$(11)$$

#### Sendo:

Yi = Resposta;

 $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  = variáveis independentes ou fatores de estudo;

 $b_0$  = coeficiente relativo à interpretação do plano com o eixo resposta;

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> e b<sub>3</sub> = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

 $b_{11}$ ,  $b_{22}$  e  $b_{33}$  = coeficientes das variáveis quadráticas;

 $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{23}$  = coeficientes de interação entre as variáveis independentes.

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 4.1. Caracterização físico-química das frações de própolis e de seus extratos etanólicos

#### 4.1.1. Aspecto visual das frações de própolis

A imagem das frações de própolis *in natura* obtidas após a moagem e peneiragem usando peneiras de 35 Mesh, 45 Mesh, 80 Mesh e 100 Mesh são mostradas na Figura 6. Observa-se diferença na coloração e no tamanho de partículas entre as diferentes frações de própolis. Como a fração G corresponde à fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh (diâmetro 0,500 mm), a fração D é aquela que ficou retida na peneira de 45 Mesh (diâmetro 0,354 mm), a fração C é aquela que ficou retida na peneira de 80 Mesh (diâmetro 0,177 mm), a fração B aquela que ficou retida na peneira de 100 Mesh (diâmetro 0,149 mm) e a fração A é aquela que passou pela peneira de 100 Mesh. Entretanto, a moagem e peneiragem da própolis *in natura* permitiu obter frações mais homogêneas e com menos resíduos de plantas. Por outro lado, também pode ser observado que as frações mais finas apresentaram coloração amarelada enquanto que as frações mais grossas apresentaram tons mais escuros (D e G).

Própolis in Natura

Própolis moída
(Controle)

Peneiragem

D

G

Figura 6. Própolis in natura e suas frações.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.1.2. Rendimento e distribuição do tamanho de partículas das frações da própolis

A Tabela 2 mostra os rendimentos de cada fração no processo de moagem a frio e peneiragem. Nesta tabela pode ser observada que 17,5% da própolis moída corresponde à fração que passou pela peneira de 100 Mesh (A). As frações intermediárias de 80 e 45 Mesh apresentaram maior rendimento no processo de peneiragem (C e D), portanto, ambas as frações podem ser consideradas as mais predominantes na própolis moída a frio.

**Tabela 2.** Frações da Própolis *in natura* moída.

Peneira	Amostra	Rendimento (%)
<100 Mesh	A	17,5
100 Mesh	В	9,4
80 Mesh	C	29,2
45 Mesh	D	27,8
35 Mesh	G	16,1

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh.

A Figura 7 apresenta a distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis obtidas por difração de laser com espalhamento estático de luz.

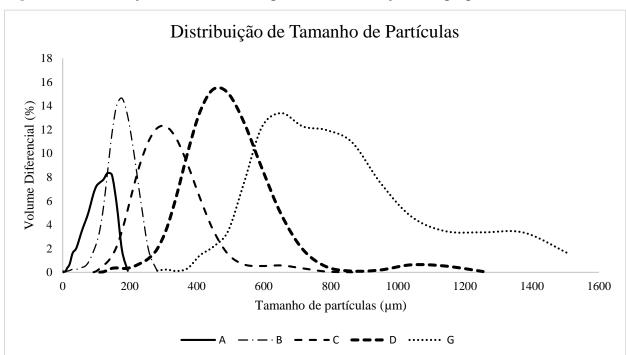


Figura 7. Distribuição do tamanho de partículas das frações de própolis in natura.

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh.

Na Figura 7 pode ser observado que as frações B, C e D apresentaram distribuição de tamanho de partícula unimodal, com presença de um pico principal com diâmetro médio de partícula de 185, 324 e 471 µm, respetivamente (Tabela 3). Entretanto, a fração A e G apresentaram distribuição polimodal com presença de 3 e 4 picos, respectivamente.

Também foi observado que a fração A apresentou o menor diâmetro de partícula quando comparado com as outras frações, com presença de picos em diâmetros de partículas de 40 μm, 100 μm e um pico principal em 140 μm. Entretanto, a fração G apresentou maior tamanho de partícula quando comparado com as outras frações de própolis, com presença de picos em 450, 684, 900 e 1400 μm, com predominância do pico com diâmetro médio de partícula de 684 μm. Isto pode ser justificado pela presença de resíduos de madeira ou fibras nesta fração, como pode ser observado na Figura 6, os quais podem ser responsáveis pela alta variação na granulometria da fração. Portanto, pode-se dizer que o processo de moagem e peneiragem permitiu obter frações mais homogêneas, como a B, C e D, livres de partículas estranhas que estão presentes na própolis *in natura*.

Os valores d50, que representa o tamanho máximo apresentado por 50% das partículas na fração de própolis; e d90, que representa o tamanho máximo apresentado por 90% das partículas da fração também confirmam a diferença no tamanho de partícula entre as frações de própolis obtidas por moagem e peneiragem, tal como pode ser observado na Tabela 3.

Os valores de d90 mostram que 90% das partículas da fração A apresentaram um diâmetro de 157 µm, isto significa que este valor é o mínimo diâmetro de partícula que pode ser obtida com a metodologia empregada neste trabalho. Além disso, pode-se dizer que a metodologia empregada permitiu reduzir em quase 8 vezes o diâmetro de partícula da fração mais grossa (G), que foi de 1197 µm.

Tabela 3. Diâmetro médio, d50 e d90 das frações de própolis in natura.

Amostra	Diâmetro médio (µm)	d50 (µm)	d90 (μm)
A	140	96,9	157
В	185	171	229
C	324	300	431
D	471	479	644
$\mathbf{G}$	684	768	1197

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh.

#### 4.1.3. Parâmetros de cor das frações de própolis

Os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e a diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) das frações de própolis moída e peneirada estão apresentadas na Tabela 4:

**Tabela 4.** Parâmetros de cor (L\*, a\*, b\* e  $\Delta E$ \*) das frações de própolis.

Frações	L*	a*	<b>b</b> *	<b>ΔE</b> *
A	$39.8 \pm 0.05^{a}$	$7,0 \pm 0,1^{b}$	$30.8 \pm 0.3^{a}$	$61,7 \pm 0,1^{a}$
В	$33,0\pm0,2^b$	$7,6 \pm 0,1^a$	$25,8\pm0,3^b$	$65,8 \pm 0,2^{b}$
$\mathbf{C}$	$27,1\pm0,1^d$	$7,0\pm0,2^{\rm b}$	$18,6\pm0,3^{\rm d}$	$69,0 \pm 0,1^{d}$
D	$23.8 \pm 0.3^{e}$	$5,2\pm0,2^{\rm c}$	$13.8 \pm 0.3^{e}$	$71,0 \pm 0,3^{e}$
$\mathbf{G}$	$22.8 \pm 0.3^{\rm f}$	$3,9\pm0,2^{\rm d}$	$12,2\pm0,6^{\rm f}$	$71{,}7\pm0{,}4^{\mathrm{f}}$
Controle	$32,4 \pm 0,05^{c}$	$6,1\pm0,1^{\mathrm{b}}$	$24,3 \pm 0,3^{c}$	$65,6 \pm 0,1^{c}$

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

Na Tabela 4 pode ser observado que todas as frações de própolis apresentaram baixa luminosidade ( $L^* < 100$ ), isto significa que as frações apresentaram coloração escura, principalmente as frações de maior tamanho de partícula (G e D), que correspondem às frações obtidas na peneiragem usando peneiras de 35 e 45 Mesh, respectivamente. Por outro lado, a fração de menor tamanho de partícula (A) apresentou maior luminosidade do que as outras frações e do que o controle segundo o teste de Tukey (P < 0,05).

Com relação ao parâmetro de cor a\*, pode ser observado que todas as frações assim como o controle apresentaram valores de a\* (+) na faixa de 3,9 a 7,6, o que significa que todas as frações de própolis apresentaram tons avermelhados. Também se observa que houve diferença significativa segundo o teste de Tukey (p < 0,05) entre os valores de a\* das frações. Assim, a medida que o diâmetro de partícula da fração de própolis diminuiu, foi observado um aumento do valor de a\*, indicando maiores tons avermelhados nas frações mais finas. A fração controle também apresentou maiores tonalidades vermelhas do que as frações mais grossas (D e G).

Os valores do parâmetro b\* (+) das frações de própolis e do controle revelaram que estes materiais apresentaram tons amarelados, pois estes valores foram positivos. Entretanto, foi observado que essa tonalidade foi intensificada à medida que foi reduzido o tamanho de partícula. Portanto, a fração mais fina (A) apresentou tons mais amarelados

do que as outras frações e do que o controle, segundo o teste de Tukey (p < 0.05). Esta diferença na cor das frações de própolis pode indicar uma diferença no conteúdo dos compostos bioativos presentes na própolis, que serão analisadas nos seguintes itens.

#### 4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das frações de própolis

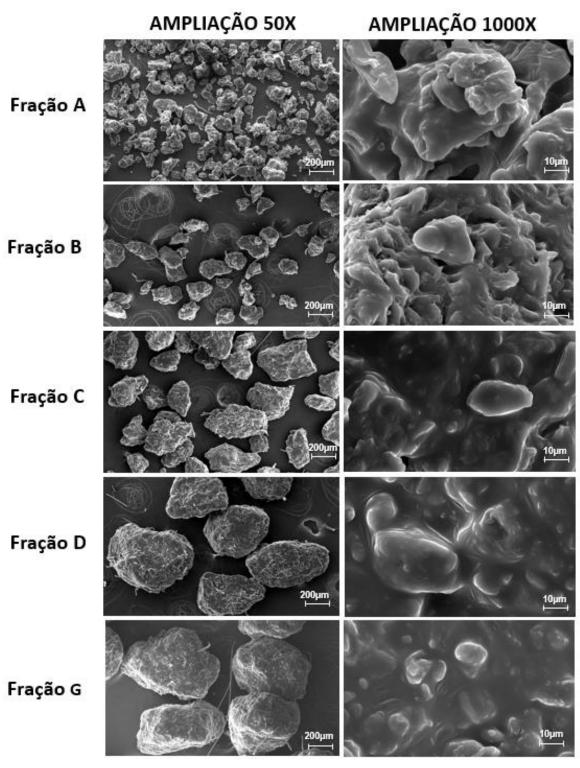
A Figura 8 apresenta as micrografias das frações de própolis obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A partir das ampliações de 50 vezes podemos confirmar visualmente a diferença na granulometria das frações, onde é possível constatar que as frações D e G possuem diâmetro médio de partícula acima de 200 μm enquanto que as frações B e A, que foram submetidas peneiras de menor diâmetro de abertura (0,177 mm e 0,149 mm, respectivamente), possuem diâmetro médio de partícula abaixo de 200 μm.

Durante o processo de trituração e peneiragem, a própolis recebe energia cinética, que ao ser dissipada na forma de energia térmica favorece a fusão de sua cera. Isso faz com que a própolis tenha característica grudenta e pegajosa. O processo de peneiragem auxilia na retenção de parte da cera presente nas frações de própolis, porém, ainda na fração mais fina é possível encontrar cera.

Com as imagens de ampliações de 1000 vezes, é possível observar a superfície das partículas das frações de própolis. Assim, observa-se partículas com superfícies lisas que indicariam a presença de cera nestes materiais.

Podemos também afirmar que não há presença de outras substâncias estranhas ou contaminantes nas frações analisadas.

Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: Imagens de frações de própolis recobertas com ouro usando ometalizador e evaporador Bal-Tec SCD 050, e depois submetidas ao Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO 50.

#### 4.1.5. Umidade e cinzas das frações de própolis

A Tabela 5 mostra os teores de umidade e cinzas do controle e das frações de própolis obtidas por moagem a frio e peneiragem. Observa-se que houve diferença no teor de umidade entre as frações de própolis analisadas, segundo o teste de Tukey (p<0,05). Assim, a medida que diminuiu o tamanho de partícula, como a fração A e B, o teor de umidade aumentou nestas frações. Então, as amostras mais finas foram mais úmidas do que as amostras mais grossas, como a amostra G, a qual apresentou teor de umidade similar ao controle. Isto indicaria que as amostras mais grossas podem apresentar maior conteúdo de compostos hidrofóbicos quando comparado com as amostras mais finas (A e B). Como o controle também apresentaria maior conteúdo de compostos hidrofóbicos, como as ceras, seu teor de umidade foi semelhante à fração G.

Com relação ao teor de cinzas, na Tabela 5 pode ser observado que houve uma ligeira diferença entre o teor de cinza das frações de própolis e o controle.

Tabela 5. Teor de umidade e teor de cinzas das frações de própolis.

Frações	Umidade (%)	Cinzas (%)
A	$9.8 \pm 0.1^{b}$	$3,1 \pm 0,1^{a,b}$
В	$10.5 \pm 0.1^{a}$	$3.1 \pm 0.04^{a,b}$
C	$8,4 \pm 0,1^{c}$	$3,3 \pm 0,01^{a}$
D	$8.7 \pm 0.21^{\circ}$	$3,3 \pm 0,02^{a}$
G	$7.8 \pm 0.11^{d}$	$3.0 \pm 0.01^{b}$
Controle	$7.9 \pm 0.11^{d}$	$3.0 \pm 0.2^{b}$

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

# 4.1.6. Massa mecânica, teor de cera e extrato seco (sólidos solúveis) dos extratos etanólicos das frações de própolis.

A determinação da massa mecânica indica a quantidade de resíduo que sobrou após o processo de extração da própolis, enquanto a análise de extrato seco está diretamente relacionada com a qualidade da extração, pois informa a quantidade de sólidos solúveis presentes no extrato.

A Tabela 6 mostra que a fração "A" apresentou o maior valor de massa mecânica (44,4%), o que resultou no menor teor de extrato seco (1,1%) indicando um menor rendimento na extração da própolis. Por outro lado, frações mais grossas, como a fração B, C, D e G, apresentaram menores valores de massa mecânica, porém maiores teores de extrato seco do que a fração A, sendo semelhante ao controle (própolis *in natura*). Isto indicaria que tamanhos de partículas da fração de própolis em torno de 140 μm (fração A) não permitiram obter bom rendimento na extração dos compostos bioativos da própolis.

Em relação ao teor de cera, observado na Tabela 6, é possível notar que este diminuiu à medida que diminuiu o tamanho de partícula das frações de própolis. Assim, pode-se dizer que a peneiragem permitiu diminuir até 2,3% do teor de cera da própolis *in natura*, obtendo-se frações com menor teor de ceras, como a fração mais fina A, e frações mais grossas, que ainda apresentam um teor importante de cera, como as frações C, D e G. Como todas as frações contém ceras, pode-se dizer que as ceras estão fortemente aderidas na própolis, recobrindo ou talvez retendo os compostos bioativos, como uma forma de proteção destes compostos às condições externas do meio ambiente.

O controle destacou-se das frações por apresentar o maior teor de ceras (5,6%). Isso pode ser justificado pelo fato deste não ter passado por nenhuma peneira. Durante o processo de peneiragem foi observado que parte da cera da própolis moída ficava retida nas peneiras. Como o controle não passou por nenhuma peneira, ele não sofreu perda de cera, o que foi comprovado com este resultado.

**Tabela 6.** Massa mecânica, teor de ceras e extrato seco (sólidos solúveis) dos extratos etanólicos das frações de própolis.

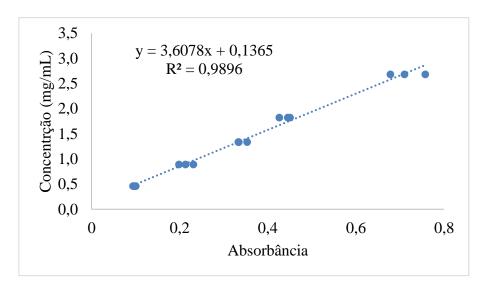
Amostra	Massa mecânica (%)	Teor de cera (%)	Extrato Seco (%)
A	$44,4 \pm 3^{a}$	$3,3 \pm 0,6^{a,b}$	$1,1 \pm 0,1^{a}$
В	$39.8 \pm 0.4^{b}$	$3,4 \pm 0,4^{c}$	$1,2\pm0,1^a$
C	$38,2 \pm 0,3^{b}$	$4,4 \pm 0,1^{b,c}$	$1,3 \pm 0,1^{a}$
D	$36,6 \pm 1,6^{b}$	$4,7 \pm 0,1^{b,c}$	$1,4\pm0,1^a$
G	$37.9 \pm 0.7^{b}$	$4,3 \pm 0,2^{b,c}$	$1,3 \pm 0,1^{a}$
Controle	$40.0\pm0.2^{b}$	$5,6 \pm 0,1^{a}$	$1,2 \pm 0,05^{a}$

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh.Controle representa a própolis moída não peneirada. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

#### 4.1.7. Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides

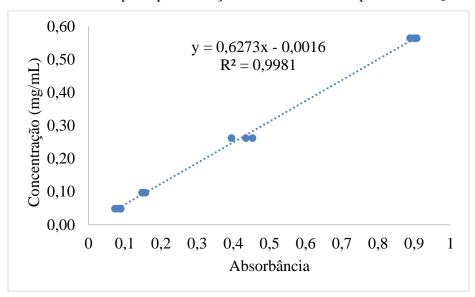
Para a determinação do teor de compostos fenólicos e do teor de flavonoides foram construídas uma curva padrão de ácido gálico (Figura 9) e uma curva padrão de quercetina (Figura 10), respectivamente. A partir das curvas, foram obtidas as equações para o cálculo das concentrações nas amostras, conforme descrito na metodologia.

**Figura 9.** Curva Padrão para quantificação de Compostos Fenólicos expressos em Ácido Gálico.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 10. Curva Padrão para quantificação de Flavonoides expressos em Quercetina.



Fonte: Elaboração própria.

Os valores obtidos com a equação 9 para o cálculo do teor de compostos fenólicos foram multiplicados por 2 para correção da diluição, e os valores obtidos com a equação 10 para o cálculo do teor de flavonoides foram multiplicados por 5 para correção da diluição. As concentrações finais expressas em mg/mL de ácido gálico, para o teor de compostos fenólicos e mg/mL de quercetina, para o teor de flavonoides, são apresentadas na Tabela 7:

**Tabela 7**. Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides dos extratos etanólicos das frações de própolis.

Amostra	Teor de Compostos Fenólicos (mg/mL)*	Teor de Flavonoides (mg/mL)**
A	$2.9 \pm 0.2^{c}$	$0,57 \pm 0,03^{a}$
В	$2.9 \pm 0.2^{c}$	$0,\!57 \pm 0,\!01^{a}$
C	$3,3 \pm 0,3^{c}$	$0,58 \pm 0,01^{a}$
D	$3.9\pm0.3^{b}$	$0,\!58 \pm 0,\!02^{\mathrm{a}}$
$\mathbf{G}$	$5$ ,4 $\pm$ 0,2 $^{\mathrm{a}}$	$0,61 \pm 0,04^{a}$
Controle	$4,0\pm0,4^{\rm b}$	$0,58 \pm 0,04^{a}$

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh. Controle representa a própolis moída não peneirada. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 7, podemos observar que as frações mais grossas (D e G) apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais quando comparado com as frações mais finas (A, B e C). A presença de maior teor de compostos fenólicos justificaria a coloração mais escura das frações mais grossas. Entretanto não houve diferença significativa entre os teores de flavonoides totais entre as frações de própolis.

A amostra G apresentou o maior teor de compostos fenólicos (5,4 mg/mL) e o maior teor de flavonoides (0,61 mg/mL), seguido pelo controle com 4,0 mg/mL e 0,58mg/mL respectivamente.

O teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides podem ser decompostos ou oxidados na presença de luz. Frações de própolis como maior tamanho de partícula podem fornecer uma maior proteção destes compostos o que pode explicar os altos valores referentes aos extratos produzidos com as amostras mais grossas. O controle também apresentou um alto teor de flavonoides e compostos fenólicos; isso pode ser explicado pelo fato desta amostra não ter passado pela peneira e ser a amostra mais preservada do contato com a luz pela presença de cera, que atua como recobrimento natural deste material.

#### 4.1.8. Atividade antioxidante por DPPH e ABTS

A atividade antioxidante dos extratos das frações de própolis *in natura* foi determinada pelos métodos de DPPH e ABTS.<sup>+</sup>. Os resultados são mostrados na Tabela 8:

**Tabela 8.** Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos das frações de própolis.

Amostra	Atividade Antioxidante por	Atividade Antioxidante por ABTS.+
	<b>DPPH</b> (%)	(mg/mL)
A	$83.0 \pm 0.4^{d}$	$7,06 \pm 0,21^{a}$
В	$84,4 \pm 0,2^{c,d}$	$6,33 \pm 0,12^{a}$
C	$86,4 \pm 1,0^{c}$	$7,15 \pm 0,23^{a}$
D	$88,1 \pm 1,7^{a,b}$	$7,24 \pm 0,35^{a}$
G	$89.8 \pm 0.2^{a}$	$7,38 \pm 1,09^{a}$
Controle	$87.0 \pm 0.5^{b,c}$	$6,80 \pm 0,75^{a}$

Fonte: Elaboração própria. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; B representa a fração retida na peneira de 100 Mesh, e A representa a fração que passou na peneira de 100Mesh.Controle representa a própolis moída não peneirada. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

De acordo com os valores apresentados na Tabela 8, podemos observar que a medida que diminui o tamanho de partícula da própolis, sua atividade antioxidante medida por DPPH também diminuiu. Assim, foi observada que a fração mais grossa (G) apresentou maior atividade antioxidante do que as frações mais finas (A, B e C). Esta tendência pode ser correlacionada com a presença de compostos bioativos, entre eles compostos fenólicos e flavonoides. Como as frações mais grossas apresentaram coloração mais escura, o que indicaria maior teor de compostos bioativos, o qual foi verificado na Tabela 7, esta fração apresentou maior atividade antioxidante medida por DPPH. Aparentemente, o maior teor de ceras em partículas maiores de própolis permitiria reter mais compostos bioativos com atividade antioxidante, que seriam as responsáveis pela

coloração mais escura destas frações. O controle, que também possui cor escura, apresentou o segundo maior valor de atividade antioxidante por DPPH.

Entretanto, pelo método de radical ABTS.<sup>+</sup> não foi observada diferença significativa entre os valores de atividade antioxidante das frações de própolis. Esta ausência de diferença significativa pode ser atribuída tanto a sensibilidade do teste quanto a diluição dos extratos. Mesmo assim, os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante permitiram afirmar que todas as frações apresentaram atividade antioxidante.

# 4.2. Otimização da extração aquosa de própolis utilizando a metodologia de superfície de resposta.

As extrações aquosas dos compostos ativos da própolis foram realizadas segundo o Delineamento Central Composto Rotacional  $2^3$ com 06 pontos axiais (-1,68, +1,68) e 03 pontos centrais (0,0,0) apresentado na Tabela 1. Este delineamento permitiu avaliar o efeito do tamanho de partícula  $(x_1)$ , tempo de extração  $(x_2)$  e concentração de álcali  $(x_3)$  sobre o pH final do extrato, a massa mecânica, o teor de sólidos solúveis (extrato seco), e o teor de compostos fenólicos e flavonóides. Os resultados obtidos deste delineamento estão mostrados na Tabela 9:

**Tabela 9**. Resultados do planejamento DCCR 2<sup>3</sup> para a extração aquosa da própolis.

Ensaio	Fração	Tempo	NaOH (g/L)	pН	Massa	Extrato	<b>Teor de Compostos</b>	Teor de Flavonóides
	$(\mathbf{x}_1)$	(h) (x <sub>2</sub> )	$(\mathbf{x}_3)$		mecânica (%)	Seco (%)	Fenólicos (mg/mL)*	(mg/mL)**
1	C (-1)	4 (-1)	5,1(-1)	6	$62,2 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,7$	$1,57 \pm 0,10$
2	G (+1)	4 (-1)	5,1(-1)	6	$57,9 \pm 1,8$	$7,2\pm0,1$	$13,5 \pm 0,6$	$1,10\pm0,10$
3	C (-1)	10 (+1)	5,1(-1)	6	$47,4 \pm 1,1$	$7,4 \pm 0,2$	$12,9 \pm 0,6$	$1,\!47\pm0,\!11$
4	G (+1	10 (+1)	5,1(-1)	6	$43,9 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,2$	$13,4 \pm 0,2$	$1{,}53 \pm 0{,}08$
5	C (-1)	4 (-1)	15 (+1)	8	$36,7\pm0,7$	$11,3 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,3$	$2,\!21\pm0,\!06$
6	G (+1)	4 (-1)	15(+1)	8	$37,5 \pm 1,8$	$11,2\pm0,6$	$14,3 \pm 0,4$	$2{,}77 \pm 0{,}14$
7	C (-1)	10 (+1)	15(+1)	8	$34,6 \pm 1,7$	$11,9 \pm 0,2$	$15,3 \pm 0,2$	$3,25\pm0,13$
8	G (+1)	10 (+1)	15 (+1)	8	$34,8 \pm 0,9$	$12,\!4\pm0,\!3$	$14,3 \pm 0,4$	$3,47 \pm 0,20$
9	A (-1,68)	7 (0)	10 (0)	7	$41,1\pm1,1$	$9,5\pm0,6$	$14,\!4\pm0,\!4$	$2,91 \pm 0,20$
10	N(+1,68)	7 (0)	10 (0)	7	$41,2\pm0,4$	$9,5\pm0,6$	$16,8 \pm 0,3$	$3,64 \pm 0,35$
11	D (0)	2 (-1,68)	10 (0)	7	$54,3 \pm 1,2$	$10,1\pm0,1$	$14,6\pm0,4$	$1,66 \pm 0,09$
12	D (0)	12(1,68)	10 (0)	7	$35,3 \pm 0,2$	$10,5\pm0,3$	$16,0\pm0,7$	$2,\!50\pm0,\!10$
13	D (0)	7 (0)	1,65 (-1,68)	5	$69,8 \pm 1,4$	$3,6\pm0,2$	$8,7\pm0,7$	$0.33 \pm 0.07$
14	D (0)	7 (0)	18,52 (1,68)	9	$34,1 \pm 0,6$	$11,9\pm0,2$	$17,7 \pm 0,6$	$3,44 \pm 0,34$
15	D (0)	7 (0)	10(0)	7	$47,6\pm0,8$	$9,6 \pm 0,4$	$16,3 \pm 0,6$	$2,51 \pm 0,07$

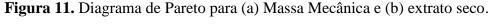
Fonte: Elaboração própria. Os ensaios de 1 à 14 foram realizados em duplicata. O ensaio 15 foi realizado em triplicata. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; D representa a fração que ficou retida na peneira de 45 Mesh; C representa a fração que ficou retida na peneira de 80 Mesh; A representa a fração que passou na peneira de 100 Mesh; N representa a fração que foi apenas triturada, sem ser peneirada. \*Teor de Compostos Fenólicos expressos em mg/mL de ácido gálico; \*\* Teor de Flavonoides expressos em mg/mL de quercetina.

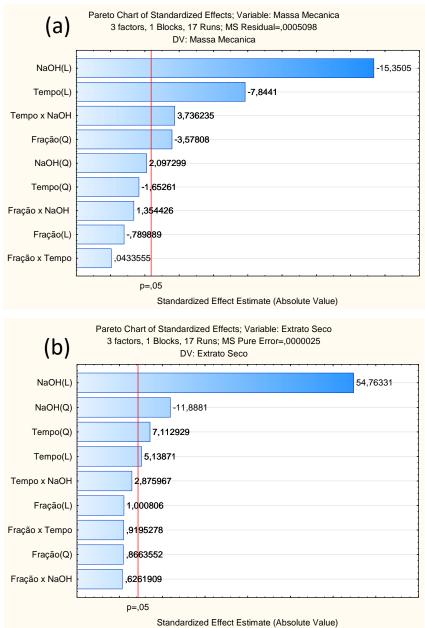
#### 4.2.1. Massa mecânica e extrato seco (sólidos solúveis) dos extratos aquosos

Na Tabela 9 pode ser observado que o ensaio 13, correspondente ao extrato produzido com a fração D, com a menor concentração álcali (1,65 g/L) e tempo total de extração de 7 horas apresentou maior teor de massa mecânica (69,8%), e consequentemente, o menor teor de sólidos solúveis do extrato (3,6%). Isso pode ser explicado pela baixa concentração de álcali usada neste ensaio (1,65 g/L), o que provocou menor extração de compostos bioativos, uma vez que estes compostos possuem baixa solubilidade em água e em soluções ácidas (pH 5). Os ensaios de 1 a 4 também foram realizados com baixas concentrações de álcali (5 g/L) e pH 6, isto resultou em altos valores de massa mecânica e baixos valores para o teor de extrato seco. Por exemplo, o ensaio 1 apresentou teor de Massa Mecânica no valor de 62,2% e teor de extrato seco no valor de 7,0%.

Em contrapartida o ensaio 14, produzido com álcali em concentração de 18,52 g/L apresentou alto teor de extrato seco (11,9%) e baixo teor de massa mecânica (34,1%), o que indica um maior rendimento na extração. Por outro lado, o extrato obtido no ensaio 8, que corresponde à extração utilizando a fração grossa (G), 15 g/L de álcali e 10 horas de extração, foi o que apresentou o maior teor de extrato seco (12,4%) destacando-se como o melhor extrato de acordo com este critério. Os extratos obtidos nos ensaios 5, 6 e 7, que correspondem a concentrações de álcali de 15 g/L, também apresentaram resultados ótimos quando comparados aos demais ensaios.

Dentre as variáveis independentes estudadas nestes ensaios, a concentração de álcali demonstrou ser a mais relevante para a compreensão e interpretação dos resultados obtidos para massa mecânica e extrato seco. Essa relevância pode ser comprovada pelo diagrama de Pareto (Figura 11), onde a componente linear da concentração de hidróxido de sódio destacou-se com maior influência sobre as variáveis resposta tanto para a massa mecânica quanto para o teor de extrato seco.





Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10. (a) Refere-se ao Diagrama de Pareto para a variável Massa Mecânica, e (b) refere-se ao Diagrama de Pareto para a variável Extrato Seco. Os parâmetros que atravessam a linha vermelha (p=0,05) são significantes para a construção do modelo matemático.

De acordo com o Diagrama de Pareto mostrado na Figura 11 para massa mecânica, além da componente linear da concentração de hidróxido de sódio  $(x_3)$ , foram significativas também as contribuições da componente linear para o tempo  $(x_2)$ , a interação do tempo com a concentração álcali  $(x_2.x_3)$  e a componente quadrática do tipo de fração  $(x_1^2)$ . Já o diagrama de Pareto do extrato seco mostra que apenas as componentes lineares e quadráticas das variáveis tempo de extração  $(x_2)$  e concentração

álcali (x<sub>3</sub>) foram significativas, sendo o tipo de fração (x<sub>1</sub>) não apresentou efeito significativo para o teor de extrato seco.

A seguir, na Tabela 10 é apresentado a tabela da ANOVA calculados para a massa mecânica e o extrato seco:

**Tabela 10.** Coeficiente de regressão e análise de variância ANOVA para Massa Mecânica e Teor de Extrato Seco para os extratos aquosos produzidos pelo planejamento DCCR 2<sup>3</sup>.

	Massa Mecânica (%)	Extrato Seco (%)
	$Y_{I}$	$Y_2$
$oldsymbol{eta_0}$	0,473869*	0,095702*
Linear		1
$oldsymbol{eta}_1$	-0,009657	0,000852
$oldsymbol{eta}_2$	-0,047948*	0,002188*
$\beta_3$	-0,093831*	0,023322*
Quadrático		
$oldsymbol{eta_{11}}$	-0,024776*	0,000813
$oldsymbol{eta}_{22}$	-0,022258	0,003218*
$\beta$ 33	0,028247	-0,005697*
Interações		
$oldsymbol{eta_{12}}$	0,000692	0,001023
$oldsymbol{eta}_{13}$	0,021625	0,000697
$oldsymbol{eta}_{23}$	0,029826*	0,003199
${f R}^2$	0,94368	0,98681
$\mathbf{F}_{ ext{regress} ilde{a} ext{o}}$	50,27	224,33945
$\mathbf{F}_{ ext{tabelado}}$	3,26	3,26
<b>F</b> falta de ajuste	4,96	4,16
F'tabelado	19,4	19,4

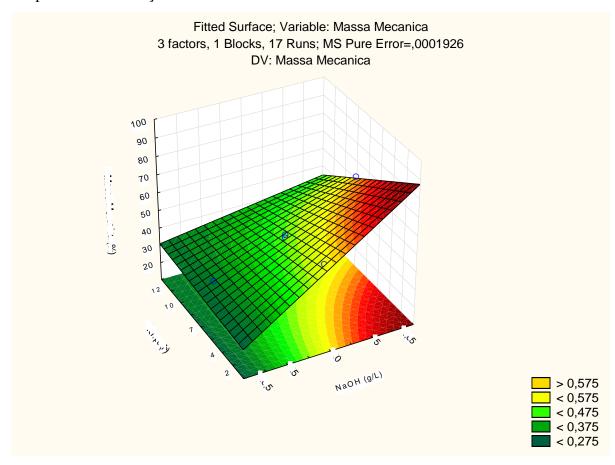
Fonte: Elaboração própria. Os coeficientes  $\beta$ estão relacionados com as variáveis independentes: 1 para a fração de própolis, 2 para o tempo de extração e 3 para a quantidade de hidróxido de sódio. Valores destacados com (\*) indicam significância. Valores de  $F_{regressão}$  maior que  $F_{tabelado}$  indica que este modelo é significativo, e valores de  $F_{falta\ de\ ajuste}$  menor que  $F'_{tabelado}$  indica que este modelo é preditivo, para p<0,05 (intervalo de confiança de 95%).

Conforme foi observado pelo diagrama de Pareto (Figura 11), a tabela da ANOVA (Tabela 10) demonstrou que para a massa mecânica na extração aquosa da própolis, os coeficientes lineares das variáveis tempo de extração (x<sub>2</sub>) e concentração de álcali (x<sub>3</sub>), assim como o coeficiente do termo quadrático correspondente à variável tipo de fração (x<sub>1</sub><sup>2</sup>) e a interação tempo de extração x concentração de álcali (x<sub>2</sub>.x<sub>3</sub>) tiveram efeito estatisticamente significativo sobre esta variável de resposta estudada e podem ser considerados no modelo matemático que nos ajude a predizer esta variável em qualquer outra condição dentro do intervalo de valores observados para os fatores de estudo.

Por outro lado, a tabela da ANOVA mostra que apenas os coeficientes lineares das variáveis tempo de extração  $(x_2)$  e concentração de álcali  $(x_3)$ , e os coeficientes quadráticos das variáveis tempo de extração  $(x_2^2)$  e concentração de álcali  $(x_3^2)$  foram estatisticamente significativos para o extrato seco, possibilitando assim a construção de um modelo matemático confiável, dentro do intervalo de valores estudados neste trabalho.

Como o valor de F calculado para o modelo matemático ( $F_{regressão}$ ) que considera os termos significativos foi maior que o F tabelado pode-se dizer que modelo matemático é significativo. Já o valor F calculado para a falta de ajuste em ambos os casos foi menor que o F tabelado, o que indica que este modelo além de ser significativo também é preditivo, o que nos permite gerar os gráficos de superfícies de resposta para ambas variáveis respostas:

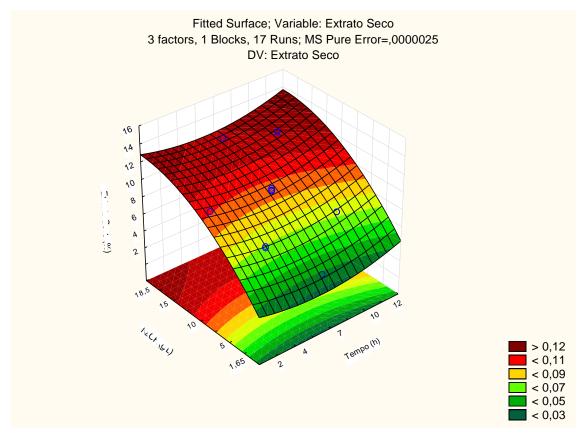
**Figura 12.** Gráfico de Superfície de Resposta para a Massa Mecânica em função do tempo e da concentração de NaOH.



Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10.0.

A Figura 12 apresenta a superfície de resposta para a variável Massa Mecânica em função do tempo de extração e da concentração álcali. A superfície apresenta uma região de máximo em baixa concentração álcali (1,65 g/L) e baixo tempo de extração (2h) onde a previsão do teor de massa mecânica se aproxima de 90%. Os valores mais baixos da superfície são observados em regiões de alta concentração álcali (16,5 g/L), como por exemplo o teor de massa mecânica previsto de 30% para o tempo de 12 horas de extração.

**Figura 13.** Gráfico de Superfície de Resposta para o Teor de Extrato Seco em função do tempo e da concentração de NaOH.



Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10.0.

Já a Figura 13 apresenta a superfície de resposta para a variável Extrato Seco em função do tempo de extração e concentração álcali. Nesta figura é possível observar que a região de máximo esta localizada em alta concentração álcali (16,5 g/L) onde todos os valores previstos para o teor de extrato seco são maiores que 12% no intervalo de 2 a 12 horas de extração. A medida que a concentração álcali diminui, o teor de extrato seco previsto também diminui: em concentração álcali de 1,65 g/L, por exemplo, o valor previsto para o teor de extrato seco é abaixo de 5% no intervalo de 2 a 12 horas de extração.

O meio alcalino favorece a solubilização dos componentes presentes na própolis, o que justifica o baixo valor para a massa mecânica e alto teor de extrato seco previstos para a concentração de 16,5 g/L de NaOH neste intervalo de tempo de extração.

#### 4.2.2. Teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides

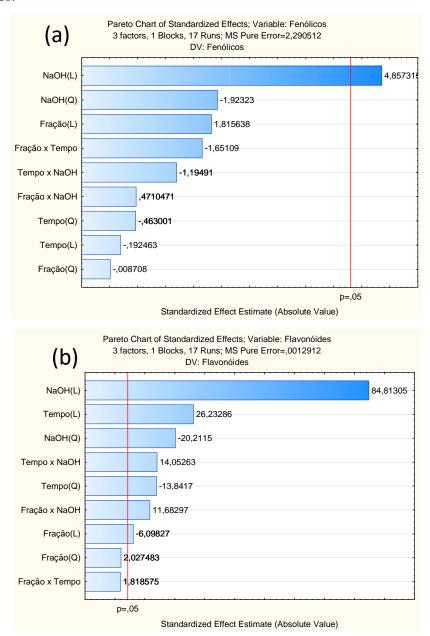
As concentrações finais expressas em mg/mL de ácido gálico, para o teor de compostos fenólicos e mg/mL de quercetina, para o teor de flavonoides estão apresentadas na Tabela 9.

O ensaio 14, produzido com a fração D, tempo de extração de 7 horas e concentração alcali 18,52g/L apresentou o maior teor de compostos fenólicos (17,7mg/mL). O extrato obtido no ensaio 10, produzido com a fração N, tempo de extração de 7 horas e concentração álcali 10 g/L também apresentou um ótimo resultado, sendo o extrato com o segundo maior teor de compostos fenólicos (16,8 mg/mL) e com o maior teor de flavonóides (3,64mg/mL). A maior diferença do ensaio 10 quando comparado com os demais talvez seja pelo fato dele ter sido produzido usando própolis moída não peneirada. O ensaio 9, realizado com o mesmo tempo (7h) e mesma concentração álcali (10g/L) diferenciando-se do ensaio 10 apenas pela fração utilizada (A) apresentou valores menores que o ensaio 10 para o teor de compostos fenólicos (14,4 mg/mL) e teor de flavonoides (2,91 mg/Ml). Conforme já foi visto antes na extração alcoólica, a extração realizada com própolis não peneirada (ensaio 10) apresentou um desempenho melhor nos parâmetros de teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides do que as extrações realizadas com as frações de própolis moída e peneirada (ensaio 9), pelo fato desta própolis ter sido menos exposta a luz e oxigênio e ter maior conteúdo de ceras, que protegem os compostos bioativos.

O extrato produzido no ensaio 13, produzido com a fração D, tempo de extração de 7 horas e concentração álcali 1,65 g/L, apresentou os menores teores tanto para compostos fenólicos (8,7 mg/mL) quanto para flavonóides (0,33 mg/mL). Esse resultado para este ensaio já era esperado, uma vez que flavonoides e compostos fenólicos fazem parte dos sólidos solúveis presentes no extrato e como este foi o extrato que apresentou o menor teor de sólidos solúveis, ele provavelmente apresentaria menores teores de compostos fenólicos, flavonoides e por consequência, menor atividade biológica

Novamente, a concentração de álcali demonstrou ser a variável independente mais relevante para a compreensão e interpretação dos resultados. Essa relevância pode ser comprovada pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 14, na qual pode ser observado que a componente linear da concentração de álcali (x3) apresentou maior efeito significativo sobre o teor de compostos fenólicos quanto para o teor de flavonoides.

**Figura 14.** Diagrama de Pareto para (a) Teor de Compostos Fenólicos e (b) Teor de Flavonóides.



Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10. (a) Refere-se ao Diagrama de Pareto para a variável Teor de Compostos Fenólicos, e (b) refere-se ao Diagrama de Pareto para a variável Teor de Flavonóides. Os parâmetros que atravessam a linha vermelha (p=0,05) são significantes para a construção do modelo matemático.

De acordo com o diagrama de Pareto para o teor de flavonoides (Figura 14b) além da componente linear da concentração de hidróxido de sódio  $(x_3)$  foram significativas também as contribuições das componentes lineares para o tempo  $(x_2)$  e o tipo de fração  $(x_1)$ , a interação do tempo com a concentração álcali  $(x_2.x_3)$  e as componentes quadráticas do tempo  $(x_2^2)$  e da concentração alcali  $(x_3^2)$ . Já o diagrama de Pareto para o teor de

compostos fenólicos (Figura 14a) mostra que apenas a componente linear para a concentração álcali  $(x_3)$  teve influência significativa sobre o teor de compostos fenólicos totais. Portanto, o tamanho de partícula  $(x_1)$  e o tempo de extração  $(x_2)$  não apresentaram influencia estatisticamente significativa sobre o teor de compostos fenólicos.

Abaixo na Tabela 11 esta apresentado os resultados da ANOVA calculados para o teor de compostos fenólicos e flavonoides:

**Tabela 11.** Coeficiente de regressão e análise de variância (ANOVA) para as variáveis de resposta Teor de Compostos Fenólicos e teor de Flavonoides para os extratos aquosos produzidos pelo planejamento DCCR 2<sup>3</sup>.

	Teor de Compostos Fenólicos (mg/mL)	Teor de Flavonóides (mg/mL)
	$Y_3$	$Y_4$
$oldsymbol{eta}_{ m o}$	14,59176*	2,534045*
Linear		
$\beta_1$	1,48779	-0,059322*
$oldsymbol{eta}_2$	-0,15771	0,255186*
$\beta_3$	1,99012*	-0,154734*
Quadrático		
$\beta_{11}$	-0,00786	0,043456
$oldsymbol{eta}_{22}$	-0,41797	-0,154734*
$\beta$ 33	-1,73619	-0,222999*
Interações		
$oldsymbol{eta}_{12}$	-1,76694	0,046207
$\beta_{13}$	0,5041	0,148424*
$\beta_{23}$	-1,27876	0,178528
${f R}^2$	0,57033	0,96485
Fregressão	19,9102671	35,2936136
Ftabelado	3,26	3,26
Ffalta de ajuste	1,21345397	45,7375415
F'tabelado	19,4	19,4

Fonte: Elaboração própria. Os coeficientes  $\beta$  estão relacionados com as variáveis independentes: 1 para a fração de própolis, 2 para o tempo de extração e 3 para a quantidade de hidróxido de sódio. Valores destacados com (\*) indicam significância. Valores de  $F_{regressão}$  maior que  $F_{tabelado}$  indicam que este modelo é

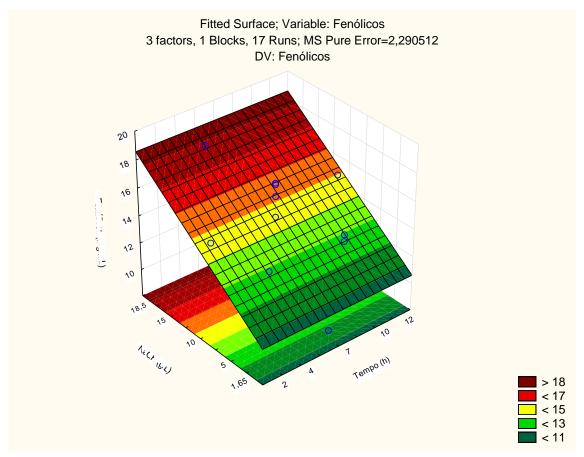
significativo, e valores de  $F_{\text{falta de ajuste}}$  menor que  $F'_{\text{tabelado}}$  indicam que este modelo é preditivo, para p<0,05 (intervalo de confiança de 95%).

A ANOVA apresentada na tabela 11 demonstrou que, para o teor de flavonoides na extração aquosa da própolis, os coeficientes lineares das variáveis tipo de fração  $(x_1)$  tempo de extração  $(x_2)$  e concentração de álcali  $(x_3)$ , assim como o coeficiente do termo quadrático correspondente à variável tipo de fração  $(x_1^2)$ , concentração álcali  $(x_2^2)$  e a interação do tipo de fração com a concentração de álcali  $(x_1.x_3)$  tiveram efeito estatisticamente significativo sobre esta variável de resposta estudada, o que pode ser confirmado pelo Diagrama de Pareto apresentado na Figura 14b.

Porém, para o teor de compostos fenólicos, a tabela da ANOVA, em concordância com o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 14a, mostra que apenas o coeficiente linear da variável concentração de álcali (x<sub>3</sub>) foi estatisticamente significativo dentro do intervalo de valores estudados.

Com a ANOVA foi possível obter o valor f tanto para a regressão quanto para a falta de ajuste e compara-los com os valores tabelados. O valor de F calculado para a regressão em ambos os casos foi maior que o F tabelado, o que indica que este modelo matemático é significativo. Já o valor f calculado para a falta de ajuste foi menor que o f tabelado para o teor de compostos fenólicos, o que indica que este modelo é preditivo. O valor f calculado para a falta de ajuste foi maior que o valor tabelado para o teor de flavonoides, o que indica que este modelo não é preditivo. Apenas para o teor de compostos fenólicos foi possível a elaboração do Gráfico de Superfície de Resposta (Figura 15), pois apenas este parâmetro possui um modelo significativo e preditivo.

**Figura 15.** Gráfico de Superfície de Resposta para o Teor de Compostos Fenólicos em função do tempo e da concentração de NaOH.



Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10.0.

A Figura 15 apresenta a superfície de resposta para a variável Teor de Compostos Fenólicos totais em função do tempo de extração e da concentração álcali. Este gráfico apresenta a forma de um plano inclinado onde é possível observar valores máximos em alta concentração álcali (16,5 g/L) onde a previsão do teor de compostos fenólicos totais está acima de 18 mg/mL, no intervalo de 2 a 12 horas de tempo de extração. Os valores mais baixos da superfície são observados em baixa concentração álcali (1,65 g/L), com o teor de compostos fenólicos totais previsto próximo de 11 mg/mL, neste mesmo intervalo de tempo. De acordo com esta superfície de resposta o intervalo de tempo de extração estudado não exerceu influência sobre o teor de compostos fenólicos totais.

#### 4.2.3. Perfil de desejabilidade para o extrato aquoso de própolis.

Baseado nos resultados obtidos anteriormente e com uso do software STATISTICA 10 foi possível traçar o perfil para os valores desejados (Figura 16) com 99,548% de desejabilidade. A desejabilidade permite prever os valores para as variáveis independentes onde obtem-se um máximo de aproveitamento da extração e valores otimizados para os resultados.

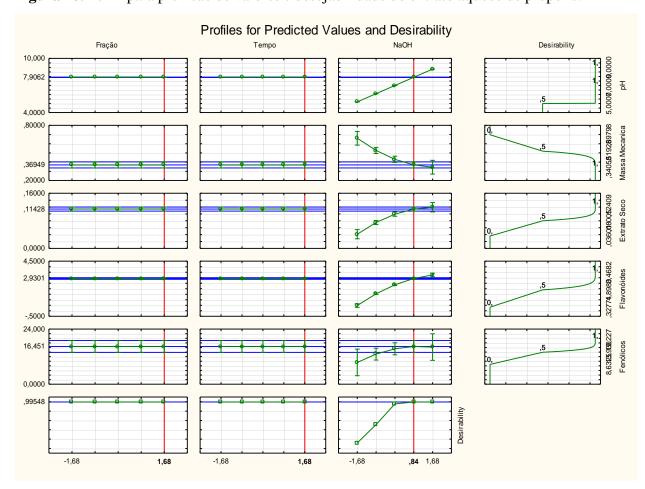


Figura 16. Perfil para previsão de valores e desejabilidade do extrato aquoso de própolis.

Fonte: Imagem produzida pelo software Statistica 10.0.

O último gráfico da primeira coluna da Figura 16 indica que o tamanho de partícula ideal para a elaboração de um extrato otimizado refere-se a variável codificada +1,68, que de acordo com a Matriz de Planejamento DCCR 2<sup>3</sup> (Tabela 1), seria a fração N, ou seja, a própolis que foi apenas moída e não peneirada.

O último gráfico da segunda coluna da Figura 16 indica que o tempo de extração ideal para a elaboração do extrato otimizado refere-se a variável codificada +1,68, cujo

valor real é 12 horas e por fim a concentração álcali ótima para a produção do extrato otimizado esta indicada no ultimo gráfico da terceira coluna. Seu valor codificado é 0,84 e seu valor real é aproximadamente 14,2 mg/mL.

Dentre as variáveis independentes estudadas a concentração álcali demonstrou ser a mais influente sobre os resultados, seguida pelo tempo de extração. O tamanho de partícula não demonstrou ser muito significante neste ensaio elaborado com a Matriz de Planejamento DCCR 2<sup>3</sup>. Devido a isso, foram realizados extrações aquosas segundo as condições otimizadas não apenas com a própolis não peneirada, mas também com as frações G e A, para confirmar se realmente não há diferença significativa entre as frações.

#### 4.3. Caracterização dos extratos otimizados de própolis

Foram realizados 3 extrações usando diferentes frações de própolis (N, G e A) para confirmar se não há influência do tamanho de partícula sobre as características dos extratos de própolis produzidos. Nestas 3 extrações , o tempo de extração foi de 12 horas, e a concentração álcali foi de aproximadamente 14,2 mg/mL, as quais foram as condições otimizadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12:

**Tabela 12**. Caracterização dos extratos de própolis otimizados.

Fração	NaOH em	Massa	Extrato	Teor de Compostos	Teor de
	(mg/mL)	mecânica (%)	Seco (%)	Fenólicos (mg/mL)*	Flavonóides
					(mg/mL)**
N	$14,29 \pm 0,08$	$32,8 \pm 2,9^{c}$	$11,9 \pm 0,3^{a}$	$19.8 \pm 1.4^{a}$	$4,27 \pm 0,28^{a}$
A	$14,26 \pm 0,05$	$37.9 \pm 2.8^{a}$	$11,4 \pm 0,2^{b}$	$14,1 \pm 0,36^{b}$	$3,67 \pm 0,19^{a}$
G	$14,24 \pm 0,04$	$35,2 \pm 2,1^{b}$	$11,8 \pm 0,2^{a,b}$	$17.9 \pm 0.28^{a}$	$3,87 \pm 0,08^{a}$

Fonte: Elaboração própria. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. O tempo de extração foi de 12 horas para todos os ensaios. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; A representa a fração que passou na peneira de 100 Mesh; N representa a fração que foi apenas triturada, sem ser peneirada. \*Teor de Flavonóides expressos em mg/mL de quercetina; \*\* Teor de Compostos Fenólicos expressos em mg/mL de ácido gálico. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras e letras diferentes indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey (p<0,05).

## 4.3.1. Massa mecânica, extrato seco (sólidos solúveis), compostos fenólicos e teor de flavonóides dos extratos otimizados.

A fração N, referente a própolis que não foi peneirada, destacou-se das demais por apresentar o menor valor para massa mecânica (32,8%) e o maior valor para teor de extrato seco (11,9%). De acordo com o teste estatístico de Tukey, houve diferenças significativas para as demais frações em função da massa mecânica, porem quando olhamos para o teor de extrato seco os valores são bem próximos e o teste de Tukey indica que não houve diferenças significativas entre os pares N com G e A com G.

Quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides, novamente temos o extrato produzido com própolis não peneirada como destaque. O teor de Compostos Fenólicos da fração N (19,8mg/mL) superou não só os demais ensaios otimizados como também todos os ensaios realizados no planejamento estatístico (Tabela 9). O mesmo ocorreu com o teor de flavonoides (4,27mg/mL), que superou todos os valores obtidos no ensaio de planejamento estatístico (Tabela 9) comprovando experimentalmente a eficiência do modelo elaborado com a Matriz de Planejamento DCCR 2<sup>3</sup>.

Machado (2016) obteve valores entre 111 mg e 181 mg de compostos fenólicos por grama de extrato seco de própolis verde e valores entre 24 mg e 47mg de flavonoides por gramas de extrato seco. Ao expressar os resultados deste trabalho nas mesmas unidades temos que a fração N apresenta 166,8 mg/g de compostos fenólicos e teor de flavonoides de 35,8 mg/g, o que indica que o extrato obtido neste trabalho apresenta composição semelhante aos resultados encontrados na literatura.

Para fins de comparação foi realizado também um ensaio com extrato alcoólico comercial de própolis verde, onde foi encontrado o valor de 117 mg/g de compostos fenólicos e teor de flavonoides de 26,4 mg/g. Os valores obtidos no extrato aquoso superaram aos do extrato etanólico comercial de própolis verde, o que novamente comprova a eficiência da extração aquosa em meio álcali usada neste trabalho.

Estudos com extratos de própolis vermelha do nordeste brasileiro apresentaram diferentes resultados para o teor de compostos fenólicos no extrato: 151,55mg/g (Frozza et al, 2012), 154mg/g (Moraes, 2009) e 257mg/g (Cabral et al, 2009). Isto pode ser justificado pela diferença do tipo de própolis, florada da região, condições climáticas e até mesmo o processo de extração.

Por outro lado, o teste estatístico de Tukey mostrou que há diferenças significativas apenas para a fração A em relação ao teor de compostos fenólicos, cujo extrato apresentou o menor valor para este teor (14,1 mg/mL). Entretanto, não houve diferença significativa com relação ao teor de flavonoides entre os extratos obtidos com as frações A, N e G.

Após 30 dias, foi determinado novamente o teor de compostos fenólicos e flavonóides, conforme apresentado na Tabela 13. Os extratos foram armazenados em vidro âmbar, sem iluminação e à temperatura ambiente. Os resultados obtidos indicaram que não houve perdas significativas de compostos bioativos, indicando assim a estabilidade dos compostos bioativos dos extratos aquosos durante este intervalo de tempo.

Tabela 13. Teor de Compostos Fenólicos e Teor de Flavonoides após 30 dias.

Fração	NaOH em	Teor de Compostos	Teor de Flavonóides
	(mg/mL)	Fenólicos (mg/mL)*	(mg/mL)**
N	$14,29 \pm 0,08$	$19,3 \pm 1,1^{a}$	$4,19 \pm 0,17^{a}$
$\mathbf{A}$	$14,\!26 \pm 0,\!05$	$14.0 \pm 0.9^{b}$	$3,66 \pm 0,21^{a}$
$\mathbf{G}$	$14,\!24 \pm 0,\!04$	$17.6 \pm 0.4^{a}$	$3,85 \pm 0,22^{a}$

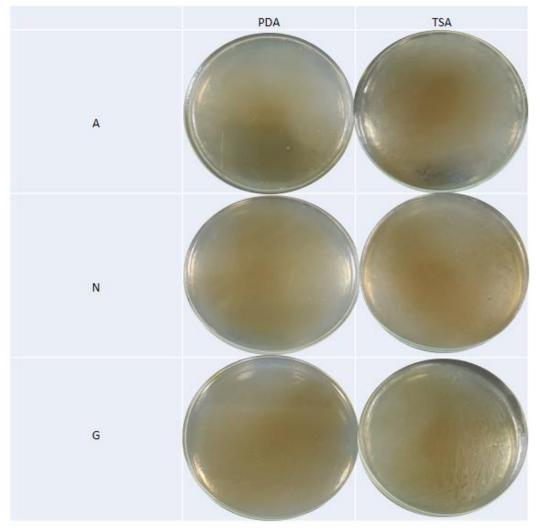
Fonte: Elaboração própria. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, com os extratos após 30 dias de sua produção. O tempo de extração foi de 12 horas para todos os ensaios. G representa a fração que ficou retida na peneira de 35 Mesh; A representa a fração que passou na peneira de 100 Mesh; N representa a fração que foi apenas triturada, sem ser peneirada. \*Teor de Flavonóides expressos em mg/mL de quercetina;\*\* Teor de Compostos Fenólicos expressos em mg/mL de ácido gálico. As notações sobrescritas referem-se ao teste de Tukey, onde letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre as amostras e letras diferentes indica que este par de amostra são diferentes estatisticamente.

#### 4.3.2. Qualidade microbiológicas dos extratos otimizados

Vários estudos já comprovaram a atividade de extratos de própolis contra diversas variedades de microrganismos, entretanto, pelo fato da própolis coletada ser um produto natural e estar exposta na natureza desde sua criação ao redor das colmeias até a coleta realizada por atividade humana, foi realizado um teste para determinar se os extratos aquosos possuíam algum microorganismo resistente a sua atividade biológica. Neste teste, os extratos foram inoculados em meio nutritivo favorável ao crescimento de

microorganismos. Para tal teste foi utilizado meio PDA (Potato Dextrose Agar) como fonte nutritiva para fungos e meio TSA (Trypticase Soy Agar) como fonte nutritiva para bactérias. A Figura 17 mostra os resultados do teste após 48h de incubação.

Figura 17. Determinação da presença de microrganismos nos extratos.



Fonte: elaboração própria. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. O nome dado a cada ensaio é referente a fração de própolis com a qual ele foi produzido. As placas foram fotografadas 48 horas após a adição de 100µl de extrato de própolis. Os testes com placas de TSA foram realizados para verificar a presença de bactérias nos extratos, e os testes com placas de PDA foram realizados para verificar a presença de fungos nos extratos.

Na Figura 17 pode ser observado que em nenhuma das placas foi possível encontrar colônias de microrganismos, o que nos permite elaborar 2 hipóteses: "os extratos não possuem microrganismos ativos" ou "os extratos possuem microrganismos ativos, porém não permite seu crescimento e formação de colônias". Em ambos os casos

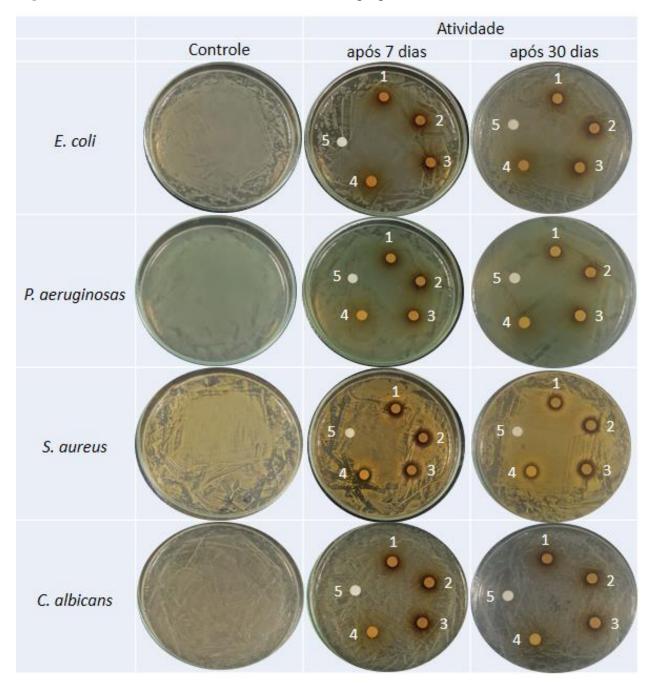
podemos chegar à conclusão de que os extratos são seguros, não necessitam de nenhum procedimento de esterilização (como pasteurização ou tratamento com UV, por exemplo) e não apresentam riscos de contaminação microbiológica.

## 4.3.3. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos otimizados usando o teste do Halo.

A partir dos extratos otimizados foi realizado testes para avaliar sua atividade contra as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*, conforme mostra a Figura 18. O teste foi realizado após 7 dias que o extrato foi produzido, e repetido após 30 dias para verificar sua estabilidade neste intervalo de tempo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Estes testes foram realizados com o extrato produzido a partir da fração mais fina A (disco 1), com o extrato produzido a partir da fração mais grossa G (disco 2), com o extrato produzido a partir da fração não peneirada N (disco 3), com um extrato etanólico comercial produzido com a própolis de mesma origem que os extratos aquosos elaborados neste trabalho (disco 4) e com uma solução aquosa de NaOH com pH 8 como controle (disco 5).

**Figura 18.** Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis.



Fonte: elaboração própria. Os testes foram realizados com extratos após 7 dias do seu preparo, e após 30 dias do seu preparo. No disco 1 foi adicionado 20µL do extrato elaborado com a fração A, no disco 2 foi adicionado 20µL do extrato elaborado com a fração N, no disco 3 foi adicionado 20µL do extrato elaborado com a fração G, no disco 4 foi adicionado 20µL do extrato etanólico de própolis comercial e no disco 5 foi adicionado 20µL de solução aquosa de NaOH com pH 8 (controle).

De acordo com a Figura 18, o extrato etanólico comercial analisado apresentou atividade apenas contra a bactéria gram-positiva, onde formou-se um Halo de inibição de

aproximadamente 1mm de largura ao redor do disco. Os extratos aquosos também apresentaram atividade contra esta mesma bactéria formando um Halo de inibição com largura pouco maior que 1mm, o que indica que neste processo alternativo de extração não houve perdas de compostos com atividade biológica. A ausência do Halo de inibição no disco 5, contendo apenas uma solução aquosa de hidróxido de sódio, comprova esta conclusão, descartando a hipótese de que a atividade biológica do extrato poderia ser referente ao pH básico do mesmo.

Com os testes realizados após 30 dias, mostrados na Figura 18, foi possível concluir que os extratos são estáveis e que não houve perdas significativas de seus compostos bioativos durante este período, tendo em vista que os halos de inibição após este período possuem tamanhos semelhantes aos halos dos testes realizados antes.

Diversos estudos já demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis: Davey e Grange (1990) reportaram que extratos de própolis são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas, porem possuem uma atividade limitada quanto a bactérias Gram-negativas; Park et al (1998) reportou que extratos etanólicos de própolis de diversas regiões brasileiras inibem o crescimento de *Streptococcus* e LU, L. (2005) confirmou que extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes épocas sazonais e diferentes locais também apresentaram atividade contra *S. aureus*.

### 5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o processo de moagem e peneiragem favoreceu a remoção de parte da cera da própolis, melhorando o processo de obtenção do extrato, mas também ocasionou perda de compostos bioativos, principalmente dos compostos fenólicos totais.

As frações mais grossas apresentaram um maior rendimento de extração e melhor qualidade do extrato: maior atividade antioxidante, maior teor de compostos fenólicos e maior teor de flavonoides. Isso pode ser justificado pelo fato de possuírem maior teor de ceras, as quais podem ajudar a proteger os compostos bioativos de processos oxidativos por contato com a luz. As frações mais grossas também apresentaram uma coloração mais escura que indicaria a presença de compostos fenólicos, resultando em maior atividade antioxidante destas frações.

O extrato aquoso em meio alcalino obtido neste trabalho apresentou composição e propriedades semelhantes ao extrato etanólico comercial, o que confirma a eficiência do processo de extração utilizado e também a segurança do produto final por não conter microrganismos. O extrato aquoso otimizado, obtido com a própolis moída não peneirada (N), concentração álcali 14,2 mg/mL e tempo de extração de 12 horas, apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonóides do que o extrato etanólico comercial.

Os modelos matemáticos obtidos para a massa mecânica, extrato solúvel e teor de compostos fenólicos usando a metodologia de superfície de resposta demonstrou ser eficiente e confiável, uma vez que foram produzidos extratos com alto teor de compostos bioativos e com atividade antioxidante. Os extratos aquosos apresentaram estabilidade e ausência de contaminação microbiológica durante 30 dias desde sua produção.

Também foi verificado que o extrato aquoso da própolis verde, de origem brasileira, obtida neste trabalho, possui atividade contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* apresentando atividade antimicrobiana comparável com o extrato etanólico comercial.

### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compouns potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, São Cristóvão, n. 101, p. 129-138, aug, 2017.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **ZeitschriftfürNaturforschung C**, v. 57, n. 5-6, p. 530-533, 2002.

BERROUKCHE, A. et al. Characterization of bioactive compounds in South-Western Algeria propolis samples. **Journal of New Technology and Materials**, Algeria, v. 07, n. 02, p. 67-71, dec, 2017.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da propolis vermelha brasileira. Quim. Nova 32, 1523-1527, 2009.

ÇELEMLI, Ö. G. et al. More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. **ZeitschriftfürNaturforschung C**, v. 68, n. 11-12, p. 429-438, 2013.

COELHO, Joana Patrícia Mendes. Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. 2013. Tese de Doutorado.

DAUGSCH, Andreas et al. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas,p. 144, 2007.Dissertação de mestrado.

DURAN, N. et al. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. **Parasitologyresearch**, v. 108, n. 1, p. 95-105, 2011.

Estudo sobre a própolis vermelha. Disponível em: < http://sebraepb.livreforum.com/t6-estudo-sobre-a-propolis-vermelha>. Acesso em: 17 de janeiro de 2018.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 2, p. 887-897, 2010.

FRANCISCO, L. et al. Evaluation of radical scavening activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brasilian propolis by-product. **Food Research International**, Porto, n. 105, p. 537-547, nov, 2017.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis.**Food and Chemical Toxicology**, 52, 137-142, 2012.

GIAMPIERI, F. et al. Are by-products from beeswax recycling process a new promising source of bioactive compounds with biomedicinal properties? **Food and Chemical Toxicology**, Ancona, n. 112, p. 126-133, dec, 2017.

JAFARI, N. J. et al. The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. **Journal of Food Processing and Preservation**. 2017;00:e13336.

LU, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis agains *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology, 102, p213-220, 2005.

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. 2016. PLOS ONE 11(1): e0145954.

MONROY, Y. M. et al. Brazilian green própolis extracts obtained by conventional processes and by process at high pressure with supercritical carbono dioxide, ethanol and water. **JournalofSupercritcalFluids**, Campinas, n. 130, p. 189-197, aug, 2017.

MORAES, C. S. Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PARK, Y.K.; ALENCAR S. M.; AGUIAR C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J Agric Food Chem 2002;50:2502–6.

PEREIRA, D.A. Extração aquosa de própolis e secagem em leito de espuma para uso em alimentos. 2008. 88f. Dissertação de mestrado. Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga, 2008.

PICCINELLI, A. L. et al. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5080-5088, 2013.

POPOVA, M. P. et al. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3167-3176, 2010.

DAVEY, R. W.; GRANGE, J. M. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med., 83, p159-161, 1990.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.(Comunicado técnico, 128). e-ISSN 1983-4063-www. agro. ufg. br/pat-Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 44, n. 4. out./dez, p. 399-408, 2014.

SILICI, S.; ÜNLÜ, M.; VARDAR-ÜNLÜ, G. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1797-1803, 2007.

SPULBER, R. et al. Chemical diversity of polyphenols from bee pollen and propolis. **AgroLife Scientific Journal**, Bucharest, v. 6, n. 2, p. 183-194, 2017.

SCHIMDT, E. M. et al. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides totais em extratos de própolis. Disponível em <a href="http://www.unicentro.br/pesquisa/anais/proic/2007/pdf/artigo\_50.pdf">http://www.unicentro.br/pesquisa/anais/proic/2007/pdf/artigo\_50.pdf</a>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2018.

SILVA, M. P. Análises físico-químicas de produtos apícolas para fins de controle de qualidade. 2013. 63f. Trabalho de estágio. Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 2013.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2. 2007. Disponível em: <a href="http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0100-40422007000200021">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0100-40422007000200021></a>. Acesso em: 17 de janeiro de 2018.

TAPIA, E. V. *Identificação da fonte botânica, caracterização química e avaliação das atividades biológicas das própolis coletadas no Peru*.2017. 142f. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

ZABAIOU, N. et al. Biological properties of própolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, Clermont-Ferrand, n. 207, p. 214-222, jul, 2017.

ZANCANELA, D. C. et al. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, São Paulo, n. 209, p. 39-42, apr, 2017.

Y. K. Park et al. Antimicrobial activity of própolis on oral microorganisms. Curr. Microbiol., 36, p24-28, 1998.