

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ROSANA MOURA ANDRADE

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DA PRÓPOLIS MARROM COM POTENCIAL
ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME FRENTE AO
MICRORGANISMO *Streptococcus mutans***

São Cristóvão/SE
2022

ROSANA MOURA ANDRADE

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DA PRÓPOLIS MARROM COM POTENCIAL
ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME FRENTE AO
MICRORGANISMO *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr.^a Adriana Gibara Guimarães

Coorientadores: Prof. Dr. James Almada da Silva e Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

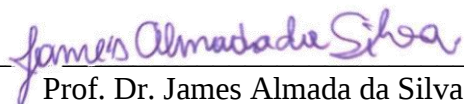
São Cristóvão/SE
2022

ROSANA MOURA ANDRADE

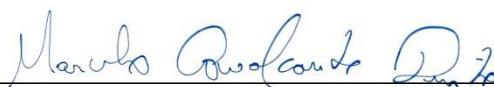
**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA
PRÓPOLIS MARROM COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E
ANTIBIOFILME FRENTE AO MICRORGANISMO *Streptococcus
mutans***

Dissertação de mestrado aprovada no
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas em 24 de março de 2022.

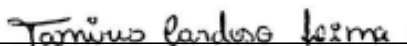
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Presidente



Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte
Universidade Federal de Sergipe (UFS)
1º Membro Examinador



Prof. Dr.^a Tamires Cardoso Lima
Universidade Federal de Sergipe (UFS)
2º Membro Examinador

*Dedico este trabalho ao Apiário Sertanejo,
em especial, meu pai Romoaldo e meu tio
José Alfredo, por tudo que aprenderam
e construíram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir, guardar e zelar durante todos os momentos dessa caminhada. As intempéries existiram, mas trouxeram-me sagacidade para alcançar esse sonho.

Agradeço a minha família, em especial, ao meu “eu” por acreditar que seria possível chegar até aqui, aos meus pais Romoaldo e Sandra pelo dom da vida, aos meus avós pelo cuidado, a minha tia irmã Verônica e ao meu tio Rodrigo (in memorian) pelo acolhimento;

Aos meus colegas/amigos do mestrado João Paulo, Gabriel, Saulo e Jussara, obrigada por todas as conversas, só nós sabemos como o desespero foi grande.

A minha irmã Raquel pelos momentos estudantis compartilhados, sei que o choro foi livre! A meus tios, Galega, Joelson, Edineide, Wellinton, Nadson e Eliane por todo carinho, eu amo vocês! A minha família de Itaporanga, Dona Zefinha, Josi, Jr, Vitória, Dona Acácia, Seu Jadilson, Geovana, Pérola e Glenda.

À grande família de Lagarto, por tudo que vivemos, toda trajetória compartilhada, acúmulo de conhecimentos e boas risadas, Marianne, Rita, Felipe, Izabel, Vitória e Ítalo, vocês foram essenciais; ao SQUAD, Analice, Brenda, Amanda, Tainara e Paula Vanessa, vocês foram e serão para sempre tesouros em minha vida.

Aos meus amigos de Tucano, Ricardo, Uili, Drica, Milene, Marcondes, Clarice, Jana, André e Ariane vocês são parte de mim. A Eraldo, Dione, Luciano, Manuel, Wii, Josiel, Hugo e Adriana obrigada por todo incentivo e apoio. À família de Itabaiana, Renata e Miguel pelo acolhimento.

Aos meus orientadores, Prof. Adriana, Prof. Rafael e Prof. James por me acompanharem, incentivarem e, acima de tudo, por não desistirem de mim; ao Prof. Marcelo, Prof. Gleilton e Prof. Tamires pela disponibilidade, auxílio e incentivo durante a trajetória acadêmica;

Aos núcleos de pesquisa LPNBio, LaBMIC e LAFACE por todo conhecimento compartilhado e ao PPGCF pelo espaço, em especial, a André da Secretaria por não desistir de me responder.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001.

“O sertanejo é, antes de tudo, um forte.”

(Euclides da Cunha em “Os Sertões”)

RESUMO

BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PRÓPOLIS MARROM COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME FRENTE AO MICRORGANISMO *Streptococcus mutans*. Rosana Moura Andrade, São Cristóvão - SE, 2021.

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas para evitar a decomposição e o desenvolvimento de microrganismos patogênicos na colmeia. Os seres humanos utilizam a própolis para tratar doenças, como as infecções microbianas, sobretudo do trato respiratório superior. Entre os microrganismos causadores dessas infecções encontra-se o *Streptococcus mutans*. O biofilme produzido por este microrganismo é um importante fator de virulência, pois o protege da ação de fármacos e antissépticos, bem como é fundamental para adesão à superfície dental. Nesse sentido, produtos naturais antibacterianos que inibam a formação de biofilme podem ser utilizados como alternativa para tratar doenças causadas por microrganismos formadores de biofilmes. Foi proposto, neste trabalho, realizar uma bioprospecção de metabólitos secundários da própolis marrom com potencial antibacteriano e antibiofilme frente ao microrganismo *S. mutans*. O extrato bruto (EB) da própolis marrom foi obtido por maceração e ultrassom, seguido por partição líquido-líquido (PLL), com os solventes hexano (Hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt). Os compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT) foram quantificados espectrofotometricamente. A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada em placas de 96 poços utilizando o método da microdiluição e a formação de biofilme foi evidenciada a partir da coloração com cristal violeta. A fração com melhor atividade antimicrobiana e antibiofilme foi submetida à cromatografia líquida clássica (CLC) e, posteriormente, as subfrações mais ativas analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). A identificação das substâncias foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A obtenção do EB apresentou rendimento de 47,72% ($\pm 0,41$). A fração acetato de etila (FAE) apresentou a maior concentração de CFT ($87,7 \pm 4,93$ mg/g), enquanto a fração diclorometano apresentou a maior concentração de FT ($55,3 \pm 7,52$ mg/g). O extrato bruto exibiu concentração inibitória mínima (CIM) de 512 μ g/mL frente a *S. mutans*. A FD foi a mais ativa frente a *S. mutans*, com CIM de 256 μ g/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 512 μ g/mL, enquanto a FH apresentou CIM de 512 μ g/mL. Para inibição da formação do biofilme, a FH exibiu atividade nas concentrações de 64, 32 e 16 μ g/mL. Já a FD apresentou inibição nas concentrações 32 e 16 μ g/mL. Deste modo, a FD foi submetida ao fracionamento das substâncias por CLC, dando origem a 9 subfrações. Destas frações, SBFG e SBFH foram as mais ativas contra *S. mutans* (CIM e CBM=128 μ g/mL). Após análise por CLAE-DAD observou-se que SBFG e SBFH apresentaram perfil químico semelhante e que os espectros de UV-Vis sugeriram a presença de flavonoides. A análise por RMN ^1H evidenciou a presença de flavonoides do tipo flavona. Com a bioprospecção, foi possível obter duas frações ricas em flavonoides com atividade antibacteriana frente a *S. mutans*. Outras análises químicas ainda devem ser realizadas com o intuito de elucidar a estrutura química destes flavonoides.

Palavras-chave: apiterapia; produtos naturais; cromatografia; *Streptococcus*; biofilme.

ABSTRACT

BIOPROSPECTION OF SECONDARY METABOLITES FROM BROWN PROPOLIS WITH ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM POTENTIAL AGAINST THE MICRO-ORGANISM *Streptococcus mutans*. Rosana Moura Andrade, São Cristóvão-SE, 2021.

Propolis is a natural product produced by bees to prevent the decomposition and development of pathogenic microorganisms in the hive. Humans use propolis to treat diseases such as microbial infections, especially of the upper respiratory tract. Among the microorganisms that cause these infections is *Streptococcus mutans*. The biofilm produced by this microorganism is an important virulence factor, as it protects it from the action of drugs and antiseptics. In this sense, natural antibacterial products that inhibit biofilm formation can be used as an alternative to treat infectious diseases. It was proposed, in this work, to carry out bioprospecting of secondary metabolites of brown propolis with antibacterial and antibiofilm potential against *S. mutans*. The crude extract (EB) of brown propolis was obtained by maceration and ultrasound. Then, the EB was fractionated by liquid-liquid partition (PLL) using hexane (Hex), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (AcOEt). Total phenolic compounds (CFT) and total flavonoids (TF) were quantified spectrophotometrically. The determination of antimicrobial activity was performed in 96-well plates using the microdilution method and biofilm formation was evidenced by crystal violet staining. The fraction with the greatest inhibition of growth and biofilm formation of *S. mutans* was submitted to classical liquid chromatography (LCC) and, later, the most active subfractions were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography with photodiode array detector (HPLC- DAD). The identification of substances was performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Obtaining the EB presented a yield of 47.72% (± 0.41). The ethyl acetate fraction (FAE) presented the highest concentration of CFT (87.7 ± 4.93 mg/g), while the dichloromethane fraction presented the highest concentration of TF (55.3 ± 7.52 mg/g). The crude extract exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 512 $\mu\text{g/mL}$ against *S. mutans*. DF was the most active against *S. mutans*, with MIC of 256 $\mu\text{g/mL}$ and minimum bactericidal concentration (MBC) of 512 $\mu\text{g/mL}$, while FH had a MIC of 512 $\mu\text{g/mL}$. For inhibition of biofilm formation, FH exhibited activity at concentrations of 64, 32 and 16 $\mu\text{g/mL}$. FD, on the other hand, showed inhibition at concentrations of 32 and 16 $\mu\text{g/mL}$. In this way, the FD was subjected to the fractionation of substances by CLC giving rise to 9 subfractions. Of these fractions, SBFG and SBFH were the most active against *S. mutans* (MIC and CBM=128 $\mu\text{g/mL}$). After HPLC-DAD analysis, it was observed that SBFG and SBFH presented similar chemical profiles and that the UV-Vis spectra indicated the presence of flavonoids. The analysis by ^1H NMR evidenced the presence of flavonoids of the flavone type. With bioprospecting, it was possible to obtain two fractions rich in flavonoids with antibacterial activity against *S. mutans*. Other chemical analyzes still need to be performed to elucidate the chemical structure of these flavonoids.

Keywords: apitherapy; natural products; chromatography; *Streptococcus*; biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

ANOVA - Análise de variância

AG – Ácido gálico

MSA – Ágar Mitis Salivarius

ASA - Ágar Sangue

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

But - Butanol

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CCDA - Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CFT – Compostos fenólicos totais

CH - Ciclohexano

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLC - Cromatografia Líquida Clássica

CO₂ - Dióxido de Carbono

DCM - Diclorometano

DHCA - ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico

DMSO - Dimetilsulfóxido

EAU- Extração assistida por ultrassom

EB – Extrato bruto

EPS - Exopolissarídeo

FT – Flavonoides totais

H - Hexano

HPLC - *High performance liquid chromatography*

LPNBio - Laboratório de Produtos Naturais Bioativos

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

MSA – Ágar Mitis Salivarius

NMR- *Nuclear Magnetic Resonance*

O - Oeste

PICS - Práticas Integrativas e Complementares em Saúde

PLL - Partição líquido-líquido

PNSSP - *Streptococcus pneumoniae* não suscetível à penicilina

QUE - Quercetina

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

S – Sul

SBF - Subfração

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUS - Sistema Único de Saúde

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco

UV - Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abelha africanizada polinizando uma flor.....	15
Figura 2 - Abelha africanizada com carga de pólen nas corbículas.	16
Figura 3 - Representação da melgueira e parte específica da melgueira selada com a própolis.	18
Figura 4 - Produtos obtidos a partir da própolis.	19
Figura 5 - Estruturas químicas de benzofenonas preniladas encontradas em diferentes tipos de própolis.	21
Figura 6 - Estruturas químicas de ácidos aromáticos encontrados em diferentes tipos de própolis.	22
Figura 7 - Estruturas químicas de flavonoides encontrados em diferentes tipos de própolis..	23
Figura 8 - Própolis marrom in natura obtida da Fazenda Mangueira, Tucano-BA.	24
Figura 9 - Estruturas químicas de ácido fenólico, benzofenonas preniladas, flavonoide e fenilpropanoide encontrados na própolis.	25
Figura 10 - Ciclo de formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas.	28
Figura 11 - Reação de oxirredução do Folin-Ciocalteu com os compostos fenólicos da própolis.	31
Figura 12 - Reação de formação do complexo do flavonoide com o cloreto de alumínio.	32
Figura 13 - Fluxograma do fracionamento biomonitorado da própolis marrom.	35
Figura 14 - Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.	39
Figura 15 - Curva padrão de quercetina nas concentrações de 6,5, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL.	39
Figura 16 - Atividade antimicrobiana do DMSO nas concentrações 0,25 a 8 % frente <i>S. mutans</i>	41
Figura 17 - Atividade antimicrobiana da própolis marrom frente <i>S. mutans</i>	42
Figura 18 - Atividade antibiofilme da própolis marrom frente <i>S. mutans</i>	46
Figura 19 - Atividade antimicrobiana da própolis marrom frente <i>S. mutans</i>	48
Figura 20 - Representação da placa de 96 poços submetida ao teste determinação da viabilidade celular utilizando subfrações da própolis marrom frente <i>S. mutans</i>	48
Figura 21 - Cromatogramas da subfração G (SBFG) obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico.	49
Figura 22 - Cromatograma e espectros de UV-Vis obtidos da subfração G (SBFG) por CLAE-DAD (Shimadzu®) em modo analítico.	50
Figura 23 - Cromatograma e espectros de UV-Vis obtidos da subfração H (SBFG) por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico.	51
Figura 24 - Espectros de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) da subfração H e G, provenientes da fração diclorometano da própolis marrom.	52
Figura 25 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) da subfração G, provenientes da fração diclorometano da própolis marrom, com as indicações dos hidrogênios típicos de flavonoides.	53
Figura 26 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) da subfração G, provenientes da fração diclorometano da própolis marrom, com as indicações dos hidrogênios típicos de flavonoides.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Apicultura no Brasil	15
2.2 Apiterapia	16
2.3 Própolis.....	17
2.3.1 Constituição química e classificação da própolis.....	20
2.3.2 Própolis marrom	24
2.3.3 Atividade antimicrobiana	26
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	26
2.5 Formação de biofilme	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Coleta de amostras.....	30
4.2 Preparação dos extratos	30
4.2.1 Fracionamento do extrato bruto por partição líquido-líquido (PLL).....	30
4.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT).....	31
4.4 Quantificação dos flavonoides totais (FT).....	31
4.5 Atividade antibacteriana	32
4.5.1 Microrganismo, meios de cultura e cultivo	32
4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	32
4.5.3 Quantificação da inibição da formação do biofilme.....	33
4.5.4 Avaliação da viabilidade celular	33
4.5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	34
4.6 Fracionamento através de Cromatografia Líquida Clássica (CLC).....	34
4.7 Análise através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	35
4.8 Identificação dos metabólitos secundários isolados	36
4.9 Tabulação dos dados e análises estatísticas	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO.....	55

REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

A apicultura é uma atividade que compreende a gestão, criação de abelhas com ferrão e desenvolvimento de técnicas para explorá-las de forma sustentável (PEGORARO et al., 2017). Dentro desta perspectiva, o movimento da apicultura no Brasil apresenta crescimento, dispondo de qualidade elevada nos produtos apícolas obtidos (NASCIMENTO et al., 2018), como: mel, pólen, cera, geleia real, apitoxina e a própolis (PEGORARO et al., 2017).

Utilizada em vários países como suplemento dietético para promoção da saúde e prevenção de doenças, a própolis é um produto elaborado pelas abelhas a partir de resinas contidas em brotos e exsudatos de árvores. Dentre as finalidades para a colmeia, a própolis atua em defesa das abelhas, revestindo e fortalecendo as paredes internas. Além disso, é usada para cobrir buracos e rachaduras, reparar os favos, evitar invasões de insetos e reduzir o crescimento microbiano nas paredes da colmeia, impedindo a entrada de vento e água.

A própolis sofre algumas variações na constituição química e nas características físicas, a exemplo da coloração, principalmente de acordo com a localidade geográfica e origem botânica (SELVARAJ et al., 2018; SILVA, 2018; MARCUCCI et al., 2020; MARCUCCI et al., 2021). Devido a biodiversidade, no Brasil, existem vários tipos de própolis, incluindo a verde, a vermelha e a marrom, que são classificadas de acordo com a região produtora (CARVALHO et al., 2019). Porém, mesmo apresentando variações, os diferentes tipos de própolis compartilham atividades biológicas em comum, destacam-se as propriedades antioxidante, antiviral, imunomoduladora e antibacteriana (SFORCIN, 2016; SOARES et al., 2017; SELVARAJ et al., 2018).

Estudos desenvolvidos com extratos da própolis marrom revelaram atividade antibacteriana, principalmente frente a bactérias Gram-positivas (SOARES et al., 2017). Dentre os gêneros de bactérias Gram-positivas, encontra-se o *Streptococcus*, constituído por espécies que desencadeiam infecções tanto em humanos como em animais. Nos animais de sangue quente, estas bactérias apresentam-se como comensais, mas quando em desequilíbrio podem causar uma série de enfermidades. As infecções causadas por estas bactérias são variadas, desde quadros infecciosos na cavidade oral, até infecções generalizadas (KONEMAN et al., 2008; URTEAGA, 2017).

Streptococcus mutans, por exemplo, é a principal espécie envolvida na formação da cárie, em virtude da sua capacidade de produzir ácido pela fermentação dos açúcares da dieta e de sobreviver em meio ácido, sendo classificada como acidogênica e acidúrica, respectivamente

(GALRÃO et al., 2012; SHETTY et al., 2016). A cárie é um importante problema de saúde pública, especialmente no Brasil, pois as crianças são colonizadas por *S. mutans* precocemente, mesmo antes da erupção dos dentes. Esta colonização precoce pode estar associada ao alto consumo de sacarose, contato com indivíduos altamente infectados e imaturidade do sistema imunológico das mucosas em crianças (BORGES et al., 2015; LYNCH et al., 2015).

Ademais, o gênero *Streptococcus* apresenta cepas patogênicas e resistentes, como por exemplo, *Streptococcus pneumoniae* não suscetível à penicilina (PNSSP). As infecções mais frequentes causadas por esta espécie são otite média, meningite, bacteremia e pneumonia (SANTOS, 2004; LOUREIRO et al., 2016; LOUGHRAN et al., 2019). Ressalta-se que a resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui um obstáculo para a saúde pública, pois apresenta consequências clínicas preocupantes para a sociedade (SANTOS, 2004; LOUREIRO et al., 2016).

A persistência bacteriana nos tecidos está relacionada a alguns fatores de virulência. Dentre estes, os biofilmes se destacam, pois conferem inúmeras vantagens à sobrevivência dos microrganismos, uma vez que realizam sinalização celular, conferem resistência a antibióticos e proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro (SANTOS, 2004; LOUREIRO et al., 2016).

Nesse cenário, a perspectiva de novos fármacos com atividade antimicrobiana é extremamente necessária, justificando a realização de estudos para a obtenção de antimicrobianos que sejam mais eficazes (SINHA; VOHORA, 2018), sobretudo de compostos obtidos da natureza, a qual ainda permanece como a principal fonte de fármacos, entre eles os antimicrobianos (SELVARAJ et al., 2018).

A partir do exposto, esse trabalho se propôs a realizar uma bioprospecção de metabólitos secundários da própolis marrom capazes de inibir o crescimento e a formação de biofilme de *S. mutans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Apicultura no Brasil

A apicultura envolve a criação de abelhas com ferrão e o desenvolvimento de técnicas para explorá-las racionalmente em benefício do homem e da natureza. É uma das atividades econômicas mais importantes e antigas do mundo e contribui ao homem através da produção de mel, própolis, geleia real, cera e pólen, bem como, na agricultura com o serviço de polinização (PEGORARO et al., 2017).

No Brasil, a atividade difundiu-se em 1956, quando imigrantes trouxeram abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) para o país, e estas acidentalmente cruzaram com as espécies europeias trazidas em 1835, a italiana *Apis mellifera ligustica*, a alemã *Apis mellifera mellifera* e a austríaca *Apis mellifera carnica*, formando híbridas, denominadas abelhas africanizadas (Figura 1). Estas últimas são mais adaptadas ao clima tropical e à vegetação, além de apresentarem alta produtividade e resistência às doenças (KERR, 1967; RIBEIRO, 2017).

Figura 1 - Abelha africanizada polinizando uma flor.

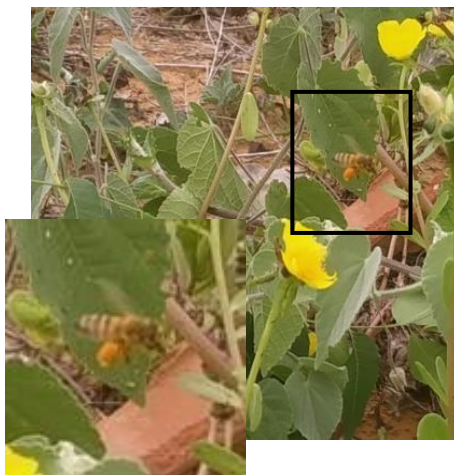


Na margem esquerda superior pode-se observar a abelha com aumento de 12 x. Fonte: próprio autor.

A apicultura cerca um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável do espaço rural, enquanto fonte de rendimento e emprego (GPP, 2016). Neste contexto, apresenta-se como uma importante fonte de renda para os produtores rurais, por ser uma atividade de simples manejo, custos iniciais de implantação de apiários relativamente baixos e por aproveitar

os recursos naturais disponíveis como o néctar e o pólen (Figura 2) (LOURENÇO; CABRAL, 2016).

Figura 2 - Abelha africanizada com carga de pólen nas corbículas.



Na margem direita inferior pode-se observar a abelha com aumento de 12 x. Fonte: próprio autor.

Os produtos apícolas eram considerados pelas antigas civilizações como valiosos recursos terapêuticos em suas práticas medicinais. Neste aspecto, foram descritas formulações centenárias para prevenção e tratamento de doenças nas civilizações assírias, tibetanas, incas, persas, egípcias, greco-romanas e chinesas. A partir disso, para essa última civilização, verifica-se a consolidação da criação da medicina alternativa com os produtos apícolas, denominada de apiterapia (ALMEIDA, 2017; BERRETA et al., 2017;).

2.2 Apiterapia

Diversos modelos de medicina alternativa são considerados como válidos pela medicina convencional e também apresentam resultados positivos, dentre os principais, estão: acupuntura, fitoterapia, quiropraxia, homeopatia, aromoterapia e apiterapia. A medicina alternativa consiste em tratar as doenças sem utilizar medicamentos controlados, antibióticos ou fármacos em geral. Portanto, a principal característica desta prática é a ênfase no tratamento com foco no paciente e não apenas nos sintomas causados pela doença. No Brasil, a medicina alternativa é utilizada desde antes o século XV para o tratamento de várias afecções (MOREIRA, 2012; PROKIPCHUK, 2017). Dentre as terapias existentes no Brasil, encontram-se as Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS). Uma delas é apiterapia, a qual

é classificada como o método integrativo que utiliza os produtos produzidos pelas abelhas para promoção, manutenção da saúde e auxílio complementar no tratamento de algumas doenças, tais como, esclerose múltipla e artrite. Em situações específicas, a apiterapia pode contribuir com o Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente quando analisada comparativamente às melhorias que ela pode proporcionar a alguns pacientes, com economia de gastos da instituição pública por utilizar matéria-prima de baixo custo (BRASIL, 2018; RUVOLO-TAKASUSUKI, 2019). A apiterapia é praticada desde a antiguidade, conforme mencionado por Hipócrates em alguns textos e em textos Chineses e Egípcios. Os produtos da colmeia são denominados de apiterápicos e incluem apitoxina, geleia real, pólen, mel e própolis (BRASIL, 2018).

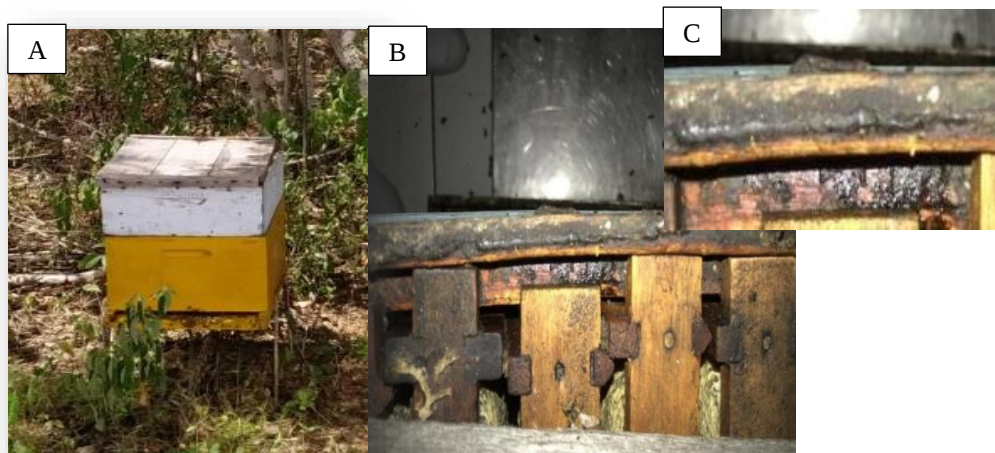
2.3 Própolis

Dentre os produtos obtidos na colmeia, destaca-se a própolis. Nos últimos anos, a própolis de regiões tropicais, especialmente do Brasil, tem sido alvo de grande interesse econômico e compõe um espaço importante no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, principalmente, às pesquisas das inúmeras atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes (MARTINEZ; SOARES, 2012; SILVA et al., 2017).

A própolis é definida de modo generalista como um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de diferentes partes das plantas, como folhas, galhos, brotos, flores, caules e exsudados de plantas, nas quais elas acrescentam cera, pólen e secreções salivares (BRASIL, 2000; POBIEGA et al., 2019). Para esse último, verifica-se a designação da própolis como um produto natural apoterápico, por caracterizar-se como um produto que é obtido a partir de secreções, glândulas, órgãos ou tecidos de animais. Para a coleta da própolis na colmeia, o apicultor realiza a raspagem, nesse aspecto, algumas sujidades podem ser encontradas, como exemplo, lascas de madeira e terra. A busca por melhorar a qualidade da própolis permitiu o surgimento de novas técnicas, como o uso de telas coletoras abaixo da tampa e coletor de própolis inteligente (INOUE et al., 2007; PORTILHO et al., 2013).

A etimologia da palavra própolis tem origem da língua grega: *pro* que significa “em defesa” e *polis*, que significa “cidade”, ou seja, “a favor/em defesa da cidade”. Comumente, é destinada para diferentes propósitos pela abelha, tais como, selar fissuras e vedar espaços que impedem distúrbios na estabilidade da colmeia ocasionada por ventos, chuvas e radiação prolongada (Figura 3).

Figura 3 - Representação da melgueira e parte específica da melgueira selada com a própolis.



(A) Melgueira (caixa branca) apresentada de forma externa. (B) Melgueira apresentada de forma interna com depósito de própolis. (C) Detalhe evidenciando a presença da própolis, aumento de 12 x. Fonte: próprio autor.

As abelhas também utilizam a própolis para criar um ambiente asséptico nos favos, nos locais onde o mel está em elaboração, além disso, revestem a entrada da colmeia. Desse modo, quando a abelha adentra a colmeia, fica livre de contaminação ao entrar em contato com a própolis que reveste a entrada do ninho. Ademais, a própolis é utilizada para envolver animais invasores, evitando a decomposição e o desenvolvimento de microrganismos que podem infectar a colmeia (KAWAKITA et al., 2015; BERRETTA et al., 2017; KHURSHID et al., 2017; NOUSHIN; ALIREZA, 2017).

No Egito antigo, pesquisas evidenciam que a própolis era utilizada como um dos produtos para embalsamar os mortos. Além disso, existem relatos de gregos, que mencionavam como um bom agente cicatrizante interno e externo. Na Segunda Guerra Mundial, a própolis era empregada em clínicas soviéticas, devido ao seu elevado potencial cicatrizante. Atualmente, é um importante produto para a indústria farmacêutica, química e alimentícia, sendo amplamente estudada e melhor cotada pelo mercado, devido aos seus inúmeros benefícios e utilidades divulgadas por pesquisas científicas e por profissionais da área (PEREIRA et al., 2015).

A própolis também pode ser utilizada como conservante de alimentos, a exemplo de bebidas lácteas e sucos de frutas, devido às suas propriedades antimicrobianas (THAMNOPOULOS, 2018). No entanto, há uma limitação do uso da própolis em alimentos devido a sua amargura, que proporciona sabores fortes e desagradáveis, alterando as características sensoriais dos alimentos (OSÉS et al., 2016; SEIBERT et al., 2019). Por esta

razão, este produto natural é amplamente consumido na forma encapsulada (Figura 4), pois minimiza os impactos das suas propriedades organolépticas. Também é utilizada na forma de extrato alcoólico ou aquoso (Figura 4), dentifrícios e na fabricação de cosméticos (BANKOVA et al., 2000; DONSI; FERRARI, 2016).

Figura 4 - Produtos obtidos a partir da própolis.



(A) Extrato de própolis em cápsula, (B) extrato de própolis alcoólico e (C) extrato de própolis aquoso. Fonte: <https://www.saovito.com/para-adocar/mel-e-derivados>.

Apesar das diferenças relacionadas à composição química, a própolis apresenta diversas propriedades biológicas semelhantes, dentre elas destacam-se as propriedades antioxidante, antiparasitária, antiinflamatória, antiproliferativa, cicatrizante, antiviral, antifúngica e antibacteriana (JUG et al., 2014; SFORCIN, 2016; SOARES et al., 2017; SELVARAJ et al., 2018; PRZYBYLEK; KARPIŃSKI, 2019). Tais propriedades biológicas são provenientes primariamente devido à presença e as diferentes classes de metabólitos secundários encontrados, como: flavonoides e benzofenonas (NASCIMENTO et al., 2019).

Nesse sentido, o interesse disseminado pela própolis tem estimulado um grande número de estudos considerando as suas propriedades químicas e biológicas (BERRETA et al., 2017). Em um estudo realizado com extrato de própolis marrom de Santa Catarina, observou-se que a própolis pode ser utilizada em coterapia com vacinas para inibir parvovírus e coronavírus canino, uma vez que a mesma estimula a resposta imunológica (FERNANDES et al., 2015).

Atualmente, a própolis tornou-se alvo de pesquisas devido à sua eficácia no combate ao coronavírus (HASHEM, 2020). De fato, em um estudo de casos com pacientes diagnosticados com COVID-19, observou-se que a utilização do extrato de própolis verde por esses pacientes diminuiu significativamente a sintomatologia, a ponto dos pacientes relatarem que se sentiam

bem e sem a doença (MATOSO; MATOSO, 2020). Em um trabalho envolvendo um ensaio clínico randomizado e controlado, com 124 pacientes adultos e hospitalizados com COVID-19, constatou-se que a terapia adjuvante com extrato de própolis verde brasileiro padronizado reduziu significativamente o tempo de internação pós-intervenção (SILVEIRA et al., 2021).

Medeiros e colaboradores (2019) testaram a utilização de uma solução de extrato de própolis como agente antimicrobiano e cicatrizante em feridas cutâneas de cão. Nas respectivas condições de desenvolvimento do trabalho, obtiveram que o uso da solução do extrato de própolis foi eficaz no controle da infecção e no processo de cicatrização das feridas do animal.

Sabe-se que a busca por alternativas terapêuticas para diversas afecções faz da pesquisa de produtos naturais uma área produtiva em opções de substâncias com diferentes atividades biológicas, como exemplo, a própolis (GRANDIS et al., 2015). Nesse sentido, necessita-se da busca de métodos extrativos específicos, que possam ser realizados de forma rápida, simples, eficaz, reprodutível e utilizando-se de solventes de baixa toxicidade, facilmente recuperáveis e de baixo custo. Para isso, os processos mais utilizados na extração de produtos naturais são as técnicas de extração a frio: maceração, percolação e turboextração; e as técnicas de extração a quente: infusão, decocção, extração por arraste a vapor d'água e por Soxhlet (SARKER et al., 2005).

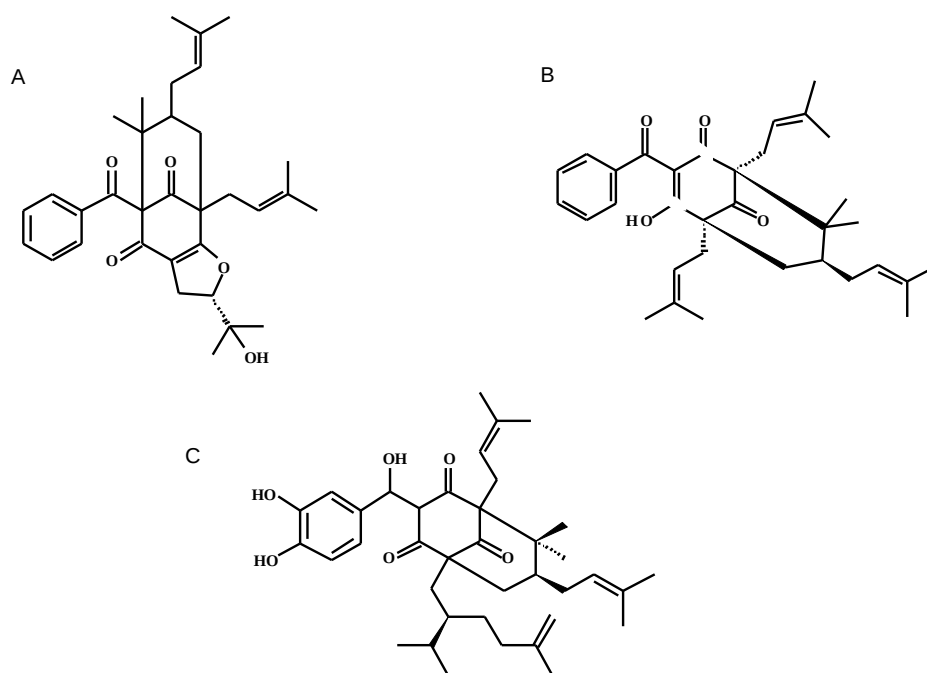
Para produção de extratos de própolis a técnica mais empregada é a extração etanólica por maceração estática ou dinâmica (MACHADO et al., 2015). Nessa técnica, utiliza-se a amostra e um solvente para extração dos compostos de interesse da matriz, empregando-se ou não o uso do calor, bem como a agitação (SALAS et al., 2010). Dentre os métodos não convencionais para a extração de compostos da própolis encontra-se a extração assistida por ultrassom, que consiste na aplicação de ondas sonoras produzidas por um transdutor que causam mudanças na estrutura da matriz, aumentando a área de superfície de contato com o solvente, facilitando assim a taxa de transferência de massa, já que a própolis bruta é uma matriz de difícil cominuição (TAKEUCHI et al., 2009).

2.3.1 Constituição química e classificação da própolis

A composição química da própolis é alvo de várias pesquisas devido às suas propriedades biológicas e variabilidades (RUFATTO et al., 2017; AHANGARI et al., 2018; ANJUM et al., 2019). Nesse aspecto, evidencia-se que a composição química varia qualitativamente e quantitativamente, de acordo com alguns fatores, como o clima, origem botânica, localização geográfica e sazonalidade (FREIRES et al., 2016; SILVA et al., 2017).

De modo geral, a própolis é composta por cerca de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de uma miríade de substâncias químicas como: minerais (Al, Zn, Ca, Fe, Cu, Mg e Sr) e vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E), aminoácidos e ácidos graxos, além de metabólitos secundários da classe das lignanas, chalconas, terpenos e flavonoides, que apresentam grupos funcionais como: álcoois, aldeídos e cetonas aromáticas, como as benzofenonas preniladas (Figura 5). Diversos compostos fenólicos já foram identificados na própolis, como os ácidos aromáticos: ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido benzoico e ácido salicílico (Figura 6) e os flavonoides miricetina, galangina, apigenina, crisina, kaempferol, pinocembrina, naringenina, tectocrisina, pinostrobrina e quercetina (Figura 7) (BANKOVA et al., 2000; BANKOVA, 2005; BARLAK et al., 2011; HUANG et al., 2014; KEDZIA; HOLDERNA-KEDZIA, 2017; GAVANJI; LARKI, 2017).

Figura 5 - Estruturas químicas de benzofenonas preniladas encontradas em diferentes tipos de própolis.

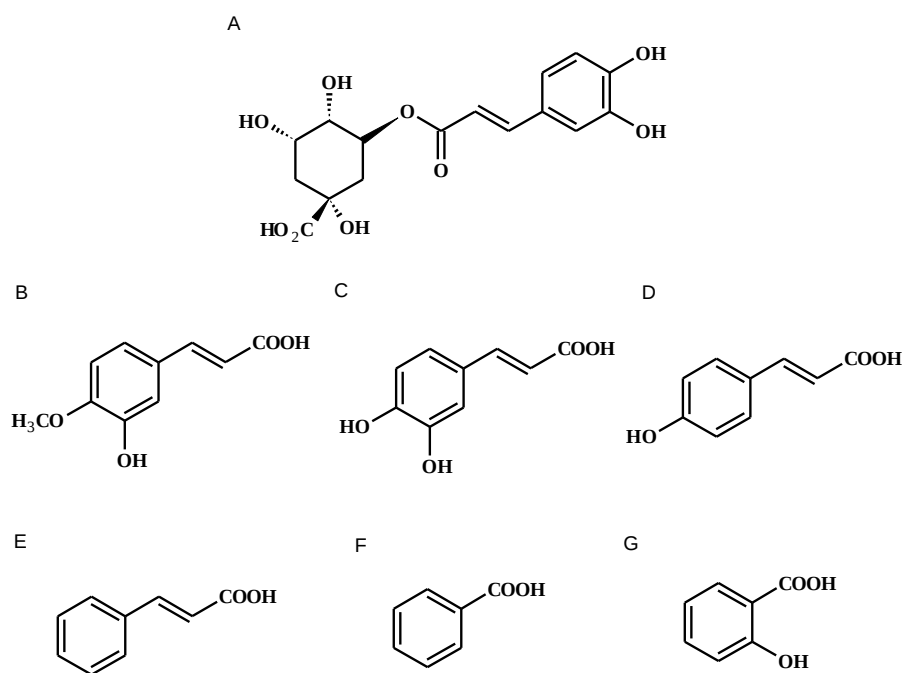


(A) Hiperobona A, (B) 7-epiclusionona e (C) xantochimol. Fonte: elaborado no *ChemSketch*[®], próprio autor.

Dentre os flavonoides que foram identificados na própolis, destaca-se a crisina, que foi o primeiro a ser identificado (Figura 7D) (JAUBERT, 1926). Ademais, outros exemplos de

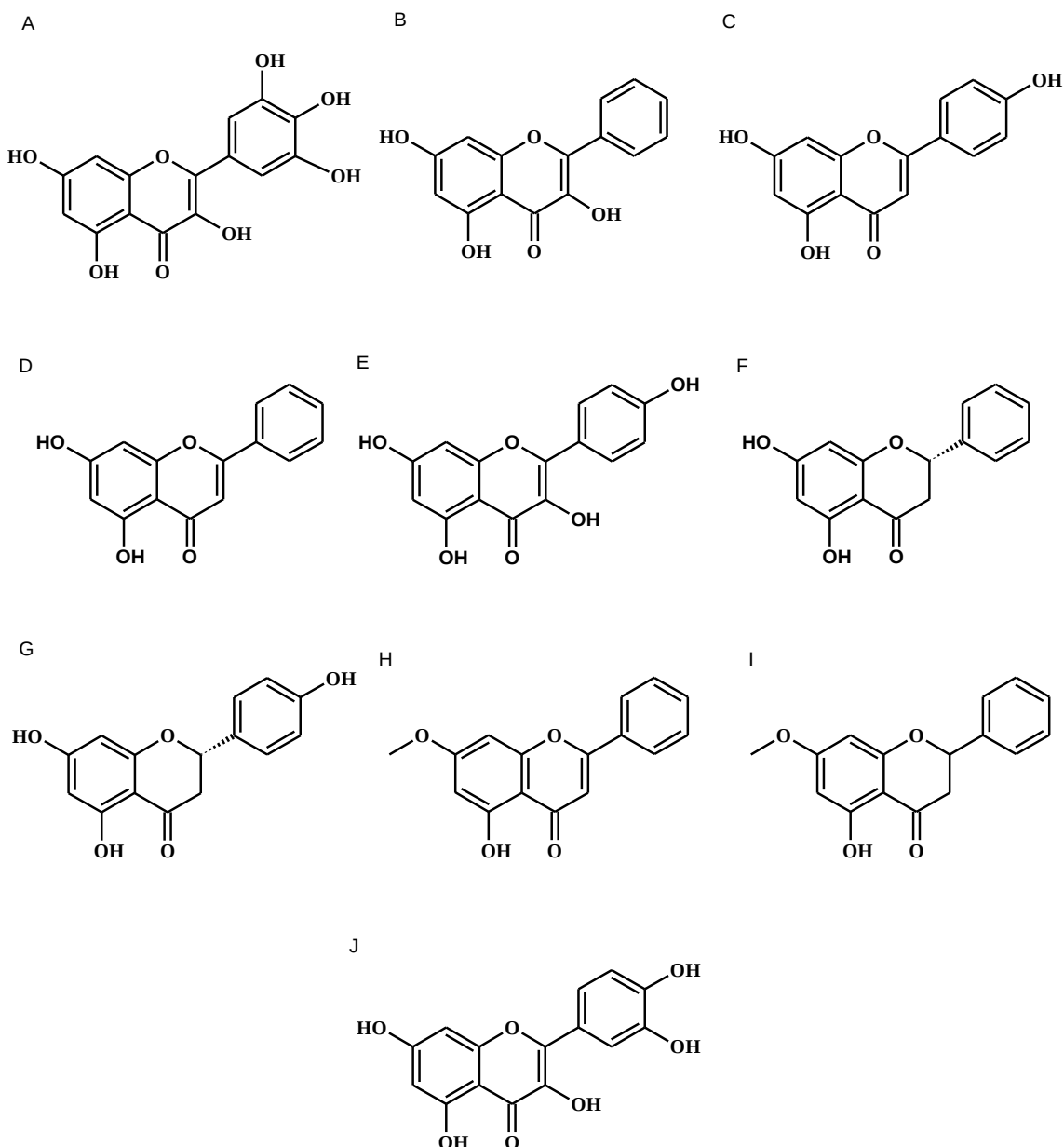
descobertas de flavonoides em própolis envolvem a galangina (Figura 7B) e a pinocembrina (Figura 7F) que se encontram entre os primeiros flavonoides que foram isolados (VILLANUEVA et al., 1964; VILLANUEVA et al., 1970).

Figura 6 - Estruturas químicas de ácidos aromáticos encontrados em diferentes tipos de própolis.



(A) Ácido clorogênico, (B) ácido ferúlico, (C) ácido cafeico, (D) ácido *p*-cumárico, (E) ácido cinâmico, (F) ácido benzoico e (G) ácido salicílico. Fonte: elaborado no *ChemSketch*[®], próprio autor.

Figura 7 - Estruturas químicas de flavonoides encontrados em diferentes tipos de própolis.



(A) Miricetina, (B) galangina, (C) apigenina, (D) crisina, (E) kaempferol, (F) pinocembrina, (G) naringenina, (H) tectocrisina, (I) pinostrobin e (J) quercetina. Fonte: elaborado no *ChemSketch*[®], próprio autor.

No Brasil, são encontrados 14 tipos de própolis classificadas quanto à origem botânica, propriedades físico-químicas e localização geográfica (DAUGSCH et al., 2008; FERREIRA et al., 2017). Cada tipo de própolis apresenta algumas diferenças na composição química, e muitos fatores podem influenciar tal constituição, como por exemplo, a época de coleta, flora local, espécie de abelha produtora e métodos extrativos (SILVA et al., 2019).

De acordo com a análise polínica da própolis, verifica-se a origem geográfica, além da associação à vegetação e às condições ambientais ao redor do apiário. A descoberta das fontes

vegetais que originam a própolis pode auxiliar na caracterização da origem geográfica e botânica (BARTH, 2006; BANKOVA et al., 2009).

Dentre os tipos de própolis encontrados, verifica-se a própolis verde, vermelha e marrom (SILVA et al., 2013; AGUIAR et al., 2018). A própolis verde é produzida principalmente em Minas Gerais, e a sua origem botânica predominante é a espécie *Baccharis dracunculifolia* (SILVA, 2018). A própolis vermelha é proveniente da região Nordeste do Brasil, sua origem botânica é *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie predominante do estado de Alagoas (AGUIAR, 2018). Já a própolis marrom é produzida em todo território nacional, sendo caracterizada como o tipo mais comum e oriundo de várias espécies vegetais (ALENCAR et al., 2005).

2.3.2 Própolis marrom

Park e colaboradores (2000) afirmam que a maior produção de própolis no Nordeste é de própolis marrom (Figura 8) e vermelha. Entretanto, sabe-se que os estudos em relação à própolis marrom são mais frequentes com amostras oriundas das regiões Sul e Sudeste do país. As evidências atuais inferem que a própolis marrom é quimicamente diversa e a ela são atribuídas resinas de espécies de plantas nativas ou cultivadas (MACHADO et al., 2016; TAZAWA et al., 2016).

Figura 8 - Própolis marrom in natura obtida da Fazenda Mangueira, Tucano-BA.

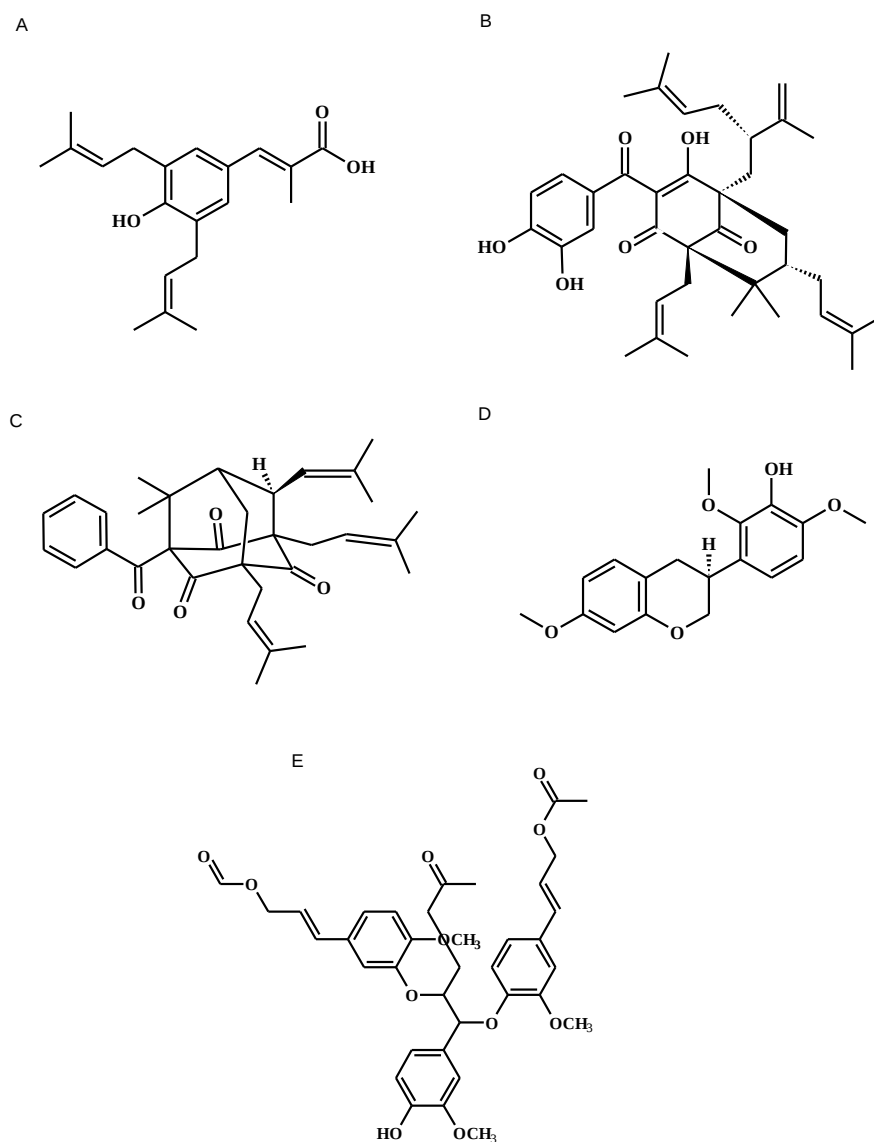


Fonte: próprio autor.

A própolis marrom produzida no município de Cabo Verde (Minas Gerais), que engloba o Sudeste do Brasil, apresentou em sua constituição um óleo volátil com atividades antimicrobianas e leishmanicidas, que demonstrou conter principalmente monoterpenos e sesquiterpenos (RIBEIRO et al., 2020). Dentre os constituintes químicos encontrados na própolis marrom, tem-se o ácido fenólico derivado do ácido cinâmico Artepelina C ou DHCA

(ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), composto característico de *B. dracunculifolia* e marcador químico da própolis verde. Além disso, na própolis marrom foram descritos compostos fenólicos pertencentes à classe das lignanas, metabólitos secundários que são encontrados nas resinas das flores da espécie *Clusia rosea*, que indica o gênero *Clusia* como origem floral da própolis marrom brasileira (ANDRADE et al., 2017). Sabe-se que, além das lignanas associadas a *C. rosea*, encontram-se também benzofenonas poli-isopreniladas, tais como: xantochimol (Figura 5C), guttiferona E e pluketione A que apresentam destaque dentre os constituintes da própolis marrom. Além disso, têm sido descritos outros compostos como mucronulatol e escrobiculatona A (CUESTA et al., 2002; HERRERA, 2016) (Figura 9).

Figura 9 - Estruturas químicas de ácido fenólico, benzofenonas preniladas, flavonoide e fenilpropanoide encontrados na própolis.



(A) Artepelina C, (B) guttiferona E, (C) pluketione A, (D) mucronulatol e (E) escrobiculatona A. Fonte: elaborado

no ChemSketch®, próprio autor.

Ademais, o ácido clorogênico encontrado na própolis marrom indica a presença de gênero *Citrus* como fonte de recursos florais para sua biossíntese (HUANG et al, 2014). A aroeira, espécie do gênero *Schinus*, também oferece matéria prima para as abelhas produzirem própolis, especialmente na região Nordeste (BREYER et al., 2016). Bankova e colaboradores (2000) evidenciaram a presença de acetofenonas e diterpenos (sugiol e ácido agático), típicos do gênero *Araucaria*. Outros diterpenos de origem indeterminada também foram relatados para este tipo de própolis (TAZAWA et al., 2016). Todos estes constituintes parecem contribuir conjuntamente para as propriedades biológicas da própolis, com destaque da atividade antimicrobiana.

2.3.3 Atividade antimicrobiana

Sabe-se que os compostos fenólicos presentes na própolis estão entre os constituintes com propriedades antibacterianas. Alguns estudos verificaram a eficiente propriedade bacteriostática e bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo estas, atribuídas aos flavonoides, que atuam causando disfunções metabólicas e estruturais na célula bacteriana (TEIXEIRA et al., 2010; SFORCIN; BANKOVA, 2011; BRODOWSKA, 2017).

Nesse sentido, foi verificada a atividade antibacteriana com amostras de própolis do norte da Bahia frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Além disso, outros compostos presentes na própolis destacam-se como antimicrobianos como os compostos da classe das benzofenonas prenildas (Figura 5). Pode-se destacar a benzofenona prenildada denominada hiperibona A (Figura 5-1), responsável por apresentar atividade contra *S. aureus*, além de patógenos da cavidade oral, como *S. mutans* e *S. gordonii*. Além do exposto, verifica-se também que hiperibona A (Figura 5-1) apresenta inibição de adesão de *S. mutans* em superfícies, fase inicial na formação de biofilme (CASTRO et al., 2009).

Outro composto pertencente à classe das benzofenonas prenildas (Figura 5) e de interesse biológico é a 7-epiclusianona (Figura 5-2). Verificou-se que esta substância apresenta atividade antibacteriana e inibição de formação do biofilme de *S. mutans* (MURATA et al., 2008; SELVARAJ et al., 2018).

2.4 *Streptococcus mutans*

O gênero *Streptococcus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem

Lactobacillales e à família Streptococcaceae. Atualmente, este gênero abrange 67 espécies e 12 subespécies. São bactérias esféricas (cocos) e Gram-positivas dispostas em pares ou cadeias. Além disso, são microrganismos imóveis que não esporulam e nem produzem as enzimas catalase e oxidase. A maioria das espécies é anaeróbia facultativa, entretanto, algumas espécies crescem somente em atmosfera enriquecida com dióxido de carbono (capnofilia). Características fenotípicas, como também o tipo de hemólise e a sorotipagem baseada na antigenicidade de polissacarídeos capsulares são empregadas para caracterizar as espécies de *Streptococcus* (KONEMAN et al., 2008; URTEAGA, 2017).

Estas espécies são capazes de promover hemólise, cujo tipo é identificado a partir da observação dos produtos de degradação das hemácias pelas bactérias em ágar sangue (ASA). Na β -hemólise, as hemácias são completamente destruídas, na α -hemólise as hemácias são destruídas parcialmente e na γ -hemólise não ocorre destruição total. Já as reações sorológicas são evidenciadas com o tipo de carboidrato C presente na parede bacteriana, classificando-as em grupos de A-W. Dentro dessa classificação, os grupos causadores de doenças em humanos são A, B, C, D, F e G (MURRAY et al., 2014).

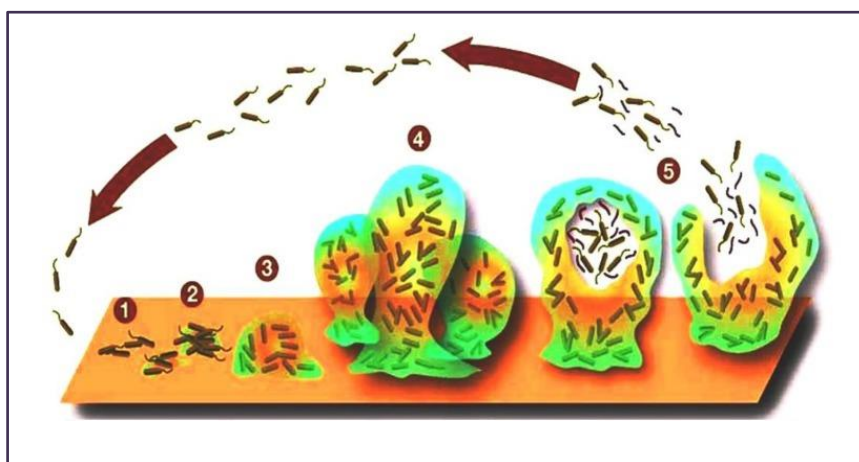
Na natureza, as espécies são distribuídas como comensais, no entanto, em desequilíbrio, podem causar uma série de enfermidades nos animais e no homem. As espécies potencialmente patogênicas ou não patogênicas estão presentes na pele e mucosas do trato digestivo, genital e respiratório, e podem em determinadas condições causar doenças. Dentre as doenças frequentemente causadas por esse gênero de bactérias encontram-se, infecções do trato respiratório, pele e tecidos moles, endocardites, sepse e meningites (KONEMAN et al., 2008; URTEAGA, 2017).

S. mutans, por exemplo, é uma espécie que coloniza a superfície dentária e está associada ao desenvolvimento de cáries. Acumula-se no biofilme e produz ácidos que promovem a desmineralização do esmalte dentário. A cárie é uma doença infecciosa e um problema de saúde pública, especialmente no Brasil, pois as crianças são colonizadas por *S. mutans* precocemente, mesmo antes da erupção dos dentes. A colonização precoce pode estar associada ao alto consumo de sacarose, contato com indivíduos altamente infectados e imaturidade do sistema imunológico das mucosas em crianças (BORGES et al., 2015; LYNCH et al., 2015). A partir do exposto, a patogenicidade desta espécie está relacionada principalmente ao estado imunológico do hospedeiro e a fatores de virulência. Dentre esses fatores encontra-se a formação de biofilme.

2.5 Formação de biofilme

O termo “biofilme” descreve uma forma de vida microbiana estruturada, funcional e sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a superfícies sólidas e úmidas (HENRIQUES et al., 2013) (Figura 10). Nesse aspecto, os biofilmes podem se desenvolver através da aderência em superfícies abióticas, como plásticos e metais, bem como, em superfícies bióticas, como dentes, células, tecidos animais ou vegetais (TRENTIN et al., 2013; WRIGHT et al., 2015;). Após a adesão, as bactérias multiplicam-se e embebem-se em uma matriz viscosa, composta de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por elas próprias (SIMÕES et al, 2010). Esta matriz é essencial para a longevidade do biofilme, uma vez que atua como um esqueleto de suporte, e concomitantemente funciona como uma barreira que limita a difusão de íons, metabólitos microbianos, nutrientes e antimicrobianos, dispondo de proteção para *S. mutans* mediante o fortalecimento da permanência no local da infecção (XIAO et al, 2012).

Figura 10 - Ciclo de formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas.



1 - células bacterianas planctônicas (livres) 2 - fixação inicial, 3 - adesão (desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme), 4 - expansão, 5 - maturação e dispersão. Fonte: adaptado de Stoodley, 2002 e Verderosa 2019.

A partir do exposto, tem sido identificado que microrganismos que residem em biofilmes diminuem a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (RICHTER, 2017). Dessa forma, a busca por terapias para tratar essas afecções tem se tornado um grande desafio, já que a formação dos biofilmes dificulta a atuação do sistema imunológico como também a terapia com antibióticos. Nesta perspectiva, as pesquisas com produtos naturais apresentam-se como principal alvo para busca por substâncias bioativas com finalidade antimicrobiana, tais substâncias não apresentam apenas finalidade terapêutica, mas também econômica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar bioprospecção de metabólitos secundários da própolis marrom com potencial antibacteriano e antibiofilme frente a *Streptococcus mutans*.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato bruto (EB) da própolis marrom por maceração/ultrassom e fracionar o EB utilizando partição líquido-líquido (PLL);
- Realizar a quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT) do EB e frações obtidas da própolis marrom;
- Avaliar a atividade inibitória do extrato e frações sobre o crescimento e formação do biofilme de *S. mutans*;
- Fracionar e analisar metabólitos secundários utilizando Cromatografia Líquida Clássica (CLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD);
- Identificar os metabólitos secundários por CLAE-DAD e RMN ^1H ;

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de amostras

A própolis marrom (número de cadastro SisGen A59BE98) foi proveniente de colmeias de abelhas africanizadas padrão Langstroth da Fazenda Mangueira, localizada no município de Tucano (BA), Rodovia Br 116 (10° 50'51'' S e 38° 51'12'' O), em dezembro de 2020. O transporte da própolis foi realizado em caixa térmica (Soprano) a 2°C e armazenada sob refrigeração a 4°C no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio), do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia Filho (Lagarto-SE).

4.2 Preparação dos extratos

Para o preparo do extrato bruto, 220 g de própolis foram cominuídos em fragmentos com cerca de 11,72 mm. Cento e setenta e dois gramas de própolis foram submetidos ao método de maceração estática por 72 horas a 25 °C, seguida de extração assistida por ultrassom (EAU) (Marca: Unique. Modelo USC-1450A. São Paulo, Brasil.) por 30 minutos a 25 °C. Realizou-se também a extração utilizando 16 g de própolis, em triplicata, para a determinação do rendimento de extração e para a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides. Como solvente extrator, utilizou-se etanol absoluto (99,8% v/v), sendo empregada a razão entre massa de própolis/volume de solvente de 1:10, m/v (TRUSHEVA et al., 2007; CAMPOS et al., 2017 adaptado). Em seguida, foi realizada a filtração simples com papel de filtro qualitativo (Unifil®) e evaporação do solvente em evaporador rotativo (Marca: Alpax, Modelo: EQ 9027, São Paulo, Brasil), sob pressão reduzida e a 40 °C.

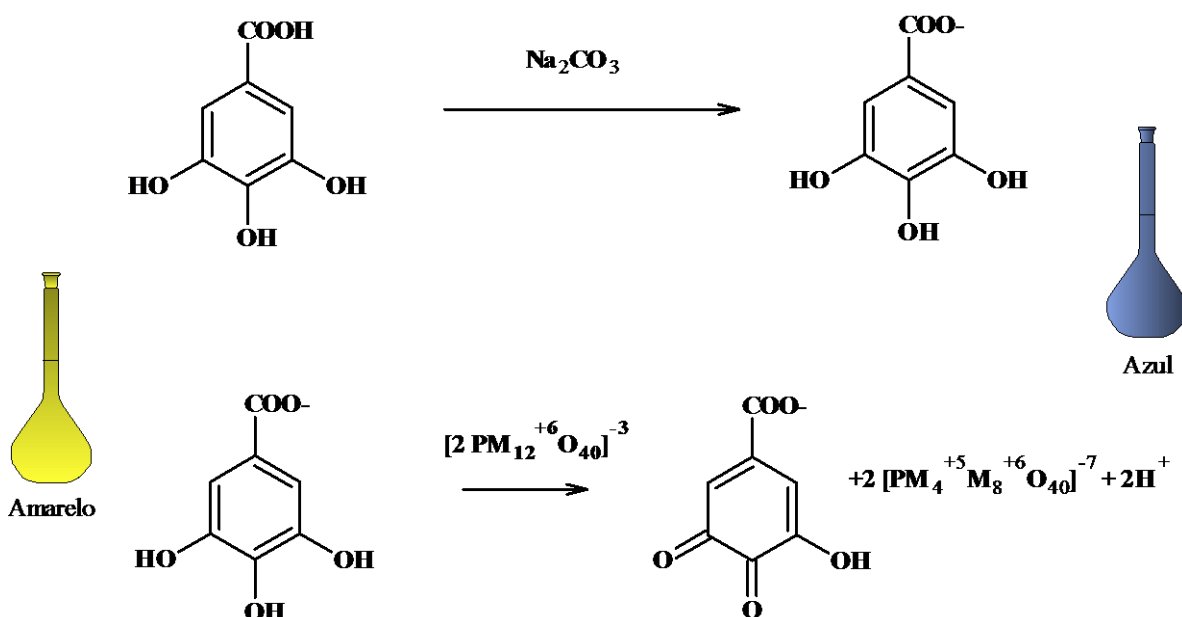
4.2.1 Fracionamento do extrato bruto por partição líquido-líquido (PLL)

Realizou-se a partição líquido-líquido (PLL) a partir de 76,7 g de extrato bruto, em um funil de separação de 1000 mL. A PLL foi realizada utilizando hexano, diclorometano e acetato de etila. Inicialmente, o extrato bruto foi dissolvido em 400 mL de etanol/água 60:40 (v/v). Em seguida, procedeu-se a PLL com os solventes na ordem crescente de polaridade: hexano (3 x 133,4 mL) diclorometano (3 x 133,4 mL) e acetato de etila (3 x 133,4 mL). Posteriormente, realizou-se a eliminação dos solventes de todas as frações obtidas em evaporador rotativo a 40° C (SANTANA et al., 2019).

4.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT)

A quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Figura 11) com modificações. Inicialmente, a amostra foi dissolvida em metanol em uma concentração de 0,5 mg/mL. Em seguida, em tubos de ensaio, foram transferidos 0,5 mL da amostra, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) e 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 4% (m/v). Após 2 horas de incubação dos tubos protegidos da luz, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 765 nm (Marca: Kasuaki. Modelo: Visible Spectrophotometer, São Paulo, Brasil). Uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada para quantificar os CFT. O conteúdo foi expresso em mg de ácido gálico por grama de extrato (mg AG/g de extrato).

Figura 11 - Reação de oxirredução do Folin-Ciocalteu com os compostos fenólicos da própolis.



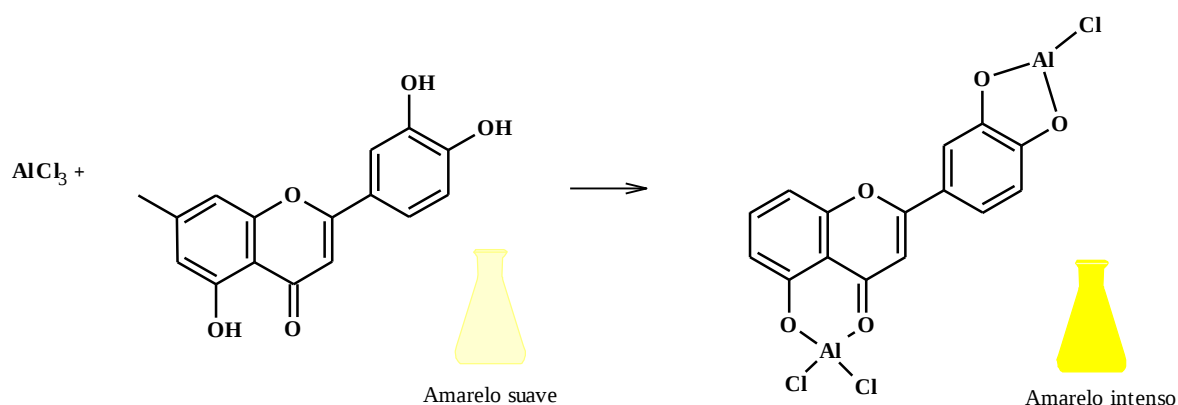
Fonte: elaborado no ChemSketch®, próprio autor.

4.4 Quantificação dos flavonoides totais (FT)

A quantificação de flavonoides totais (FT) foi realizada utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) (Figura 12), segundo o método adaptado de Meda e colaboradores (2005). Inicialmente, a amostra foi dissolvida em metanol em uma concentração de 0,5 mg/mL. Em tubos de ensaio,

foram transferidos 0,5 mL da amostra, 0,5 mL de cloreto de alumínio 2% (m/v) e 2,5 mL de metanol. Após 30 min de incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Construiu-se uma curva padrão a partir de soluções de quercetina com as concentrações 6,5 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. O conteúdo foi expresso em mg de quercetina por grama de extrato (mg QUE/g de extrato).

Figura 12 - Reação de formação do complexo do flavonoide com o cloreto de alumínio.



Fonte: elaborado no *ChemSketch*®, próprio autor.

4.5 Atividade antibacteriana

4.5.1 Microrganismo, meios de cultura e cultivo

Para o fracionamento bioguiado dos metabólitos secundários, foi utilizada a espécie *S. mutans* (UA159) (AJDÍC et al., 2002), gentilmente cedida pela Prof. Dr.^a Rita de Cássia Café Ferreira da coleção do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da Universidade de São Paulo (USP), preservada em glicerol (-20°C) e armazenada em freezer doméstico. Para cultivá-la, realizou-se o semeio em placa de Petri contendo Ágar nutriente acrescido com 5% de sangue de carneiro (ASA). Em seguida realizou-se a incubação a 37 °C em estufa microbiológica suplementada com 5% de CO_2 . A partir de uma colônia isolada, foi feito inóculo em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). O caldo com o microrganismo foi incubado a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 até atingir o crescimento correspondente a 0,5 da escala de Mcfarland (10^8 UFC/mL) ou a absorbância de 0,1 a 600 nm obtida utilizando espectrofotômetro (ANDRADE, 2019).

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM do dimetilsulfóxido (DMSO), extrato bruto, frações e subfrações utilizou-se o método de microdiluição em caldo. Os inóculos foram preparados previamente em BHI, e as absorbâncias ajustadas a 0,1 a 600 nm. Após cada obtenção da suspensão bacteriana a 0,1 de absorbância, realizou-se a diluição de 1:100. Inicialmente, realizou-se a determinação da CIM do DMSO, partindo-se de 0,25 a 8%. Posteriormente, foram realizados os ensaios com o extrato, frações e subfrações dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) absoluto e diluídos em meio de cultura com auxílio de uma micropipeta multicanal (Marca: Kasvi. Modelo: Premium black. França), de modo que, a concentração final nos poços fosse de 8 a 512 µg/mL. Doravante, as microplacas foram incubadas em estufa microbiológica (Marca: Shel Lab, Modelo: SCO2W, EUA) por 24 h a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. A determinação das CIM's foi constatada com a observação visual da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, além disso, verificou-se a absorbância das microplacas em leitor de microplaca (Marca: Thermo Labsystems. Modelo: Multiskan EX355, EUA) a 600 nm.

4.5.3 Quantificação da inibição da formação do biofilme

Após a determinação das CIM's (4.5.2), foi quantificada a formação de biofilme nos cultivos, com as diferentes concentrações (8 a 512 µg/mL) de extrato e frações. Inicialmente, removeu-se o sobrenadante a partir de quatro lavagens com água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 µL de uma solução de álcool metílico para fixação do biofilme por 15 min. Logo após, adicionou-se 125 µL de uma solução 0,1% de cristal violeta e a microplaca foi incubada a 25°C por 15 min. Posteriormente, a microplaca foi submetida a quatro lavagens e, em seguida, o biofilme corado foi solubilizado utilizando 125 µL de ácido acético 30%. Na sequência, incubou-se a microplaca a 25°C por 15 min e, transferiu-se 100 µL da solução contendo o biofilme corado e solúvel para uma nova microplaca. A leitura da absorbância foi realizada a 600 nm em leitor de microplacas e a solução de ácido acético 30% é utilizada como branco (AGARWAL et al., 2011; ANDRADE, 2021).

4.5.4 Avaliação da viabilidade celular

A partir da metodologia descrita em 4.5.2, foi determinada a viabilidade celular utilizando-se uma adaptação dos trabalhos realizados por Vasconcelos (2013) e Oliveira (2019). Inicialmente, realizou-se a adição de 30 µL de uma solução de resazurina (INLAB[®]) a 0,01% (m/v) nos poços da microplaca contendo as concentrações de 8 a 512 µg/mL de extrato, frações

e subfrações da própolis marrom. Em seguida, realizou-se a incubação da microplaca em estufa microbiológica por 40 min a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. A viabilidade das células bacterianas foi verificada a partir da observação da mudança de coloração dos poços, as bactérias viáveis reduzem o corante azul (resazurina) para rosa (resorufina).

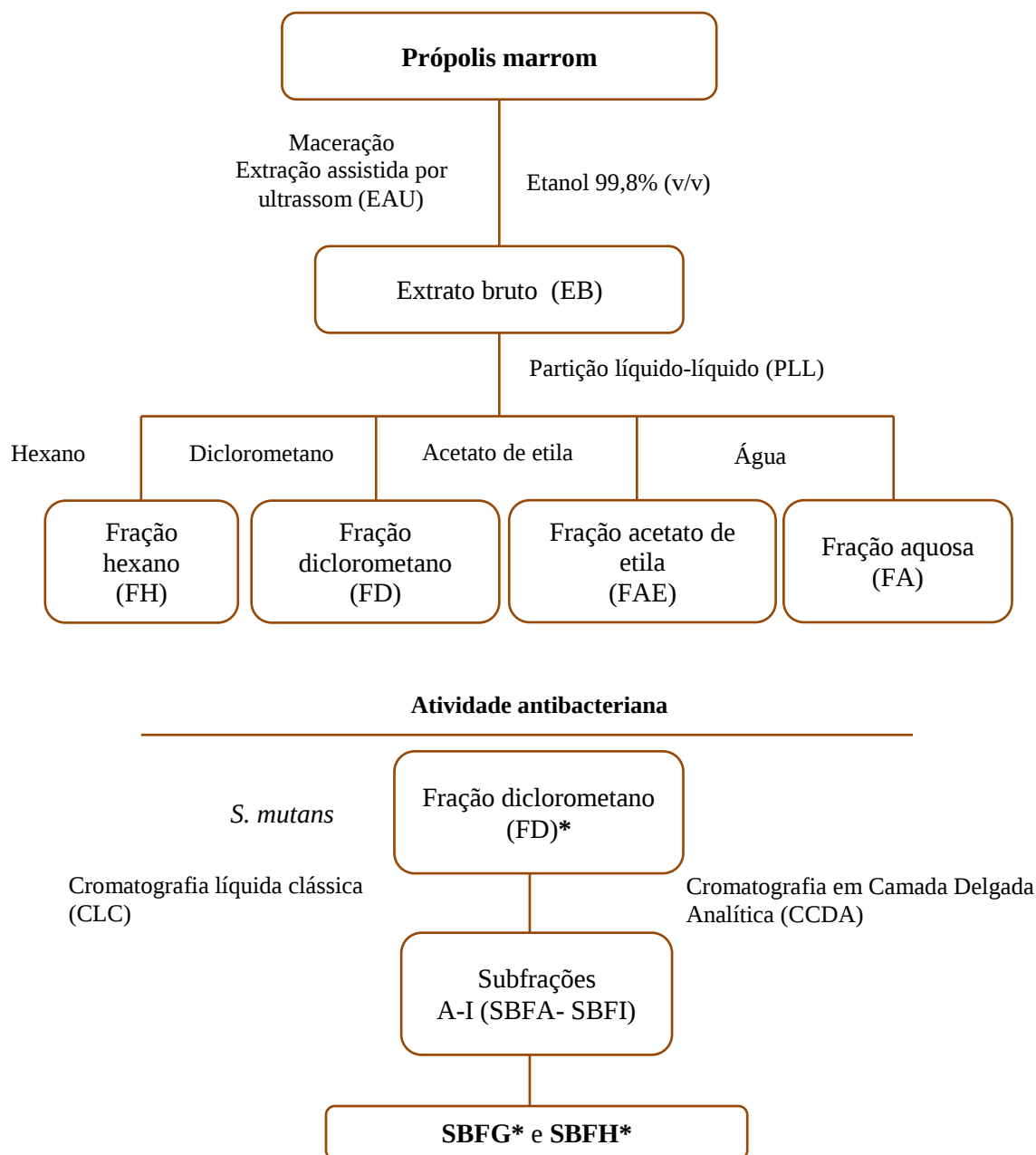
4.5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Seguida da determinação das CIM's (4.5.2), determinou-se as CBM's partindo-se dos poços contendo de 8 a 512 µg/mL do extrato, frações e subfrações da própolis marrom. Para isso, o cultivo foi realizado em placas contendo Ágar Mitis Salivarius (MSA) a partir dos poços onde não foi observado crescimento bacteriano. As placas de Petri com os inóculos foram incubadas em estufa a 37°C com suplementação de 5,0% de CO₂ por 24 h. A determinação da CBM foi verificada após observação da menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano em placa de Petri (OLIVEIRA, 2019).

4.6 Fracionamento através de Cromatografia Líquida Clássica (CLC)

O fracionamento foi realizado por Cromatografia Líquida Clássica (CLC), utilizando a fração que apresentou maior potencial antimicrobiano. Foi utilizada coluna cromatográfica de vidro aberta preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh). A partir de 18 g da fração diclorometano, realizou-se o fracionamento utilizando uma coluna de vidro (42 x 4,6 cm) com 416,7 g de sílica. A fase móvel foi a mistura ternária hexano/diclorometano/acetato de etila (0,5:4:0,5, v/v/v). O volume de coleta das subfrações foi de 30 mL. O monitoramento das subfrações foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) em placas de alumínio de 4 x 5 cm recobertas por gel de sílica. As placas foram visualizadas através de luz ultravioleta (UV) em Câmara Escura UV (Cienlab, CE-850, Brasil) com comprimento de onda de 254 nm e posteriormente reveladas com solução de vanilina sulfúrica 1% (m/v).

Figura 13 - Fluxograma do fracionamento biomonitorado da própolis marrom



(* Fração e subfrações que apresentaram melhor atividade antibacteriana). Fonte: elaborado no *Microsoft PowerPoint®*, próprio autor.

4.7 Análise através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises das subfrações foram realizadas utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu®) equipado com duas bombas LC-20AR, desgaseificador DGU-20A5R, detector UV-Vis SPD-20, controlador CBM-20A e Software LC Solution.

As condições cromatográficas utilizadas foram: acetonitrila/água (ACN/H₂O) (65:35), (40:60), (30:70), coluna Shim-Pack C18 (4,6 x 250 mm, 10 µm), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL. As amostras (1 mg/mL) foram solubilizadas em metanol e filtradas utilizando filtro 0,45 µm antes da injeção.

4.8 Identificação dos metabólitos secundários isolados

As substâncias identificadas foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) em um espectrômetro (Bruker®) (400 MHz para ¹H). Foi analisado o núcleo de ¹H e para obtenção do espectro unidimensional necessário para a identificação da classe das substâncias. Dados da literatura também foram utilizados para auxiliar a identificação estrutural das substâncias.

4.9 Tabulação dos dados e análises estatísticas

Para o tratamento dos resultados dos ensaios biológicos realizou-se a construção de planilhas utilizando *Microsoft Office Excel*®, versão 2019. A comparação entre as médias e os desvios padrão foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey utilizando o *GraphPad Prism*TM, versão 9.0. Os valores médios que apresentaram diferenças com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os cromatogramas foram construídos, utilizando o programa computacional *Origin*TM versão 6.0 e os espectrogramas foram confeccionados utilizando o programa *MestReNova*TM versão 6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 16 g de própolis marrom, obteve-se de 7,63 g ($\pm 0,07$) de extrato bruto, o que representou 47,72% ($\pm 0,41$) de rendimento. Trusheva e Colaboradores (2007), a partir da comparação de diferentes métodos extrativos, utilizando etanol 70%, obtiveram rendimento de 55% ($\pm 1,0$), por maceração, após 72 h, e rendimento de 53% ($\pm 3,0$), por extração assistida por ultrassom (EAU), por 30 min. O etanol, por ser um solvente orgânico com alta capacidade de extração e solubilização, é o mais utilizado nos diferentes processos de extração dos compostos da própolis, seja sozinho ou em mistura com diferentes proporções de água (BISCAIA et al., 2009).

Apesar da escassez de trabalhos com o estudo da extração de metabólitos secundários da própolis, em especial, maceração combinada com EAU, encontrou-se alguns trabalhos interessantes. Nesse aspecto, um estudo realizado por Zainal e colaboradores (2021) que combinou maceração (24 h) com EAU, em diferentes tempos de extração, observou-se que os extratos com melhores resultados para atividade antioxidante foram obtidos por essa combinação de técnicas, quando comparado a outros métodos. Em um trabalho que avaliou a extração utilizando maceração dinâmica, EAU e microondas, nas mesmas condições extrativas, observou-se que a EAU provou ser o melhor método para extração de compostos bioativos devido ao maior rendimento da extração e teor de compostos fenólicos (OROIAN et al., 2019). Embora existam diferentes métodos e condições para extração dos compostos da própolis, observa-se que os dados encontrados corroboram com o apresentado no presente trabalho, visto que a maceração e EAU correspondem a uma associação de métodos extrativos eficazes para extração de compostos bioativos.

Para a realização do processo de isolamento dos metabólitos secundários bioativos, uma quantidade maior de própolis foi utilizada. Após o processo de extração com 172 g de própolis marrom, para iniciar o processo de fracionamento biomonitorado, obteve-se 82,07 g de extrato bruto (EB). O fracionamento biomonitorado constitui-se numa estratégia para isolar substâncias bioativas (*hits*) e é frequentemente empregado no processo de descoberta de novos fármacos. Além disso, viabiliza o isolamento mais rápido e eficaz das substâncias bioativas. Na descoberta de fármacos, após o isolamento e avaliação biológica destas substâncias algumas mudanças químicas podem ser realizadas com o objetivo de ampliar a atividade específica ou mesmo reduzir o efeito tóxico (PINTO et al., 2002; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2020).

O fracionamento biomonitorado permite que cada fração seja avaliada em um sistema

de bioensaio e apenas a mais ativa seja novamente fracionada, até o isolamento e identificação da substância responsável pelo efeito biológico (ODE et al., 2011). Os extratos e frações da própolis podem ser utilizados das mais variadas formas, em sua maioria, nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Nestas áreas, as suas aplicações estão relacionadas, primariamente, às propriedades biológicas comprovadas, e à qualidade e composição das amostras, que se encontram relacionadas com as técnicas de extração empregadas nos processos de obtenção dos extratos e frações (MONROY et al., 2018).

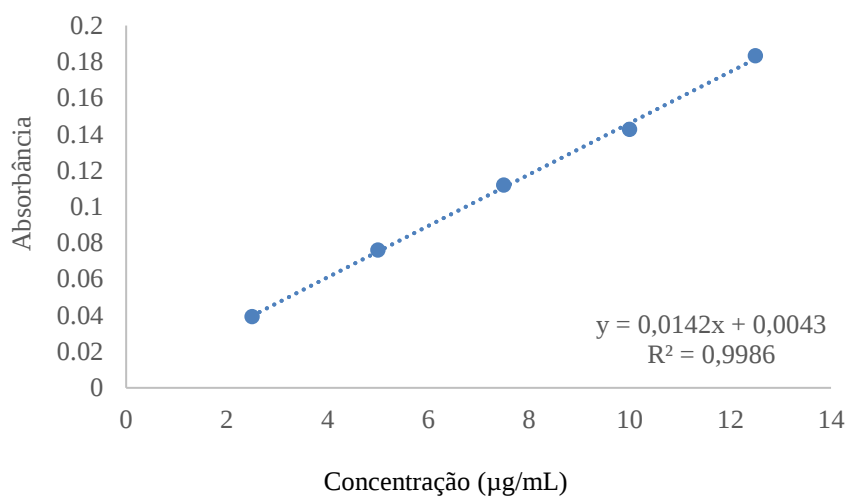
Após a obtenção do EB, realizou-se a partição líquido-líquido (PLL) com 76,7 g de extrato. Os rendimentos obtidos foram: 54,73 g (71,35 %) de fração hexano (FH), 19,97 g (26,03 %) de fração diclorometano (FD), 0,98 g (1,27 %) de fração acetato de etila (FAE) e 0,72 (0,94 %) g de fração aquosa (FA). O fracionamento por PLL permite com que os compostos sejam separados com base na polaridade, resultando em frações com composição e propriedades diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial (CABRAL, 2008).

Um trabalho realizado por Rufatto e colaboradores (2018) com a própolis vermelha, em que a PLL foi realizada com os solventes ciclohexano, acetato de etila e butanol, a partir de 2,5 g de extrato bruto, obteve, para a fração ciclohexano (FCH) 0,48 g (19,2 %), fração acetato de etila (FAE) 1,06 g (42,4 %), fração butanol (FB) 0,34 g (13,6 %) e fração aquosa (FA) 0,39 g (15,6 %).

Neves (2014), com duas amostras de própolis vermelha, utilizando-se de 50 g de extrato bruto cada e os solventes hexano (H), acetato de etila (AcOEt) e mistura hidroalcolica obteve para as frações de hexano, 55,72% referente a amostra 1 e 55,79% para a amostra 2. Ao comparar os resultados obtidos no trabalho supracitado com o presente estudo, observa-se que os dados corroboram com o que foi obtido, sendo que, as frações de hexano apresentaram os maiores rendimentos em ambos estudos. Entretanto, sabe-se que a fração com maior rendimento não necessariamente será aquela selecionada para o fracionamento biomonitorado.

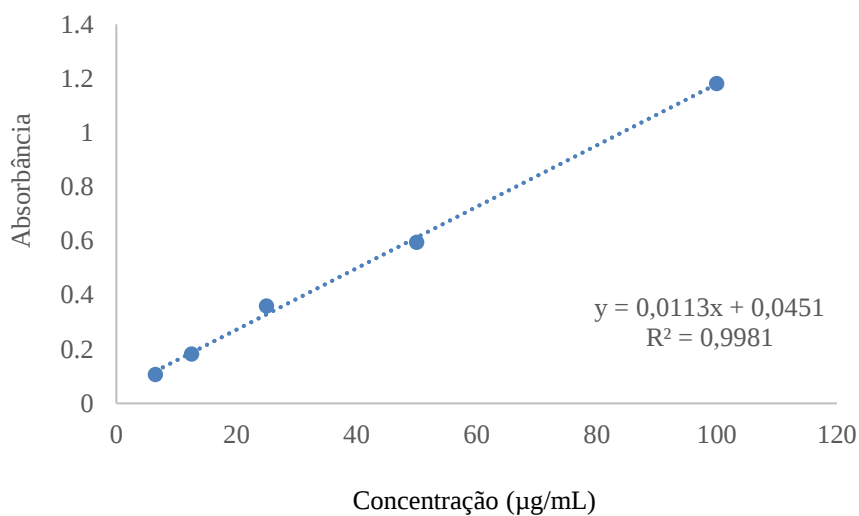
A partir da obtenção do EB e das frações (FH, FD, FAE e FA) sucederam-se a quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT) da própolis marrom, utilizando-se para isso as curvas de calibração do ácido gálico (AG) (Figura 14) e da quercetina (QUE) (Figura 15), respectivamente. Em cada curva de calibração encontra-se a equação da reta e valor do coeficiente de regressão (R^2) correspondente. Nesse sentido, os valores de coeficientes de regressão estão acima de 99%, o que confere alto grau de confiabilidade das curvas (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.



O eixo x apresenta as concentrações de ácido gálico testadas e o eixo y destaca os valores para a absorbância. Fonte: elaborado no *Microsoft Office Excel®*, próprio autor.

Figura 15 - Curva padrão de quercetina nas concentrações de 6,5, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL.



O eixo x apresenta as concentrações de quercetina testadas, e o eixo y destaca os valores para a absorbância. Fonte: elaborado no *Microsoft Office Excel®*, próprio autor.

De acordo com os resultados obtidos a partir das análises do EB e das frações (FH, FD, FAE e FA), obteve-se os valores expressos na Tabela 1.

Tabela 1 Quantidade de compostos fenólicos e flavonoides do extrato e frações da própolis marrom.

Amostra de própolis marrom	Compostos fenólicos (mg/g de extrato)	Flavonoides (mg/g de extrato)
EB	25,7 ^a ($\pm$ 3,47)	5,47 ^A ($\pm$ 0,37)
FH	18,1 ^b ($\pm$ 2,12)	0,00 ^B ($\pm$ 0,72)
FD	52,3 ^c ($\pm$ 7,49)	55,3 ^C ($\pm$ 7,52)
FAE	87,7 ^d ($\pm$ 4,93)	12,4 ^D ($\pm$ 0,75)
FA	8,25 ^e ($\pm$ 2,20)	0,00 ^E ($\pm$ 3,17)

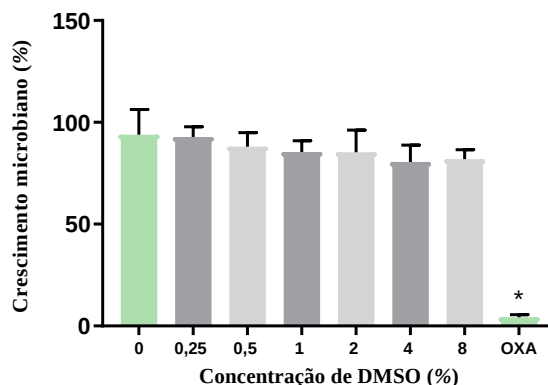
EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FD: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila e FA: fração aquosa. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa, após a realização do pós-teste de Tukey. O resultado está expresso em equivalente de ácido gálico para compostos fenólicos e equivalente de quercetina para flavonoides por grama de extrato/fração. Foram consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Após a análise estatística observou-se que a fração acetato de etila (FAE) demonstrou a maior concentração de compostos fenólicos, com 87,7 ($\pm$ 4,93) mg/g de extrato, seguida da fração diclorometano (FD) com 52,3 ($\pm$ 7,49) mg/g de extrato. A partir da comparação entre os grupos, o extrato bruto e as frações testadas apresentaram-se diferentes estatisticamente.

Na de flavonoides, foi possível concluir que a fração diclorometano apresentou a maior concentração, com 55,3 ($\pm$ 7,52) mg/g de extrato. De acordo com a análise entre os grupos, todos apresentaram diferenças significativas. Além disso, observou-se que não houve diferença entre a quantidade de compostos fenólicos e flavonoides na FD, inferindo-se que a maioria ou praticamente todos os compostos fenólicos desta fração correspondem a flavonoides.

Antes dos ensaios biológicas envolvendo o EB e as frações da própolis marrom, determinou-se a atividade antimicrobiana do dimetilsufóxido (DMSO) frente *S. mutans*. Diante do exposto, sabe-se que o DMSO se configura como um solvente orgânico que é frequentemente utilizado em ensaios biológicos como veículo para solubilização de amostras, mas ele não pode interferir nesses ensaios biológicos. Por isso, antes de realizar os ensaios biológicos, verificou-se quais concentrações de DMSO não interferem no crescimento de *S. mutans*, para eliminar o seu efeito sobre o crescimento microbiano nos ensaios de determinação das CIMs do extrato, frações e subfrações (Figura 16). Nesse contexto, Ribeiro e colaboradores (2001) afirmam que o DMSO pode penetrar rapidamente às membranas biológicas e atuar como agente antimicrobiano ou potencializar esta atividade.

Figura 16 - Atividade antimicrobiana do DMSO nas concentrações 0,25 a 8 % frente *S. mutans*.



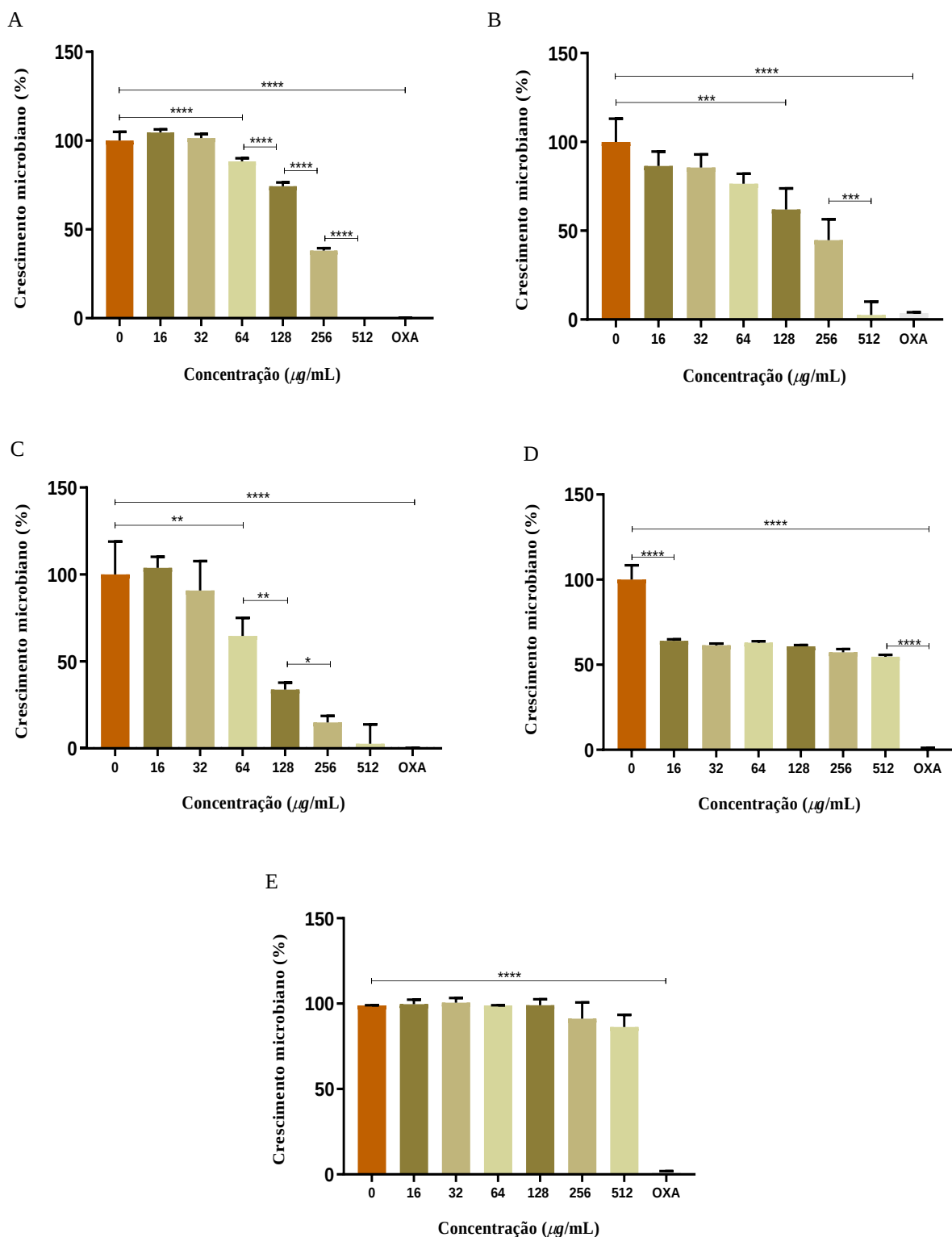
O eixo x representa as concentrações de DMSO testadas, e o eixo y destaca o percentual de inibição do crescimento de *S. mutans*. Oxacilina (OXA) foi utilizado como controle positivo de inibição do ensaio e a suspensão bacteriana corresponde ao controle negativo de inibição (0). Asterisco indica que houve diferença significativa, após a realização do pós-teste de Tukey. Foram consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

Nenhuma das concentrações testadas (0,25% a 8%) foi capaz de inibir o crescimento de *S. mutans*. DMSO a 8%, apresentou 81,89% ($\pm 4,69$) de crescimento microbiano, enquanto o controle positivo para o crescimento apresentou 93,96% ($\pm 6,62$). Estatisticamente, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (0,25% a 8%) e o controle no crescimento de *S. mutans*. Desse modo, pode-se utilizar o DMSO em qualquer uma dessas concentrações, sem que este solvente interfira nos resultados dos experimentos.

Interessantemente, e em contrapartida ao objetivo do presente trabalho, um estudo realizado por Torres e colaboradores (2021), avaliou o efeito do sinergismo entre o DMSO e a própolis verde no tratamento de feridas cirúrgicas. Utilizaram pomada de própolis sem DMSO e pomada de própolis com DMSO a 20%, e, constataram que a terapia sinérgica apresentou melhor efeito anti-inflamatório, antimicrobiano e cicatrizante quando comparado com a terapia que utilizou a pomada de própolis sem DMSO. De modo geral, o DMSO pode apresentar diferentes propriedades biológicas, dentre elas, a atividade antimicrobiana.

Após a obtenção do EB e frações da própolis marrom, bem como, a realização dos ensaios com o DMSO frente *S. mutans*, realizou-se os ensaios para a determinação das CIMs dessas amostras. Pode-se observar-se na Figura 17A que a CIM do EB frente *S. mutans* foi de 512 $\mu\text{g/mL}$ e que nas concentrações 256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$ houve inibição do crescimento microbiano em 61,92 ($\pm 1,37$), 25,64 ($\pm 2,07$) e 11,67% ($\pm 1,68$), respectivamente. Estatisticamente houve diferença entre 256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$. Já nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ não houve inibição do crescimento microbiano.

Figura 17 - Atividade antimicrobiana da própolis marrom frente *S. mutans*.



O eixo x representa as concentrações de extrato bruto e frações testadas e o eixo y destaca o percentual de inibição do crescimento de *S. mutans*. Extrato bruto da própolis marrom (A), fração diclorometano (C), fração acetato de etila (D) e fração aquosa (E). Oxacilina (OXA) foi utilizado como controle positivo de inibição do ensaio e a suspensão bacteriana corresponde ao controle negativo de inibição (0). Asteriscos indicam que houve diferença significativa, após a realização do pós-teste de Tukey. Foram consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

A fração hexano apresentou o mesmo valor da CIM do extrato bruto frente *S. mutans*, com percentual médio de inibição do crescimento microbiano de 97,38% ($\pm 7,40$). Nas concentrações de 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram crescimento microbiano de 44,64 ($\pm 8,37$) e 61,94% ($\pm 7,13$), respectivamente, mas estatisticamente ambas as concentrações apresentaram o mesmo efeito (Figura 17B).

A fração diclorometano apresentou a menor CIM (256 $\mu\text{g/mL}$), portanto é a fração mais promissora biologicamente. Além disso, a concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ e de 64 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram inibição do crescimento microbiano de 66,25% ($\pm 4,07$), e 31,12% ($\pm 7,36$), respectivamente (Figura 17C).

Para a fração acetato de etila não foi possível determinar a CIM, visto que, na maior concentração testada (512 $\mu\text{g/mL}$) observou-se crescimento microbiano de 54,64% ($\pm 1,14$). Nesse aspecto, infere-se que a CIM da fração acetato de etila poderá ser obtida utilizando concentrações acima das concentrações que foram testadas, ou seja, a CIM será maior que 512 $\mu\text{g/mL}$. Ademais, estatisticamente não houve diferença entre 256 $\mu\text{g/mL}$ e 128 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17D).

A fração aquosa não apresentou atividade antibacteriana contra *S. mutans* em nenhuma das concentrações testadas (Figura 17E), onde na maior concentração, observou-se crescimento microbiano de 86,25% ($\pm 7,17$), o que foi estatisticamente, igual ao controle negativo (0 $\mu\text{g/mL}$).

Portanto, dentre o extrato bruto e as frações testadas contra *S. mutans*, a fração diclorometano apresentou-se como a fração mais promissora para continuidade do estudo de fracionamento bioguiado, por apresentar a menor CIM (256 $\mu\text{g/mL}$), como pode ser observado na Figura 17. A partir do exposto, pode-se sugerir como responsável por essa atividade biológica, a presença de flavonoides, fração com maior concentração desses compostos, como mencionado na Tabela 1. Nesse cenário, Salatino e colaboradores, corroborando com este trabalho, afirmam que a atividade antibacteriana dos flavonoides se encontra elucidada e que muitos trabalhos envolvendo a atividade antibacteriana da própolis está atrelada à elevada concentração de flavonoides.

Em um estudo realizado por Swerts e colaboradores (2005), com extratos da própolis comercial frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*, observou-se que a inibição microbiana ocorreu nas concentrações de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, 3.200 $\mu\text{g/mL}$ e 2.560 $\mu\text{g/mL}$, para *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis*, respectivamente. Souza (2018), em um trabalho realizado com a própolis vermelha coletada na Paraíba verificou que a CIM frente *S. pyogenes* foi maior do que 1024 $\mu\text{g/mL}$. Como pode-se observar, essas própolis

avaliadas frente a algumas espécies de *Streptococcus* apresentaram efeitos antimicrobianos inferiores ao encontrados neste trabalho. Em um trabalho realizado por Regueira e colaboradores (2017), foi demonstrado que a própolis vermelha apresentou valores de CIM entre 64 e 1024 µg/mL, contra cepas de *S. aureus*, bactéria gram positiva, assim como os *Streptococcus*. De acordo com as características do estudo, as amostras de própolis vermelha testadas foram coletadas em diferentes estações, o que sugere a variação entre as CIMs obtidas.

Existem poucos estudos com a própolis marrom, sobretudo, relacionados à atividade biológica da própolis marrom da Bahia. Nos trabalhos supracitados, percebe-se que a maioria se concentra em ensaios de determinação de CIMs utilizando extrato bruto das própolis. Entretanto, em um dos achados envolvendo estudos com amostras de própolis vermelha, duas frações hexano se destacaram por apresentar CIM de 256 a 512 µg/mL contra *S. aureus* (ATCC 25923) (NEVES et al., 2014).

Em outro estudo com *S. aureus* (ATCC 25923), a CIM determinada para a fração hexano de uma amostra de própolis vermelha foi de 100 µg/mL (CABRAL, 2008). Ao analisar os resultados que foram publicados sobre atividade antimicrobiana envolvendo extrato bruto e frações das própolis, e analisar os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a CIM obtida da fração hexano (512 µg/mL) corrobora com o que foi obtido no estudo de Neves para com *S. aureus*, microrganismo Gram-positivo como *S. mutans* (2014).

Após os testes frente *S. mutans* para determinar a CIM do extrato bruto e das frações da própolis marrom, sucederam-se os ensaios de viabilidade celular em placas de 96 poços com a utilização da rezasurina e em placas de Petri para a verificação da presença ou ausência de microrganismos nos poços onde não houve crescimento microbiano visual (CBM). O método com a rezasurina permite avaliar se as células bacterianas se encontram viáveis ou não pela redução da rezasurina, enquanto no método da CBM verifica-se o crescimento microbiano em placa de Petri. Ressalta-se que ambos os métodos avaliam a morte celular, entretanto, a CBM constitui-se como padrão ouro para a determinação da viabilidade celular das células bacterianas.

A partir dos resultados obtidos, apenas a fração diclorometano na maior concentração testada (512 µg/mL), foi capaz de causar a morte das células bacterianas. Desta forma, os resultados obtidos mostraram que a FD é a mais promissora para realização do fracionamento bioguiado, por apresentar tanto a menor CIM bem como a menor CBM.

Oldoni e colaboradores (2011) encontraram CBMs de 250 a 500 µg/mL contra *S. mutans* utilizando extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas. Enquanto, em um estudo desenvolvido por Castro e colaboradores (2007), a CBM obtida para a própolis frente *S. mutans*

foi de 1600 µg/mL. De acordo com os achados supracitados observa-se a variação nos valores obtidos para a CBM, nesse sentido, fatores como a composição da própolis estão atrelados a essas diferenças.

A partir dos resultados de inibição do crescimento microbiano, utilizou-se concentrações sub-inibitórias para a avaliação da inibição da formação de biofilme de *S. mutans*. Nesse aspecto, para o EB obteve-se que nas concentrações de 16 e 32 µg/mL não se verificou inibição da formação de biofilme. Por outro lado, sugere-se que houve inibição da formação de biofilme nas concentrações de 64, 128 e 256 µg/mL, no entanto, não é possível afirmar, pois houve inibição do crescimento microbiano, como mencionado nestas concentrações, de 11,67, 25,64 e 61,92%, respectivamente. Em 64 µg/mL, como exemplo, concentração que apresentou crescimento microbiano de 88,33% ($\pm 1,68$), obteve-se percentual de inibição da formação de biofilme de 57,53% ($\pm 1,57$) (Figura 18A).

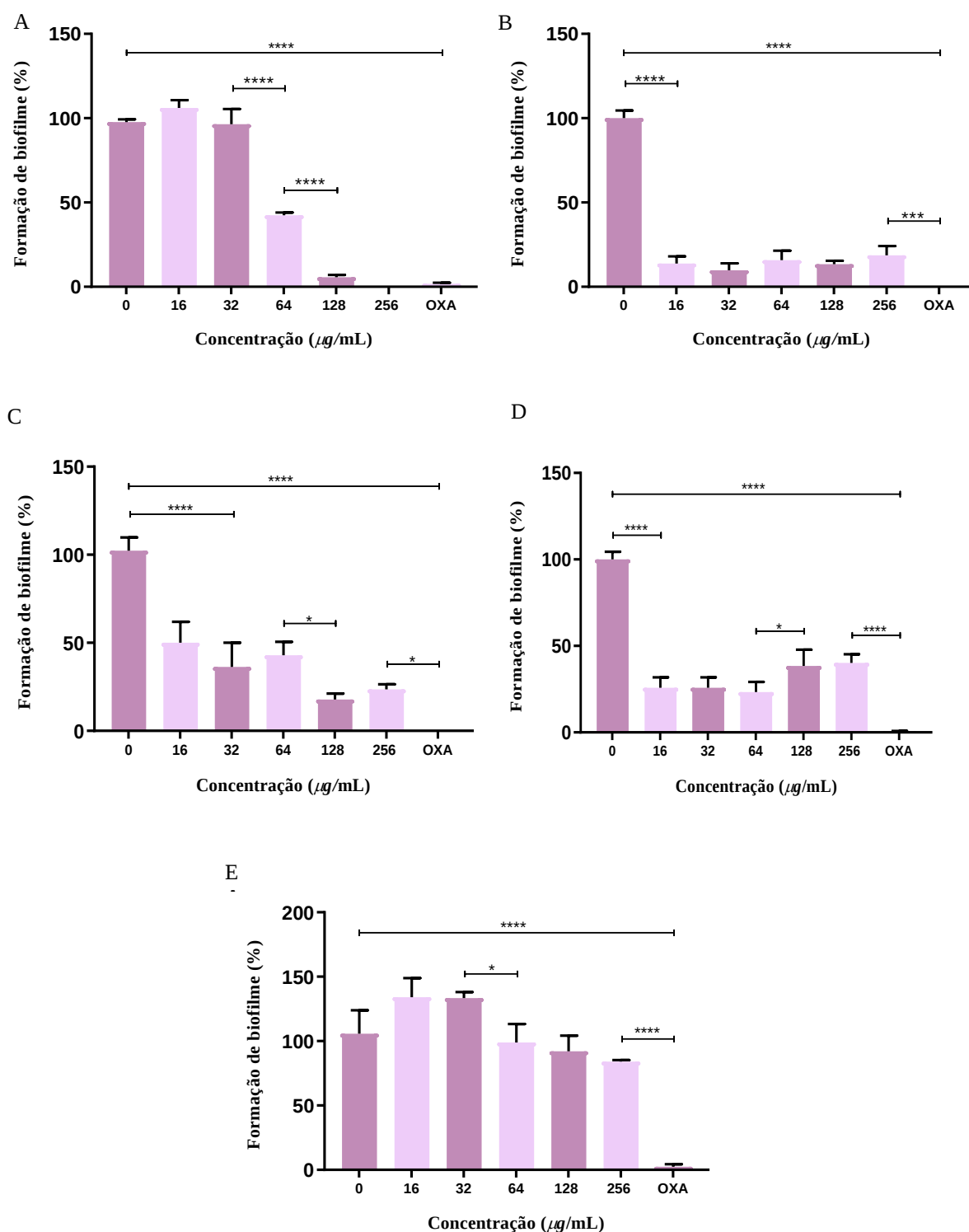
A fração hexano (FH) na concentração de 64 µg/mL apresentou inibição da formação de biofilme em 84,25% ($\pm 5,66$). Já nas concentrações de 32 e 16 µg/mL houve inibição da formação de biofilme em 90,16 ($\pm 4,03$) e 86,21% ($\pm 4,21$), respectivamente (Figura 18B). Estatisticamente não houve diferença entre 64, 32 e 16 µg/mL da FH na inibição da formação de biofilme de *S. mutans*. Na concentração de 32 µg/mL da fração diclorometano (FD) (Figura 18C) observou-se inibição da formação de biofilme em 63,75% ($\pm 13,76$), e a concentração de 16 µg/mL, em 49,95% ($\pm 11,92$). As concentrações de 32 e 16 µg/mL, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 18C). Concentrações superiores apresentaram crescimento microbiano, como já mencionado. Todavia, sugere-se que também inibam a formação do biofilme.

Para a fração acetato de etila (FAE) sugere-se que houve inibição da formação de biofilme nas concentrações de 256, 128, 64, 32 e 16 µg/mL. Não é possível determinar, pois houve diferença entre as concentrações testadas e o controle evidenciando o crescimento microbiano.

A fração aquosa não apresentou inibição de formação do biofilme em nenhuma das concentrações testadas, visto que, estatisticamente a concentração de 256 µg/mL não apresentou diferença em relação ao controle negativo de inibição (0) de *S. mutans* (Figura 18E).

A FH exibiu atividade nas concentrações de 64, 32 e 16 µg/mL. Já a FD apresentou inibição nas concentrações de 32 e 16 µg/mL. Por conseguinte, dentre o EB e as frações testadas contra a formação do biofilme de *S. mutans*, a FD corrobora com os resultados obtidos para CIM e CBM e apresenta-se como a fração selecionada e a mais promissora para o fracionamento bioguiado.

Figura 18 - Atividade antibiofilme da própolis marrom frente *S. mutans*.



O eixo x representa as concentrações de extrato bruto e frações testadas e o eixo y exibe o percentual de inibição da formação de biofilme de *S. mutans*. Extrato bruto da própolis marrom (A), fração hexano (B), fração diclorometano (C), fração acetato de etila (D) e fração aquosa (E). Oxacilina (OXA) foi utilizado como controle positivo de inibição do ensaio e a formação de biofilme corresponde ao controle negativo de inibição (0). Asteriscos indicam que houve diferença significativa, após a realização do pós-teste de Tukey. Foram consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

Após a identificação da FD como a mais bioativa contra *S. mutans*, realizou-se o primeiro passo para o fracionamento das substâncias. Desse modo, a FD foi submetida a CLC, onde coletou-se 102 frações, que após as reuniões das subfrações quimicamente semelhantes por CCDA, obteve-se 9 subfrações: 1-10 (0,48 g), 11-12 (0,39 g), 13 (0,33 g), 14-22 (2,24 g), 23-49 (2,86 g), 50-66 (1,17 g), 67-90 (1,08 g), 91-101 (0,4 g) e 102 (9,68 g). Com as 9 subfrações, realizou-se um *screening* para determinar quais as subfrações mais ativas contra *S. mutans*, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 *Screening*: subfrações da própolis marrom frente *S. mutans*.

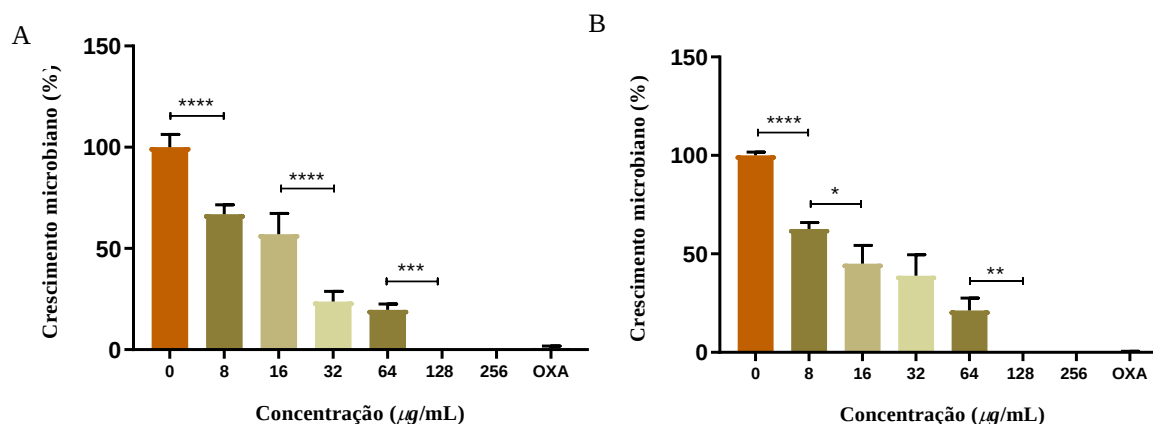
CC	SBF	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
1-10	SBFA	>512	>512
11-12	SBFB	512	>512
13	SBFC	256	512
14-22	SBFD	256	512
23-49	SBFE	256	256
50-66	SBFF	256	256
67-90	SBFG	128	128
91-101	SBFH	128	128
102	SBFI	512	>512

CC: coleta da coluna; SBF: subfração; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

A Tabela 2 evidencia que dentre as 9 subfrações testadas contra *S. mutans*, as subfrações G (SBFG) e H (SBFH) demonstraram as menores CIMs e CBMs (128 µg/mL). A SBFG, nas concentrações de 64 e 32 µg/mL, exibiu percentual de crescimento microbiano de 19,73% ($\pm$ 2,76) e 23,87% ($\pm$ 4,91), respectivamente, enquanto a SBFH apresentou percentual de crescimento microbiano para 64 µg/mL de 21,33% ($\pm$ 6,19) e para a concentração de 32 µg/mL, de 38,88% ($\pm$ 10,64) (Figura 19).

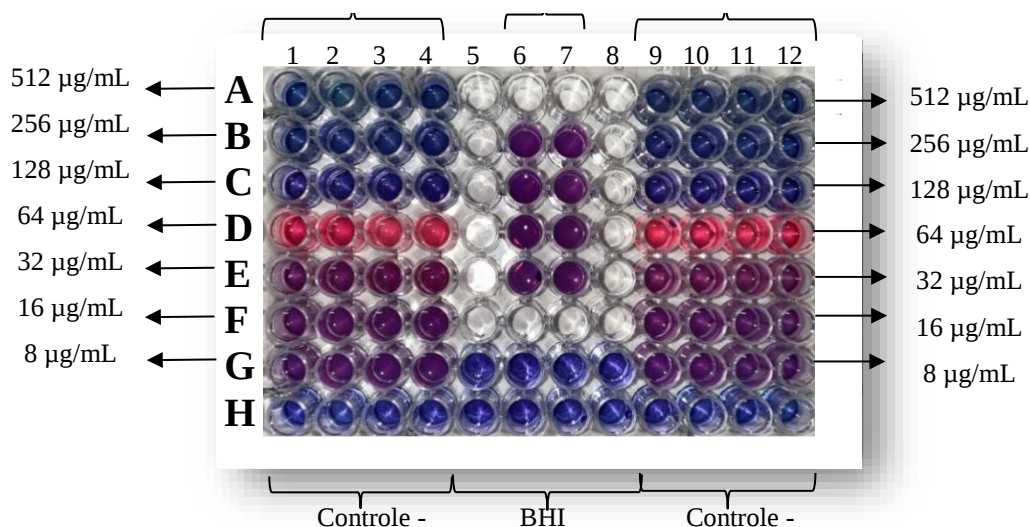
Os resultados apresentados na Tabela 2 foram extraídos da Figura 19, onde pode-se observar os gráficos com os resultados da determinação das CIMs da SBFG e SBFH. Já a Figura 20, corrobora com a Tabela 2, pois apresenta o outro método que determina a viabilidade celular, e pode-se observar a imagem da placa de 96 poços com os resultados de viabilidades utilizando o método da coloração com a resazurina. A mudança de coloração indica a redução da resazurina devido à presença de células bacterianas viáveis nos poços contendo as amostras da SBFG e SBFH a partir da concentração de 64 µg/mL.

Figura 19 - Atividade antimicrobiana da própolis marrom frente *S. mutans*.



SBFG (A), SBFH (B). O eixo x representa as concentrações de extrato testadas, e o eixo y destaca o percentual de inibição do crescimento de *S. mutans*. Oxacilina (OXA) foi utilizado como controle positivo do ensaio. Asteriscos indicam que houve diferença significativa, após a realização do pós-teste de Tukey. Foram consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

Figura 20 - Representação da placa de 96 poços submetida ao teste determinação da viabilidade celular utilizando subfrações da própolis marrom frente *S. mutans*.



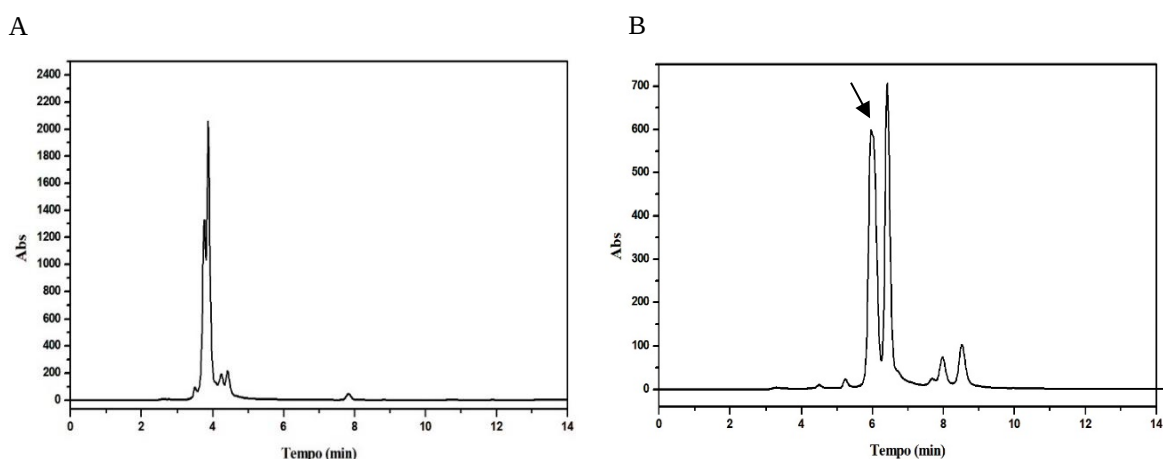
512 a 8 µg/mL: concentrações testadas das subfrações; controle +: suspensão bacteriana; controle -: suspensão bacteriana e antibiótico (oxacilina); BHI: meio de cultura.

De acordo com Holetz e colaboradores (2002), a atividade antimicrobiana é considerada boa em extratos, frações e subfrações que exibem CIM's inferiores a 100 µg/mL, atividade antimicrobiana moderada de 100 a 500 µg/mL, atividade antimicrobiana fraca entre 500 e 1000 µg/mL e extrato considerado inativo quando a CIM é superior a 1000 µg/mL. Nesse cenário, o EB e FH exibiram inibição fraca (512 µg/mL), FD (256 µg/mL) e SBFG e SBFH (128 µg/mL), exibiram inibição moderada.

As subfrações mais ativas (SBFG e SBFH) frente *S. mutans* foram submetidas a análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) com objetivo de traçar o perfil cromatográfico e purificar as substâncias presentes nestas frações. Desse modo, após as injeções das amostras (SBFG e SBFH) foram obtidos os cromatogramas em modo analítico. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água, alterando-se as proporções entre os solventes, com a finalidade de encontrar a melhor condição para otimização da separação das substâncias.

Na Figura 21 pode-se observar os cromatogramas da SBFG com diferentes proporções dos solventes utilizados na fase móvel (acetonitrila/água). Nesse sentido, a Figura 21A representa o cromatograma onde se utilizou acetonitrila/água (65:35), e a Figura 21B acetonitrila/água (40:60).

Figura 21 - Cromatogramas da subfração G (SBFG) obtidos por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico.

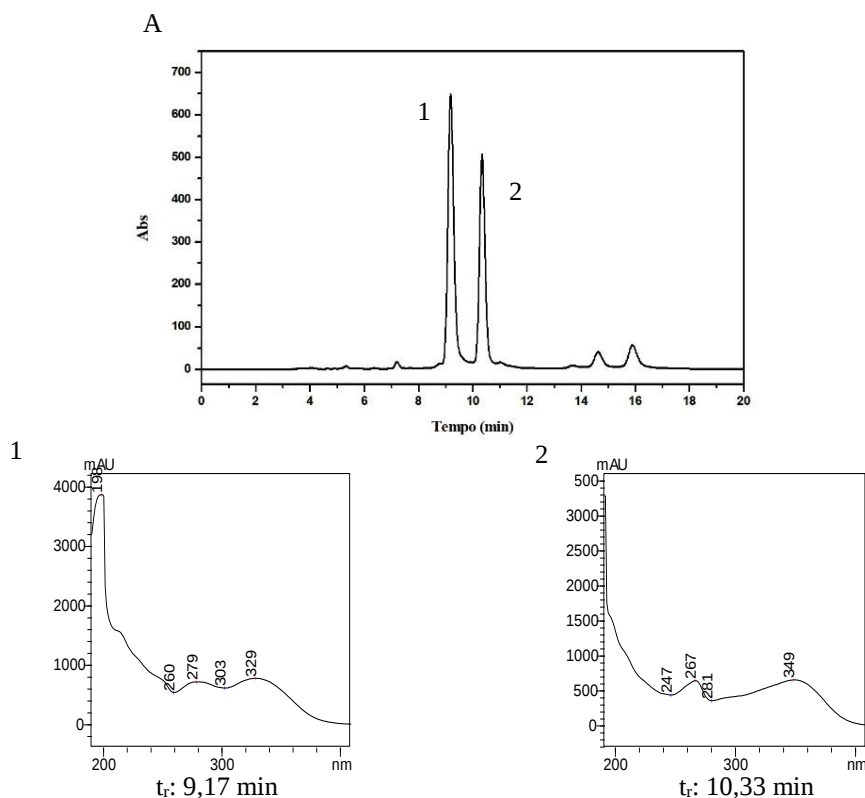


Coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 μ m) a 37,3° C, fase móvel acetonitrila/água (65:35) em A e acetonitrila/água (40:60) em B, detector UV-Vis à 254 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L. Concentração da amostra em 1 mg/mL, e a seta indica a separação das substâncias.

No cromatograma da Figura 21A observa-se picos intensos coeluídos, inferindo a modificação da proporção entre os solventes da fase móvel utilizada, e melhora na separação das substâncias. No segundo cromatograma (Figura 21B), se observa uma melhor separação das substâncias, após a diminuição da força da fase móvel. Por outro lado, no cromatograma da Figura 22A, observa-se com clareza que após diminuir ainda mais a força da fase móvel conseguiu-se otimizar o processo de separação das substâncias presentes na. Pode-se observar na Figura 22I e II os espectros de absorção UV-Vis das substâncias com t_r : 9,17 min e t_r : 10,33 min, respectivamente. Estes espectros apresentam bandas características de flavonoides: banda na faixa de 300-400 nm (banda I) e banda na faixa de 220-280 nm (banda II) (SIMÕES et al.,

2007). Pode-se observar para a substância 1 uma banda em 329 nm e uma banda em 279 nm, enquanto a substância 2 apresentou bandas em 349 nm e 267 nm.

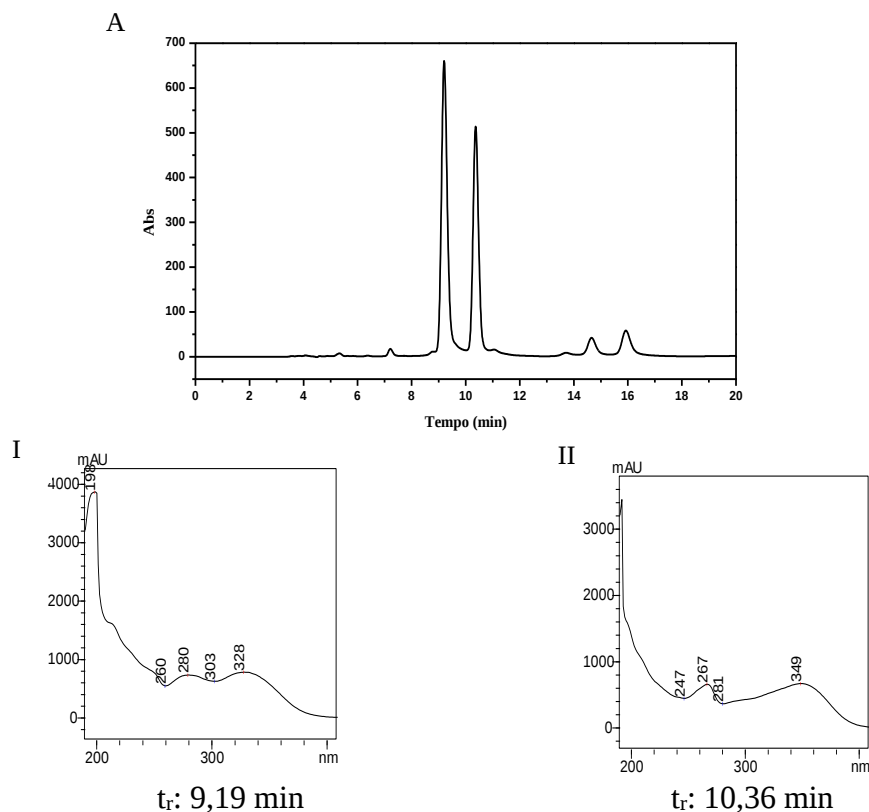
Figura 22 - Cromatograma e espectros de UV-Vis obtidos da subfração G (SBFG) por CLAE-DAD (Shimadzu®) em modo analítico.



Coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 μ m) a 37,3° C, fase móvel acetonitrila/água (30:70), detector UV-Vis à 254 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L. A: cromatograma; 1: espectro de UV-Vis (primeira substância) 2: espectro de UV-Vis (segunda substância). Concentração da amostra de 1 mg/mL.

Na Figura 23 é apresentado o cromatograma da SBFH (Figura 23A). Nesse sentido, observa-se o cromatograma obtido com a melhor eficiência de separação, ou seja, com a fase móvel já otimizada para a separação das substâncias. Como foi visto, a SBFG e SBFH apresentam perfil químico semelhante, com bandas cromatográficas com os mesmos tempos de retenção e mesmos espectros de UV-Vis, portanto são as mesmas substâncias. De acordo com os espectros obtidos, verifica-se que o primeiro pico apresenta tempo de retenção de 9,19 min e o segundo pico tempo de retenção de 10,36 min.

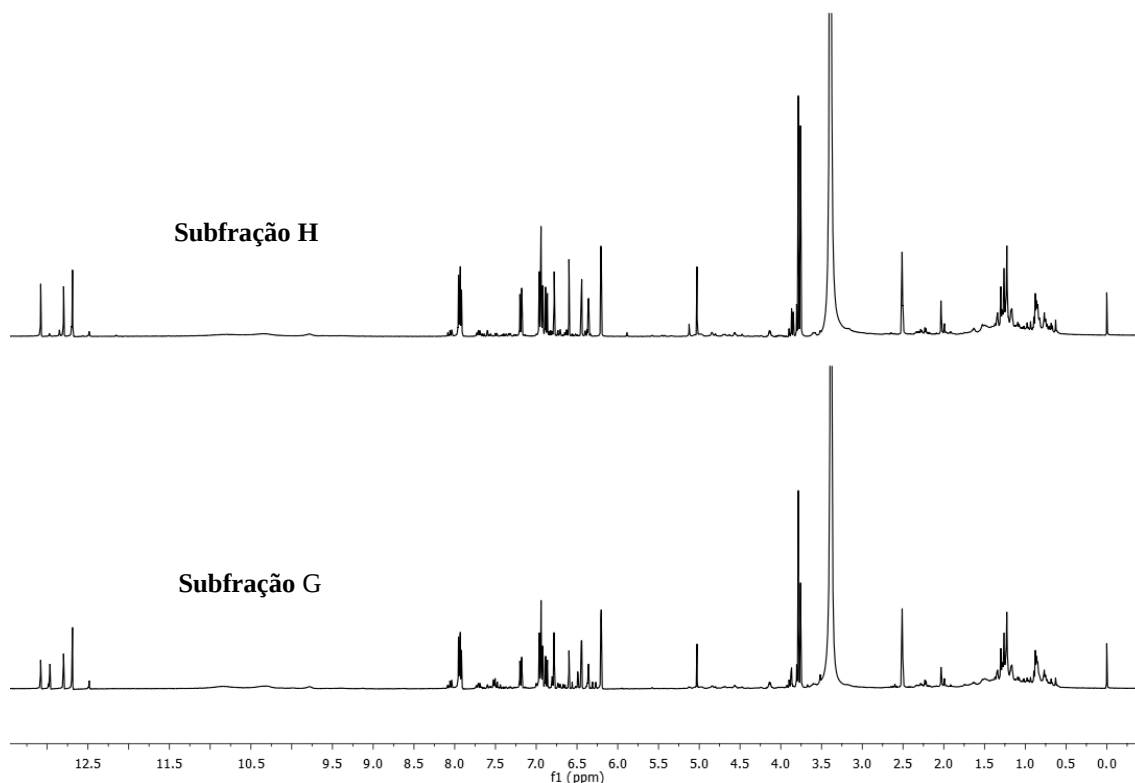
Figura 23 - Cromatograma e espectros de UV-Vis obtidos da subfração H (SBFG) por CLAE (Shimadzu®) em modo analítico.



Coluna C₁₈ Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10 µm) a 37,3° C, fase móvel acetonitrila/água (30:70), detector UV-Vis à 254 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL. A: cromatograma; 1: espectro de UV-Vis (primeira substância) 2: espectro de UV-Vis (segunda substância). Concentração da amostra de 1 mg/mL.

Na Figura 24 são observados os espectros de RMN ¹H das subfrações G e H (SBFG e SBFH) que foram obtidas após separação cromatográfica a partir da FD da própolis marrom. Nesta figura pode-se perceber a semelhança entre esses dois espectros, o que indica que estas duas subfrações apresentam praticamente as mesmas substâncias, variando apenas na quantidade relativa dessas substâncias. Desse modo uma discussão mais detalhada será realizada apenas para a SBFG.

Figura 24 - Espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da subfração H e G, provenientes da fração diclorometano da própolis marrom.



Nas Figura 25 e 26 pode ser observado o espectro de RMN ^1H global da subfração G, e uma ampliação do espectro na região onde encontram-se os sinais de hidrogênios aromáticos, respectivamente. Na Figura 25, pode ser evidenciado um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos (6,0-8,5 ppm) característicos dos anéis aromáticos A e B de flavonoides. Além disso pode-se observar sinais (12,5-13,5 ppm) de hidrogênios de hidroxilas queladas com oxigênio carbonílico do anel C, presente em flavonoides (BERTELLI et al., 2011). Duas metoxilas estão presentes nos esqueletos das substâncias presentes nesta subfração, como foi evidenciado pelos singletos em 3,76 e 3,78 ppm. O flavonoide apigenina (Figura 26) foi utilizado como exemplo para facilitar a compreensão da análise realizada por RMN ^1H .

A Figura 26 nos permite visualizar com mais clareza os sinais característicos dos hidrogênios do anel A de flavonoides (6,10-6,50 ppm) e sinais característicos dos hidrogênios do anel B de flavonoides (6,80-8,10 ppm). Além disso os singletos com deslocamento químico de 6,60 ppm e 6,80 ppm são característicos de hidrogênios de flavonas ligados ao carbono 3 (Anel C). A presença desses dois sinais indica a presença de dois esqueletos de flavona nesta amostra. Além disso os singletos em 12,69, 12,80 e 13,08 ppm (Figura 25) indicam a presença de três esqueletos de flavonoides na amostra, já que cada um deles indica a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da hidroxila do anel A com a carbonila do anel C presente em flavonoides (SI et al., 2001; CARBONEZI et al., 2007). A presença de todos esses sinais indica a presença de flavonoides na subfração G e H, com a possibilidade de ser três flavonoides (sendo duas flavonas) ou um flavonoide e um biflavonoide.

Os sinais na região de 0,5 a 2,0 ppm (Figura 24 e 25) são característicos de cadeias alifáticas abertas ou fechadas que podem ser tanto de ácidos graxos como de esteroides ou triterpenos presentes em menor quantidade nas subfrações analisadas.

Com as análises das subfrações SBFG e SBFH por CLAE-DAD e RMN ^1H foi possível detectar a presença de flavonoides do tipo flavona em ambas as subfrações. Posteriormente uma purificação dessas subfrações serão realizadas a fim de se elucidar a estrutura química dos flavonoides presentes nas subfrações. Além disso, as substâncias isoladas serão submetidas aos ensaios de inibição do crescimento microbiano e inibição da formação de biofilmes frente *S. mutans* resultando na possível descoberta de novos produtos naturais com potencial antibacteriano.

6 CONCLUSÃO

De acordo com a partição líquido-líquido (PLL), a fração hexano (FH) apresentou o maior rendimento. Para a determinação de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT) a fração acetato de etila (FAE) e fração diclorometano (FD), demonstraram a maior concentração desses compostos, respectivamente. Entre o extrato bruto (EB) e as frações testadas nos ensaios de atividade antibacteriana, a FD foi a mais potente contra *S. mutans* (CIM de 256 µg/mL), seguida do extrato bruto e fração hexano com CIM de 512 µg/mL. Em contrapartida, não foi detectada a CIM para fração acetato de etila, enquanto a fração aquosa não exibiu atividade. Para inibição da formação do biofilme, a FH e FD exibiram atividade a partir de 16 µg/mL. A FD foi selecionada para o fracionamento por CLC e as subfrações mais ativas, caracterizadas como SBFG e H, apresentaram CIM e CBM de 128 µg/mL.

Foi possível verificar por CLAE-DAD que SBFG e SBFH apresentam praticamente as mesmas substâncias, o que justifica os resultados dos ensaios biológicos obtidos. De acordo com as análises por CLAE-DAD e RMN verificou-se a presença de flavonoides do tipo flavona na subfração G e H (SBFG e SBFH). Estas subfrações deverão ser purificadas mais adiante para a elucidação estrutural desses flavonoides e avaliação do seu potencial antibacteriano.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.K.; SINGH, S.; et al. Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1493–1498, 2011.
- AGUIAR, G. R.; LEMOS, T. L. G.; et al. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2018.
- AHANGARI, Z.; NASERI, M.; et al. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. **Iranian Endodontic Journal**, v. 13, n. 3, p. 285-292, 2018.
- AJDÍĆ, D.; MCSHAN, W, M.; et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, 2002.
- ALENCAR, S.M.; AGUIA, C.L.; et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ALMEIDA, F. B. et al. A utilização da apitoxina na apiterapia e seus efeitos no tratamento de patologias. **ACTA Apícola Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 16-20, 2017.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, n. 1, p. 129-138, 2017.
- ANDRADE, M. N. Inibição de biofilmes bacterianos comuns em indústrias de alimentos utilizando extratos de *Zingiber officinale roscoe*. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2021.
- ANDRADE, R. M. Atividade antimicrobiana do mel de abelhas africanizadas e da própolis marrom frente a espécies do gênero *Streptococcus*. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2019.
- ANJUM, S.I.; ULLAH, A.; et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): a review. **Saudi Journal Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 2019.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29–32, 2005.
- BANKOVA, V.. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 23-28, 2009.
- BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C. Própolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- BARLAK, Y.; DEGER, O.; et al. Effect of turkish propolis extracts on proteome of prostate

cancer cell line. **Proteome Science**, v. 9, n. 74, p. 74, 2011.

BARTH, O. M.. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v. 41, n. 2, p. 71-85, 2006.

BERRETTA, A. A.; ARRUDA, C.; et al. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. **Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization**, v. 4, n. 1, p. 74, 2017.

BERTELLI, D.; PAPOTTI, G.; et al. ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 260-266, 2012.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low-pressure methods and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2009.

BORGES, M. C. L; SESSO, M. L. T.; et al. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 1, p. 116-125, 2015.

BRASIL, 2000. Instrução normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário oficial da união, Brasília**, 2000.

BRASIL, 2018. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 702. Inclusão de novas práticas na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. Brasília. **Diário oficial da união, Brasília**, 2018.

BREYER, H.F.E.; BREYER, E.D.H.; et al. Produção e beneficiamento da própolis. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina**, v. 1, n. 138, p. 21, 2016.

BRODOWSKA, K.M. Flavonoides naturais: Classificação, papel potencial e aplicação de análogos flavonoides. **European Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 108-123, 2017.

CABRAL, I. S. R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

CAMPOS, J. V. Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CARBONEZI, C. A.; HAMERISK, L.; et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 319-324, 2007.

CARVALHO, C.; FERNANDES, W.H.C.; et al. Evidence-based studies and perspectives of the use of Brazilian green and red propolis in dentistry. **European Journal Dentistry**, v. 13, n. 3, p. 459-465, 2019.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; et al. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A. M.; et al. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, n.14, p. 5332-5335, 2009.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; PAZ, A. C.; et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. 1-10, 2020.

CUESTA, O.; FRONTANA, B. A.; et al. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Z Naturforsch**, v. 57, n. 3, p. 372-378, 2002.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; et al. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, n. 10, p. 106–120, 2016.

FERNANDES, M. H. V.; FERREIRA, L. N.; et al. Effect of water extract from brown propolis on production of ifn- γ after immunization against canine parvovirus (CPV) and canine coronavirus (CCOV). **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 2, p. 235-242, 2015.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES, S. C. C.; et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 2017.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; et al. Composição química e potencial antifúngico da própolis brasileira em *Candida* spp. **Jornal de Micologia Medica**, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016.

GALRÃO, J.; PROENÇA, L.; et al. Prevalência da cárie dentária e presença de bactérias cariogênicas no dorso lingual – Estudo seccional cruzado. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 53, n. 1, p. 11-16, 2012.

GAVANJI, S.; LARKI, B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. **Chienese Journal of Integrative Medicine**, v. 47, n. 23, p. 201-207, 2017.

GPP. Programa Apícola Nacional (Triênios de 2008-2010, 2011-2013, 2014-2016 e 2017-2019). Grupo Acompanhamento do Programa Apícola, MAR, Lisboa (2007, 2010, 2013 e 2016).

GRANDIS, R. A.; MOCHETTE, H. F.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) e do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n.1, p. 77-82, 2015.

HASHEM, H. In Silico approach of some selected honey constituents as SARS-CoV-2 main protease (COVID-19) inhibitors. **Eurasian Journal of Medicinal and Oncology**, v. 4, n. 1, p. 196-200, 2020.

HENRIQUES, A. VASCONCELOS, C.; et al. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HERRERA, Y. F. Atividade citotóxica de amostras de própolis brasileira e cubana contra células tumorais humanas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

HOLETZ, F. B. PESSINI, G. L.; et al. Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, S.; ZHANG, C.; et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v.19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

INOUE, H. T.; SOUZA, E. A.; et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2007.

JAUBERT, G.F. Origin of the colour of beeswax and the composition of propolis. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences**, v. 184, n.1, p. 1134-1136, 1926.

JUG, M.; KONČIĆ, M. Z.; et al. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 530- 537, 2014.

KAWAKITA, E. T.; SOUZA, E. A.; et al. Avaliação da vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis mantido sob diferentes temperaturas de armazenamento, **Atas de Saúde Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 33-46, 2015.

KĘDZIA, B.; HOŁDERNA-KĘDZIA, E. Pinocembryna – flawonoidowy składnik krajowego propolisu o działaniu opóźniającym rozwój choroby Alzheimer. **Posto Fitoter**, v. 18, n. 3, p. 223–228, 2017.

KERR, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v. 39, n. 1, p. 3-5, 1967.

KHURSHID, Z.; NASEEM, M.; et al. Propolis: a natural biomaterial for dental and oral healthcare. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 11, n. 4, p. 265-274, 2017.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; et al. **Diagnóstico microbiológico**. In Guanabara Koogan, 6 edição, 2008.

LOUGHRAN, A. J.; ORIHUELA, C. J.; et al. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and inflammation. **Microbiol Spectrum**, v. 7, n.2, p. 2019.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOURENÇO, M. S. M.; CABRAL, J. E. O. Apicultura e sustentabilidade: visão dos apicultores de Sobral (CE). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 93-115, 2016.

LYNCH, D. J.; VILLHAUER, A. L.; et al. Genotypic characterization of initial acquisition of *Streptococcus mutans* in American Indian children. **Journal of Oral Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2015.

MACHADO B.A.S.; BARRETO, G.A.; et al. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. 11, 2015.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 11, 2016.

MARCUCCI, M.C.; OLIVEIRA, L.F.A.M.; et al. Espectroscopia UV-VIS e reação com o radical DPPH para a detecção de flavonoides e determinação do potencial antioxidante de extratos de própolis. **Revista Eletrônica de Ciências Exatas**, v.1, n.1, p. 1-9, 2020.

MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; et al. Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n.1, p. 61-73, 2021.

MARTINEZ, O. A; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 11, 2012.

MATOSO, L. M. L.; MATOSO, M. B. L. Extrato de própolis no combate ao COVID-19: um relato de experiência em nível da atenção básica em saúde. **Uniciências**, v. 24, n. 1, p. 94-103, 2020.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; et al. Determination of the total phenolic flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MEDEIROS, H. H.; FACHINI, V.; et al. Uso de solução de extrato de própolis como antimicrobiano e cicatrizante em feridas cutâneas causadas por acidente automobilístico em cão. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 2, p. 1-10, 2019.

MINOGUE, T. D.; DALIGAULT, H. A.; et al. Complete Genome Assembly of *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, a Group A β -Hemolytic Reference Strain. **Genome Announcements**,

v. 2, n. 5, p. 00976-14, 2014.

MONROY, Y. M.; RODRIGUES, R. A. F.; et al. Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artemisinin rich extract. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, n. 1, p. 167–173, 2018.

MOREIRA, D. R. Apiterapia no tratamento de patologias. **Revista Fapciência**, Apucarana, v. 9, n. 4, p. 21-29, 2012.

MURATA, R. M.; ALMEIDA, L. S.; et al. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 282, n. 2, p. 174-181, 2008.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.; et al. **Microbiologia Médica**. Tradução: Andreza Martins. 7ª edição. Rio de Janeiro. 2014.

NASCIMENTO, K.S.; SATTLER, J.A.G.; et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **Food Science and Technology**, v. 91, n. 18, p. 85-94, 2018.

NASCIMENTO, T.G. ARRUDA, R. E. S.; et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1, 2019.

NEVES, M. V. M. Fracionamento biomonitorado da própolis vermelha de Igarassu, Pernambuco, Brasil. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

NOUSHIN, A.; ALIREZA, N. Própolis diterpenes como uma fonte biológica notável para o desenvolvimento da descoberta de drogas: uma revisão. **International Journal Molecular Science**, v. 18, n. 6, p. 1290, 2017.

ODE, O.J., ASUZU, I.U.; et al. Bioassay-guided fractionation of the crude methanol extract of *Cassia singueana* Leaves. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 4, p. 81-86, 2011.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 1, p. 208–213, 2011.

OLIVEIRA, L. A. A. Potencial antimicrobiano dos extratos de própolis (verde, vermelha e marrom). Monografia (Graduação em Zootecnia). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte, 2019.

OROIAN, M.; DRANCA, F. et al. comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 70-78, 2019.

OSÉS, S.M.; PASCUAL, M. A.; et al. Bioactive proprieties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, n. 1, p. 1215-1223, 2016.

- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; et al. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físicoquímicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, n. 1, p. 2-7, 2000.
- PEGORARO, A.; FERRAZ, M. M.; et al. **Aspectos práticos e técnicos da apicultura no Sul do Brasil**, 6. edição. Curitiba, 2017.
- PEREIRA, D. S.; IBERÊ, C.; et al. "Histórico e principais usos da própolis apícola", Agropecuária Científica no Semi-árido, v. 11, n. 2, p. 21, 2015.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, M. G. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality- a review, **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, n. 1, p. 53–62, 2019.
- PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 2, v.1, 2013.
- PROKIPCHUK, A. Fitoterapia na doença inflamatória intestinal. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2017.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPÍŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.
- REGUEIRA, M. S.; TINTINO, S. R.; et al. Variação sazonal da própolis vermelha brasileira: atividade antibacteriana, efeito sinérgico e triagem fitoquímica. **Toxicologia Alimentar e Química**, v.107, n. 1, p. 572-580, 2017.
- RIBEIRO, M. W. T. As disputas pela atividade apícola no sertão do Piauí. **Revista Raízes**, v. 37, n. 2, p. 1-15, 2017.
- RIBEIRO, M.G.; CARVALHO, A. S.; et al. Dimetilsulfóxido - DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 889-892, 2001.
- RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; et al. Própolis marrom do sudeste brasileiro: desenvolvimento de método de cromatografia gasosa para análise de óleos voláteis, avaliação de suas atividades antimicrobiana e leishmanicida. **Phytochem Anal**, v. 32, n.1, p. 404-441, 2020.
- RICHTER, K. Innovative approaches to treat *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n.1, p. 61-70, 2017.
- RUFATTO, L. C.; SANTOS, D. A.; et al. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-

598, 2017.

RUFATTO, L. C; LUCHTENBERG, P.; et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation, **Microbiological Research**, v. 214, n. 1, p. 74-82, 2018.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.; SOUZA, P. M. Apitoxina: Utilização do veneno da abelha *Apis mellifera*. **Pubvet**, v. 13, n. 8, p. 1-8, 2019.

SALAS, P. G.; SOTO, A. M.; et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. S.; et al. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 1, p. 343-356, 2005.

SANTANA, F. R.; LUNA-DULCEY, L.; et al. Evaluation of the cytotoxicity on breast cancer cell of extracts and compounds isolated from *Hyptis Pectinata* (L.) Poit. **Natural Product Research**, v. 34, n. 1, p. 102-109, 2019.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 64-70, 2004.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; et al. **An Natural Products Isolation**. New Jersey: Human Press, 2005.

SEIBERT, J.B.; SILVA, J. P. B.; et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative, **Food Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 61– 67, 2019.

SELVARAJ, R.; SIVAKUMARI, K.; et al. Phytochemical profiling and antibacterial activity of propolis. **International Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 6, p. 93-98, 2018.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHETTY, S. B.; ISMAIL, P. M. P.; et al. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: an in vitro study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 71-77, 2016.

SI, D.; ZHONG, D.; et al. Biflavonoids from the aerial part of *Stephania tetrandra*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 563-566, 2001.

SILVA, A. V. Remineralizing potential of nano-silver-fluoride for tooth enamel: an optical coherence tomography analysis. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.

SILVA, E.C.C.; MUNIZ, M.P.; et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da

geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.

SILVA, K. C. M. Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão da literatura. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais. Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

SILVA, R. F. B.; RODRIGUES, M. D. A.; et al. Perspectives for environmental conservation and ecosystem services on coupled rural–urban systems. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 2, p. 74-81, 2017.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; et al. Antioxidante, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis. **PLoS ONE**, v. 30, n. 3, p. 12, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, 6 edição, 2007.

SIMÕES, M. SIMÕES, L. C.; et al. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SILVEIRA, M. A. D.; JONG, D.D.; et al. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 138, n. 111526, p. 1-10, 2021.

SINHA, S.; VOHORA, D. Drug Discovery and development: an overview. **Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research**, v. 1, n. 1, p. 19-32, 2018.

SOARES, A. L. F. BILEZIKDJIAN, P. J.; et al. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Revista Gestão em Foco**. 9. edição, 2017.

SOUSA, A. K. A. Atividade Antibacteriana do Extrato Hidroalcoólico da Própolis Vermelha no Semiárido Paraibano sobre *Streptococcus pyogenes*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, 187-209, 2002.

SWERTS, M. S.O.; COSTA, A.M. D. D. et al. Efeito da solução associada de clorexidina e própolis na inibição da aderência de *Streptococcus spp*. **Revista Internacional de Periodontia Clínica**, v. 2, n. 4, p. 6-10, 2005.

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G. et al. Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**, v. 1, n. 4, p.137-218, 2009.

TAZAWA, S.; ARAI, Y.; et al. Discovery of a novel diterpene in brown propolis from the state of Parana, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2, p. 201-205, 2016.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307-315, 2010.

TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; ET AL. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 99, n. 19, p. 12391–12396, 2002.

THAMNOPOULOS, I. A. I.; MICHAILIDIS, G. F.; et al. Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. **Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 168–176, 2018.

TORRES, M. L. M.; LIMA, B. P. N.; et al. Uso de pomada de própolis brasileira Tipificada e dmso para tratamento de Feridas cirúrgicas. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1-9, 2021.

TRENTIN, D. da S.; GIORDANI, R. B.; et al. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

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

URTEAGA, W. J. C. Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad in vitro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Monografía (Graduação em Odontologia) – Universidad César Vallejo, Peru, 2017.

VASCONCELOS, L. C. Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* frente à ação antifúngica do timol. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

VERDEROSA, A. D.; TOTSICA, M.; et al. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frot Chemistry**, v.7, n. 1, p. 824, 2019.

VILLANUEVA, V. R.; BOGDANOVSKY, D.; et al. Sur l'isolament et l'identification de la 3,5,7 trihydroxy favone (Galangine) a partir da própolis. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 106, n.1, p. 292-302, 1964.

VILLANUEVA, V. R.; BARBIER, M.; et al. Les favonoids de la própolis. Isolamento de uma nova substância bacteriológica: a pinocembrina (diidroxí-5,7 flavanona). **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 118, n.1, p. 84-87, 1970.

WALKER, M.J.; BARNETT, T.C.; et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 264-301, 2014.

WRIGHT, G. Antibiotics: An irresistible newcomer. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 442–444, 2015.

XIAO J.; Klein, M. I.; et al. Delahunty CM, Yates III JR, Lu B, Heydorn A, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of

a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. 1-17, 2012.

ZAINAL, W. N. H. W.; AZIAN, N. A. A. M.; et al. Effects of extraction method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of *Tetrigona apicalis* Malaysian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2021.

ANEXOS

ANEXO A - Certidão de cadastro de acesso no SisGen.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A59BE98

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A59BE98**
 Usuário: **Rosana Moura Andrade**
 CPF/CNPJ: **066.472.895-26**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PRÓPOLIS MARROM FRENTE A ESPÉCIES DO GÊNERO Streptococcus**

Equipe

Rosana Moura Andrade	Universidade Federal de Sergipe
Adriana Gibara Guimarães	Universidade Federal de Sergipe
Rafael Ciro Marques Cavalcante	Universidade Federal de Sergipe
James Almada da Silva	Universidade Federal de Sergipe

Data do Cadastro: **14/05/2021 09:28:02**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:21** de **21/07/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**