



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que a aluna Fernanda Maria Mazoni dos Reis (RA:104912) esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "HETEROCONTROLE DE SOLUÇÕES DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM FARMÁCIAS DA CIDADE DE PIRACICABA, SP, BRASIL" no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 01 de Outubro de 2013.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Bruno Bueno Silva".

Dr. Bruno Bueno Silva



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Fernanda Maria Mazoni dos Reis

**HETEROCONTROLE DE SOLUÇÕES DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM
FARMÁCIAS DA CIDADE DE PIRACICABA, SP, BRASIL.**

Piracicaba
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Fernanda Maria Mazoni dos Reis

**HETEROCONTROLE DE SOLUÇÕES DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM
FARMÁCIAS DA CIDADE DE PIRACICABA, SP, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos para
conclusão do Curso de Graduação
em Odontologia.

Orientador: Dr. Bruno Bueno Silva
Coorientador: Prof. Dr. Pedro L. Rosalen

Piracicaba
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R277h Reis, Fernanda Maria Mazoni dos, 1991-
Heterocontrole de soluções de própolis produzidas em
farmácias da cidade de Piracicaba, SP, Brasil /
Fernanda Maria Mazoni dos Reis. -- Piracicaba, SP:
[s.n.], 2013.

Orientador: Bruno Bueno Silva.

Coorientador: Pedro Luiz Rosalen.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Flavonóides. 3.
Fenólicos. 4. Antimicrobianos. I. Silva, Bruno Bueno,
1983- II. Rosalen, Pedro Luiz, 1960- III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que sempre esteve comigo, iluminando meu caminho e dando-me forças para sempre seguir em frente;

Aos meus pais, **Ângela** e **Fernando**, por serem sempre meu porto seguro, por me amarem cegamente e por terem acreditado sempre em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava.

A minha irmã, **Stefânia**, que me ajudou a me tornar o que sou hoje, sendo sempre um exemplo de convicção e força;

A minha avó, **Therezinha**, por ser amorosa, companheira e um exemplo de integridade. Pelos momentos doces nos finais de semanas que sempre me pacificam e me fazem feliz.

Às minha amigas, **Amanda, Caroline, Daniela, Eloá, Eloísa, Maria Clara, Marina e Rafaela**, por terem feito desses quatro anos uma experiência única e maravilhosa. Por todos os sorrisos e gargalhadas nos momentos felizes e bobos e por todas as lágrimas nos momentos de dor e aflição;

Às minhas amigas, **Bianca, Jina, Isadora e Rafaela** por terem transformado nossa casa em um lar, um lugar acolhedor e de risos fáceis.

A minha amiga **Karina**, parceira e minha vizinha de frente de Box, por sempre me ajudar sem pensar duas vezes e por compartilharmos todas as nossas derrotas e vitórias em dias de clínica.

Aos meus **professores**, por terem compartilhado todo seu conhecimento e contribuído para minha formação profissional e pessoal.

Ao meu orientador, **Bruno**, pela paciência, tranquilidade e dedicação me guiando durante todos os anos de Iniciação Científica e agora durante este projeto;

Ao meu co-orientador, **Professor Rosalen**, pela oportunidade do estudo científico, me auxiliando sempre com amabilidade, gentileza e paciência durante todos esses anos.

À **Unicamp** e à **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, por me proporcionarem um curso superior de excelência.

EPÍGRAFE

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

*Autor: Paulo Freire
Livro: Educação e mudança*

RESUMO

Própolis é uma resina muito usada pela população brasileira para diversos fins terapêuticos. Tem sido comprovado que a própolis possui atividade antimicrobiana inclusive contra *Streptococos* do grupo mutans e periodontopatógenos e esta ação é atribuída aos flavonóides agliconas. Entretanto, estudos demonstram que a própolis apresenta variação em sua composição química de acordo com o local e a época do ano que é produzida. Assim sendo, a atividade antimicrobiana também pode variar de acordo com os fatores citados, uma vez que está diretamente relacionada com a composição química da própolis. Logo, o heterocontrole das soluções de própolis se faz necessário para seu consumo seguro e eficaz baseado em suas características químicas e biológicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a composição química e a atividade antimicrobiana de soluções de própolis produzidas e comercializadas em farmácias de manipulação de Piracicaba – SP. As soluções de própolis disponíveis nas farmácias de manipulação de Piracicaba foram adquiridas e armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz, seguindo a orientação do órgão de registro. Em seguida, foram analisadas química e biologicamente nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Os testes que foram realizados são: 1- Determinação do espectro de absorção e dos flavonóides totais e fenólicos totais para verificar a composição química ao longo de um ano; e 2- Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das mesmas amostras para verificação da atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus*. O teor de fenólicos das amostras variou de 96,35 ug/mL até 2,90 ug/mL enquanto o de flavonóides variou de 0,5 ug/ml à 7,96 ug/ml. Os espectros de absorção foram os semelhantes ao longo do ano. Em relação a atividade antimicrobiana, a CIM variou de 0,1% à 10% enquanto que a CBM variou de 50% à 100% para todos os microrganismos testados em todos os tempos. Ao final, concluiu-se que 8 amostras não cumprem os requisitos da ANVISA para comercialização, porém, as mesmas ainda apresentam atividade antimicrobiana, indicando assim que a composição química sofreu alterações quantitativas mas não qualitativas.

Palavras Chaves: Antimicrobiano; *S. mutans*; Flavonóides; Fenólicos

ABSTRACT

Propolis is a resin widely used by the Brazilian population for therapeutic purposes. It has been proven that propolis has antimicrobial activity even against *Streptococcus mutans* and periodontal pathogens: this action is attributed to the flavonoids compounds. However, studies have shown that chemical composition of propolis varies according to the location and season that is produce. Therefore, the antimicrobial activity may also vary according to the factors mentioned before, since it is directly related to the chemical composition of propolis. Thus, a quality control study of propolis solutions is necessary in order to guarantee a safe and effective consumption by the population, based on their chemical and biological properties. The objective of this work was to verify the chemical composition and antimicrobial activity of propolis solutions produced and sold by pharmacies in Piracicaba - SP. The solutions of propolis were acquired and stored in a chilly place and protected from the light, following the guidance of the ANVISA. Then, they were analyzed chemically and biologically at 0, 1, 3, 6, 9 and 12 months. The tests performed were: 1 - Determination of the absorption spectrum and the total content of flavonoids and phenolics to verify chemical composition over a year and 2 - Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the same samples to verify the antimicrobial activity against *S. mutans*, *A.naeslundii* and *S. aureus*. The phenolic content ranged from 96.35 ug/mL to 2.90 ug/ml, while the flavonoid varied from 0.5 ug/ml to 7.96 ug/ml. The absorption spectra were similar throughout the year. All samples showed antimicrobial activity and the MIC ranged from 0.1 % to 10 % while MBC ranged from 50 % to 100 % for all tested microorganisms during the 1 year period. Therefore, it was concluded that 8 samples do not reach the requirements of ANVISA for marketing and population consumption. However, they still exhibit antimicrobial activity, indicating that the chemical profile have changed only quantitatively but not qualitatively.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. PROPOSIÇÃO.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
5. RESULTADOS.....	10
6. DISCUSSÃO.....	17
7. CONCLUSÃO.....	19
8. REFERÊNCIAS.....	19

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais tem sido grande instrumento científico para decifrar a lógica e as estruturas para a descoberta de novas drogas como agentes inovadores na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade (Clardy & Walsh, 2004). Além disso, o valor dos produtos naturais é claramente reconhecido na descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que 28% das novas drogas aprovadas desde 1983 até 1994 pelo Food and Drug Administration (FDA), ou entidade compatível em outros países, procedem inteiramente de produtos naturais, 39% são de derivados de produtos naturais e 33% são drogas de origem sintética (Newman *et al.*, 2003).

Entre os produtos naturais, a própolis, uma substância resinosa não tóxica, coletada de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos por abelhas africanas *Apis mellifera*, já era utilizada para fins médicos desde 300 a.C. tendo-se conhecimento de suas propriedades biológicas, como as atividades antimicrobianas, antiinflamatória, cicatrizante, antiviral, anticarcinogênica, antioxidante, entre outras. Além disso, tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa, sendo classificada como GRAS – Generally Recognized As Safe (FDA, 1988) nos EUA, como alimento funcional no Japão (Jetro 2003) e como alimento no Brasil (BRASIL, 1950). Devido a sua biodiversidade e por ser uma rica fonte de compostos químicos bioativos, a própolis foi classificada em 13 tipos no Brasil, sendo que os tipos que apresentam melhor atividade antimicrobiana foram os tipos 3 (RS), 6 (BA), 12 (MG) e 13 (AL) (Park *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008).

De acordo com Hayacibara *et al.*, 2005 e Koo *et al.*, 1999, as própolis do tipo 3 e 12 demonstraram atividade antimicrobiana com a capacidade de reduzir a produção de ácido no biofilme bacteriano oral e cárie dental em modelos animais, sendo a própolis 3 a mais efetiva. Além disso, a própolis tipo 3 reduziu o índice de placa supra-gengival em um experimento clínico (Koo *et al.*, 1999) enquanto que a tipo 12 apresentou atividade antioxidante e anti-tumoral (Park *et al.*, 2000 e Matsuno *et al.*, 1997).

Apesar de classificação da própolis brasileiras, há estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que poderá influenciar o seu potencial e as atividades já descritas anteriormente (Sforcin 2000). Os compostos químicos pertencentes ao grupo dos flavonóides tem sido considerados como os responsáveis pela atividade biológica da própolis brasileira. (Park; Ikegaki & Alencar, 2000).

Nesse sentido, segundo a legislação brasileira, o extrato da própolis disponível no comércio deve conter, no mínimo, 0,25% de flavonóides totais (BRASIL, 2001) para que sejam satisfeitas as exigências de um produto para consumo nacional ou ainda para critérios de exportação (BRASIL, 2001). Além disso, foi definido pela legislação brasileira que o prazo de validade de produtos farmacêuticos seja estabelecido em função do teor do fármaco que compõe este medicamento. Nesse sentido, a realização de testes de estabilidade são necessários para definição de prazo de validade de produtos farmacêuticos por meio de estudo de envelhecimento acelerado e de longa duração (BRASIL, 2005). Porém, para produtos de origem natural (diferentemente dos farmacêuticos), não existe determinação exata do princípio ativo ou fármaco responsável pelo seu efeito, dificultando a determinação do prazo de validade nos padrões exigidos por lei. Há ainda uma omissão por parte das autoridades na normalização e comercialização destes produtos, entre os quais, a própolis está incluída.

Atualmente, os produtores utilizam como prazo de validade o período de 2 anos, baseados em critérios estabelecidos para o prazo de validade da “tintura-mãe” (Manual de Normas e Técnicas para Farmácia Homeopática – Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas, 1995). Vale ressaltar que a Farmacopéia Brasileira, 1995, não estabelece prazo de validade para soluções de própolis.

Portanto, um estudo de estabilidade das soluções de própolis comercializadas mostra-se fundamental, para que haja garantia da atividade dos componentes da própolis em solução, permitindo ao usuário utilizar o extrato da própolis em solução com segurança, além de que, desde a criação do Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990), as entidades responsáveis procuram realizar rigorosa fiscalização de produtos e seus prazos de validade a fim de proteger o consumidor. Assim sendo, nosso grupo de

pesquisa realizou um estudo de estabilidade acelerado com a própolis brasileira tipo 12 (mais utilizada atualmente) e verificou que há perda da atividade antimicrobiana a partir do 1 mês de estudo. No entanto, foi utilizada a própolis bruta e não a 10% como normalmente esse produto é comercializado nas farmácias de manipulação.

Portanto, o objetivo do presente trabalho será determinar por quanto tempo o extrato de própolis a 10 % é ativo utilizando como evidenciadores químico: o teor de flavonóides totais fenólicos totais (Park, Alencar & Aguiar 2002); e biológico: atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces naeslundii*. (Park *et al.* 1998a; Park *et al.*, 1998b)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Evolução da Apicultura no Cenário Nacional e Internacional

As abelhas são insetos descendentes das vespas que alimentam-se de pólen produzidos pelas plantas. Estima-se que existam mais de 60 mil espécies de abelhas, sendo conhecidas somente 20 mil delas. Somente 2% das abelhas são sociáveis e produzem mel e, dentre estas, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas. (SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE, 2006)

Com o objetivo de melhorar a apicultura brasileira através de um programa de melhoramento genético com abelhas trazidas da África, o cientista brasileiro Dr. Warwick Estevam Kerr em 1956 constatou que as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* apesar de serem bastante agressivas e terem caráter enxameatório também apresentavam alta produtividade e boa capacidade de adaptação. Assim, o Doutor Kerr tinha como objetivo diminuir ou extinguir essas qualidades negativas desse gênero de abelhas e posteriormente distribuir aos apicultores brasileiros as rainhas selecionadas. Infelizmente, durante esse processo houve um acidente e a africanização dos apiários brasileiros antes de qualquer seleção ocorreu de forma não programada ou prevista. Portanto, hoje em nosso território nacional temos uma abelha poli-híbrida africanizada. No entanto, apesar de todos os aspectos envolvendo as abelhas ao longo desses 57 anos, podemos falar com absoluta convicção que, graças à boa produtividade e alta capacidade de adaptação das abelhas

africanizadas, bem como sua alta capacidade de resistência a doenças, a apicultura brasileira é uma atividade de agronegócio que mais tem sido desenvolvida no Brasil, tornando o nosso país conhecido mundialmente como exportador e produtor de mel orgânico e própolis. (GONÇALVES, 2006) Em relação à própolis, não existem estatísticas suficientemente confiáveis sobre a produção mundial. Entretanto, os maiores produtores são a China, o Brasil, EUA, Austrália e Uruguai, os quais fornecem cerca de 200 toneladas de própolis por mês para o consumo mundial.

2.2 Própolis

A descoberta que certos alimentos podem prevenir doenças começou uma nova era nas áreas de nutrição, farmácia, medicina e ciência de alimentos. Além de nutrientes, hoje sabe-se que esses alimentos possuem componentes que tem funções específicas e são muito importantes para a saúde. Esses componentes são chamados de “Substancias Bioativas” e os alimentos que as contem são chamados de “Alimentos Funcionais”. (MANN, 1994)

O termo própolis já era descrito no século XVI na França e, em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades *químicas e composição*, indexado no *Chemical Abstracts* (Referência nº192) (PEREIRA *et al*, 2002). Própolis é o nome genérico que se dá para a substancia resinosa de composição complexa, coletada pelas abelhas de diversas plantas (GHISALBERTI, 1979). A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* significa cidade, isto é, em defesa da cidade ou colméia. (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). As abelhas realmente utilizam da própolis para proteger suas colméias contra insetos e microorganismos, empregando-a em fresta e falhas, e também no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. Costuma-se encontrar na colméia pequenos insetos, animais ou partes destes envolvidos em própolis, e em perfeito estado de conservação (MARCUCCI, 1996), já que a própolis é também atribuída a sua ampla atividade antimicrobiana, o que impede a conservação do cadáver. (PARK *et al*, 1998a)

A própolis é um material quebradiço quando frio e maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 – 70 C, sendo que pode atingir em alguns casos 100 C. A coloração da própolis é dependente de sua procedência e pode variar do marrom escuro, passando para o esverdeado até o marrom

avermelhado, dependendo da flora de origem. Possui também um odor característico que pode variar de uma amostra para a outra. (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998).

2.3 Composição Química da Própolis

A composição química da própolis é extremamente variável, mas em geral é composta basicamente de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, inclusive alguns resíduos orgânicos.

As abelhas coletam a matéria prima para a produção de própolis através de diversas plantas e podem conter substâncias secretadas ativamente e substâncias exsudadas de cortes, materiais lipofílicos das folhas e dos brotos foliares, mucilagem, gomas, resinas e látex (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). As propriedades biológicas da própolis estão obviamente interligadas as suas propriedades químicas. E este é inclusive o maior problema encontrado, uma vez que a composição química da própolis varia de acordo com a região que se encontra, da flora e da sazonalidade. A época da colheita, assim como a espécie da abelha, também influenciam a composição da própolis. Não Brasil ainda existe o fator chamado “africanização” da *Apis mellifera*. (TOMÁS- BERBERAN, 1993).

2.4 Compostos Fenólicos

A expressão “compostos fenólicos” abrange grande número de substâncias orgânicas, que são compostos aromáticos que possuem hidroxilas como substituintes. O composto mais comum é o fenol simples, que ocorre como resultado da descarboxilação de ácidos fenólicos, degradação térmica da lignina ou atividade microbiana. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em microrganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese do composto fenólico em pequena quantidade é feita utilizando o anel benzênico de substâncias ingeridas na dieta. Por outro lado, os vegetais e a maioria dos microrganismos tem a capacidade de gerar o anel benzênico, e, a partir dele produzir diferentes tipos de compostos fenólicos.

A biossíntese completa de compostos fenóis pode ser observada em plantas vasculares. Todas as gimnospermas e angiospermas possuem lignina na parede celular, a qual tem os fenilpropanóides como precursores. Pode-se

encontrar ainda ácidos hidroxibenzênicos e hidroxicinâmico e flavonóides, além de outras classes de fenóis de menor distribuição. Os isoflavonóis estão presente principalmente na família das leguminosas, enquanto que as antraquinonas podem ser encontradas em aproximadamente seis famílias dos reino vegetal. (MANN, 1994)

A maioria dos compostos fenólicos não são encontrados na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres e heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Os compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio, e estas podem ser tanto intramoleculares quanto extramoleculares. Uma característica importante é a complexação com metais, sendo que muitos destes quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos possuem extrema absorção a região ultravioleta. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzima vegetal específica quanto por influencia de metais, luz, calor e sistema alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados. (SIMÕES, 2001)

2.5 Flavonóides

A palavra flavonóide tem origem no latim *flavus*, que significa amarelo, e incluía no início somente compostos de coloração amarelada e um núcleo flavona. Hoje em dia, este termo é usado em um amplo contexto e inclui compostos menos coloridos e até incolores. Esses compostos compõe ampla classe de substancias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, mas são constituintes de frutas, vegetais, nozes, bebidas originadas de plantas como o chá e o vinho. (PETERSON; DWYER, 1998; RICE-EVANS, 2004)

Os flavonóides absorvem radiação ultravioleta, e dessa maneira ocupam um papel importante na defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, os compostos flavonóides representam também uma importante barreira de proteção contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Também possuem a capacidade de regular certas funções enzimáticas e prover “flavor” a produtos fabricados para consumo humano (COOPER-DRIVER, 2001). Os flavonóides também promovem um relacionamento harmônico entre insetos e plantas, por meio de orientações

destes até o néctar das plantas, contribuindo, assim, fortemente para a polinização das plantas. (MARCUCCI, 1996)

3. PROPOSIÇÃO

Verificar a composição química e atividade antimicrobiana de extratos de própolis comercializados em farmácias de manipulação da região central da cidade de Piracicaba – SP durante o período de um ano, utilizando como evidenciadores o teor de flavonóides totais e atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces naeslundii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

As soluções de própolis foram adquiridas em 10 diferentes farmácias de manipulação localizadas na cidade de Piracicaba – SP, sendo que as amostras foram compradas na forma em que são vendidas para consumo e preparadas de acordo com a recomendação de uso do fabricante. As soluções de própolis foram usadas a 100 % (mesma concentração do frasco, sem diluição), a 50% (amostras diluídas 1:1) a 10 % (amostras diluídas a 1:10), a 1 % (amostras diluídas 1:100) e 0,1 % (amostras diluídas 1:1000) sendo que as amostras de própolis foram diluídas em solução de álcool a 80% (v/v). Foram adquiridos 3 frascos da mesma solução de própolis em cada farmácia, sendo que 2 estão sendo utilizados nos experimentos e 1 foi retido para exames de contra-prova. Os produtos foram armazenados em local fresco e ao abrigo da luz, de acordo com recomendações do Ministério da Agricultura e analisados no momento da compra (tempo 0), após 1, 3, 6 e 9 meses. O tempo 12 será realizado em setembro. Os frascos foram devidamente registrados de 1 a 10 de acordo com a farmácia de origem de aquisição. Para cada período de análise foram realizados os seguintes testes:

4.2. Análises químicas

4.2.1. Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção das soluções de própolis foi realizada segundo o método descrito por Park *et al.* (2000). Alíquotas de 30µL foram diluídas em 30 mL de etanol P.A (80 %), e os espectros de

absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm em espectrofotômetro.

4.2.2. Análise de fenólicos totais do extrato etanólico da própolis.

A análise de compostos fenólicos totais das soluções de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Cicateau descrito por Woisky & Salantino (1998), utilizando ácido gálico como padrão. As amostras foram diluídas 1:10 e uma alíquota de 0,5mL foi transferida para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Cicateau diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 8 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4 %. Após 2 horas em repouso, ao abrigo da luz, foi medida a absorvância em espectrofotômetro a 740 nm. A absorvância obtida relaciona o teor de fenólicos totais, com base no padrão ácido gálico.

4.2.3. Análise dos flavonóides totais do extrato etanólico da própolis.

A análise dos flavonóides totais foi feita de acordo com o método descrito por Park *et al* (1995) e Kenkosyokuhin Kikaku Kijun no Koshi (1994). O princípio desta reação se baseia na formação de quelatos entre o metal Alumínio e os flavonóides, principalmente os flavonols (3-hidroxi flavonas) como quercetina, em soluções alcoólicas levando a um efeito batocrômico do espectro de absorção dos flavonóides, com alteração da coloração (Jurd & Geissman, 1956; Urbach & Timmick, 1968 e Jurd, 1969). Foi realizada uma reação colorimétrica pela mistura de 0,5 mL da amostra, 4,3 mL de etanol 80 %, 0,1 mL de nitrato de alumínio 10 % e 0,1 mL de acetato de potássio 0,1 M. Como controle para as amostras, foi utilizado 0,1 mL de água em substituição ao nitrato de alumínio. Após 40 minutos, mediu-se a absorvância das amostras em espectrofotômetro (Beckman DU-70) a 415 nm. A leitura final de absorvância foi obtida pela diferença entre a absorvância da reação e o controle. A absorvância obtida relaciona o teor de flavonóides totais, com base no padrão quercetina.

4.3 Análises antimicrobiana

4.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

O *Streptococcus mutans* UA159, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 foram inicialmente reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a 37°C, 5 % CO₂ e

posteriormente cultivados em placas BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89 % estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, que equivale a $1-2 \times 10^8$ ufc/mL.

Um volume de 100 μ L da suspensão bacteriana para cada microrganismo separadamente, foram inoculados em 100 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ ufc/mL, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 190 μ L do inóculo e 10 μ L da solução de própolis - teste (concentrações finais variando entre 100; 50; 10; 1 e 0,1 %) foi acrescentado em cada poço de placa de Elisa, resultando em um volume final de 200 μ L de solução. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa à 37 °C de temperatura, em atmosfera parcial de 5 % de CO₂, por 18-24 horas.

Foram feitos três controles para todos o microrganismo: 1) meio de cultura inoculado de bactéria, 2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 50 μ L de etanol 80 % (v/v) e 3) meio de cultura (sem inóculo) utilizado como “blank” para espectrofotometria. Após a incubação, foi adicionado 25 μ L do corante Resazurina (Sigma) e a CIM foi considerada a menor faixa de concentração da solução de própolis - teste em que não houver mudança de cor.

4.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM):

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima, segundo técnica descrita por PHILLIPS (1991) e KOO *et al.* (2000), foram utilizadas placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos poços que não apresentaram alteração de cor. Uma alíquota de 30 μ L das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas BHI ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado esterilizado. A CBM foi a menor concentração que causará 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar (DUARTE *et al.*, 2003).

5. RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados das análises de fenólicos e flavonóides totais e dos testes de CIM e CBM no período inicial da pesquisa (tempo 0). Os resultados dos controles não estão expressos na tabela mas os microrganismos apresentaram crescimento visível nos controles exceto no controle utilizado como “blank”.

O teor de fenólicos das amostras variou de 5,71 até 96 mg/mL, demonstrando que todas as amostras estão dentro das normas da ANVISA, a qual preconiza que um extrato de própolis deve conter no mínimo 0,50 % (p/v) de compostos fenólicos (BRASIL, 2001), ou seja, para cada 1 mL de extrato de própolis, deve haver 5 mg de compostos fenólicos. Apesar de todas as amostras estarem dentro da norma brasileira observa-se que a variação das quantidades de fenólicos totais entre as amostras é muito grande, o que pode variar a atividade biológica entre um e outro extrato (diferença entre a amostra de maior teor é de aproximadamente 20 vezes mais que a de menor teor).

O teor de compostos flavonóides (Tabela 1) variou de 0,98 até 4,18 mg/mL, demonstrando que as amostras 1, 7, 8, 9 e 10, ou seja 50 % das amostras adquiridas, não estão de acordo com as normas da legislação brasileira, que determina que um extrato de própolis contenha no mínimo 0,25 % (p/v) de compostos flavonóides (BRASIL, 2001), ou seja, para cada 1 mL de extrato de própolis, deve haver 2,5 mg de compostos flavonóides. Apesar deste achado, as amostras 1, 7, 8, 9 e 10 assim como as demais inibiram o crescimento das cepas testadas neste estudo (*S.mutans*, *S.aureus* e *A.naeslundii*) na concentração de 10 % ou menor, e provocaram a morte do microrganismo na concentração de 100 % do extrato exceto as amostras 2, 3 e 6 as quais provocaram a morte do *S. mutans* na concentração de 50 % do extrato original, demonstrando que mesmo com uma quantidade de flavonóides abaixo do exigido por lei, a mesma continua com as propriedades antimicrobianas, segundo os microrganismos estudados. Além disso, há diversos estudos na literatura sobre própolis brasileiras que não contém

flavonóides, mas que apresentam propriedades biológicas (DUARTE *et al.*, 2003).

Por outro lado, as amostras 2, 3 e 6 foram as únicas capazes de matar o *S. mutans* em dose menor que 100 % e apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos e flavonóides, sugerindo que os compostos flavonóides apresentam ação antimicrobiana contra *S. mutans*, assim como relatado em diversos trabalhos científicos já publicados (Hayacibara *et al.*, 2002; Park, Alencar, Aguiar, 2002).

Tabela 1: Resultados do tempo 0 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *s. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (mg/mL)	Flavonóides (mg/mL)	CIM (%)			CBM (%)		
			<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>
1	5,76 (± 0,01)	0,98 (± 0,01)	10	10	10	100	100	100
2	41,73 (±0,01)	6,08 (±0,01)	1	10	10	50	100	100
3	96,35 (±0,05)	7,96 (±0,05)	1	1	10	50	100	100
4	36,64 (±0,04)	3,10 (±0,04)	10	1	10	100	100	100
5	21,81 (±0,03)	2,51 (±0,03)	10	10	10	100	100	100
6	46,57 (±0,02)	4,18 (±0,02)	1	10	10	50	100	100
7	16,72 (±0,04)	1,69 (±0,04)	10	10	10	100	100	100
8	4,83 (±0,03)	0,66 (±0,03)	10	10	10	100	100	100
9	11,36 (±0,02)	1,60 (±0,02)	10	1	10	100	100	100
10	7,71 (±0,04)	0,98 (±0,04)	10	10	10	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

Os resultados dos testes realizados no tempo 1 (mês) estão expressos na Tabela 2. Nota-se que após 1 mês de armazenamento, houve redução nas quantidades de fenólicos e flavonóides totais para todas as amostras. Assim, a amostra 5 passou a estar fora das normas da ANVISA (Brasil, 2001). No

entanto, não houve alteração na atividade antimicrobiana das 10 própolis estudadas, exceto a CIM do *A. naeslundii* da amostra 9 que passou a apresentar atividade inibitória a 10 % e não mais a 1 % como apresentado no tempo 0. Em relação à CBM, não houve alteração para nenhuma amostra.

Tabela 2: Resultados do tempo 1 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *s. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (mg/mL)	Flavonóides (mg/mL)	CIM (%)			CBM (%)		
			<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>
1	5,70 (±0,02)	0,90 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
2	27,07 (±0,01)	5,84 (±0,01)	1	10	10	50	100	100
3	70,68 (±0,03)	6,93 (±0,03)	1	1	10	50	100	100
4	27,51 (±0,02)	2,75 (±0,02)	10	1	10	100	100	100
5	20,00 (±0,01)	2,29 (±0,01)	10	10	10	100	100	100
6	34,86 (±0,04)	4,14 (±0,04)	1	10	10	50	100	100
7	12,11 (±0,02)	1,42 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
8	4,30 (±0,04)	0,65 (±0,04)	10	10	10	100	100	100
9	11,35 (±0,06)	1,47 (±0,06)	10	10	10	100	100	100
10	6,21 (±0,04)	0,91 (±0,04)	10	10	10	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

A tabela 3 expressa os resultados das análises de fenólicos e flavonóides totais e dos testes de CIM e CBM após 3 meses de armazenamento. Nota-se que a quantidade de fenólicos e flavonóides reduziu em relação ao tempo 1 (Tabela 2). A amostra 4 passou a integrar o grupo das amostras que já estavam fora das normas da ANVISA (Brasil, 2001) desde o tempo 1. Em relação as atividades biológicas, não houve alteração na atividade antimicrobiana das 10 própolis estudadas, exceto a CIM para *S. mutans* das amostras 2 e 6 e para *A. naeslundii* das amostras 4 e 9, as quais tiveram suas

concentrações aumentadas para 10 %. Em relação a CBM, não houve qualquer alteração entre todas as própolis estudadas.

Tabela 3: Resultados do tempo 3 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *s. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (mg/mL)	Flavonóides (mg/mL)	CIM (%)			CBM (%)		
			<i>S. mutans</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>
1	5,14 (±0,03)	0,85 (±0,03)	10	10	10	100	100	100
2	19,88 (±0,04)	5,33 (±0,04)	10	1	10	50	100	100
3	67,31 (±0,02)	6,02 (±0,02)	1	1	1	50	100	100
4	25,8 (±0,03)	2,00 (±0,03)	10	10	10	100	100	100
5	18,64 (±0,04)	1,48 (±0,04)	10	10	10	100	100	100
6	28,33 (±0,03)	3,63 (±0,03)	10	10	10	50	100	100
7	11,21 (±0,02)	1,33 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
8	4,04 (±0,03)	0,61 (±0,03)	10	10	10	100	100	100
9	9,34 (±0,04)	1,32 (±0,04)	10	10	10	100	100	100
10	6,17 (±0,02)	0,601 (±0,02)	10	10	10	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

A tabela 4 expressa os resultados das análises de fenólicos e flavonóides totais e dos testes de CIM e CBM após 6 meses de armazenamento. Nota-se que a quantidade de fenólicos e flavonóides reduziu em relação aos outros tempos e a própolis 1 passou a apresentar uma quantidade menor de fenólicos do que os 0,50 % (p/v) preconizados pela ANVISA. Em relação as atividades biológicas, não houve alteração na atividade antimicrobiana das 10 própolis estudadas, a CIM para *S. mutans* das amostras 3 e 6 após o resultado inesperado durante o tempo 3 mantiveram-se constante apresentando ainda a concentração de 10%. Para o *S. aureus* das amostras 3 e 6 tiveram um resultado inesperado, pois apresentaram concentração inibitória mínima em

uma concentração menos do que as relatadas durante os outros meses. Para *A. naeslundii* das amostras 4 e 9, as quais tiveram suas concentrações aumentadas para 10 % no tempo 3 também mantiveram-se constantes durante este tempo. Em relação a CBM, não houve qualquer alteração entre todas as própolis estudadas.

Tabela 4: Resultados do tempo 6 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *S. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (µg/mL)	Flavonóides (µg/mL)	CIM (%)			CBM (%)		
			<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S.aureus</i>
1	6,38 (±0,26)	0,66 (±0,01)	10	10	10	100	100	100
2	27,23 (±0,34)	3,65 (±1,19)	10	10	10	50	100	100
3	27,63 (±0,38)	5,39 (±0,62)	1	1	1	50	100	100
4	23,45 (±1,87)	1,91 (±0,12)	10	10	10	100	100	100
5	18,03 (±0,36)	2,54 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
6	29,44 (±0,83)	2,15 (±0,09)	10	10	1	50	100	100
7	16,21 (±0,62)	1,59 (±0,01)	10	10	10	100	100	100
8	2,90 (±0,01)	0,54 (±0,01)	10	10	10	100	100	100
9	8,29 (±0,67)	1,47 (±0,01)	10	10	10	100	100	100
10	7,07 (±0,48)	0,50 (±0,01)	10	10	10	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

A Tabela 5 expressa os resultados das análises de fenólicos e flavonóides totais e dos testes de CIM e CBM após 9 meses de armazenamento. Nota-se que a quantidade de fenólicos e flavonóides reduziu em relação aos outros tempos, porém as amostras ainda apresentam atividade antimicrobiana. A CIM permaneceu a mesma para o *S. mutans* e o *A. naeslundii*, porém houve um resultado inesperado para o *S. aureus* durante esse tempo, uma vez que as própolis 7, 8 e 10 necessitaram de uma concentração menor para causar o efeito esperado. Em relação a CBM, não houve nenhuma alteração em todas as própolis estudadas.

Tabela 5: Resultados do tempo 9 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *s. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (µg/mL)	Flavonóides (µg/mL)	CIM (%)			CBM %		
			<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S. aureus</i>
1	7,17 (±0,02)	0,57 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
2	34,02 (±0,67)	3,29 (±0,05)	10	10	10	50	100	100
3	32,08 (±0,39)	3,85 (±0,02)	1	1	1	50	100	50
4	21,08 (±0,05)	1,94 (±0,05)	10	10	10	100	100	100
5	45,18 (±0,05)	2,32 (±0,05)	10	10	10	100	100	100
6	27,98 (±0,59)	2,94 (±0,1)	10	10	10	100	100	100
7	27,61 (±3,18)	1,39 (±0,04)	10	10	0,1	100	100	100
8	5,87 (±0,01)	0,53 (±0,01)	10	10	0,1	100	100	100
9	14,42 (±0,02)	1,36 (±0,02)	10	10	10	100	100	100
10	7,83 (±0,01)	0,50 (±0,01)	10	10	0,1	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

A Tabela 6 expressa os resultados das análises de fenólicos e flavonóides totais e dos testes de CIM e CBM após 12 meses de armazenamento. Nota-se que a quantidade de fenólicos e flavonóides reduziu em relação aos outros tempos, porém as amostras ainda apresentam atividade antimicrobiana. A CIM permaneceu a mesma para o *S. mutans* e o *A. naeslundii*. Os valores do *S. aureus* voltaram aos resultados esperados de normalidade durante esse tempo. Em relação à CBM, não houve nenhuma alteração em todas as própolis estudadas.

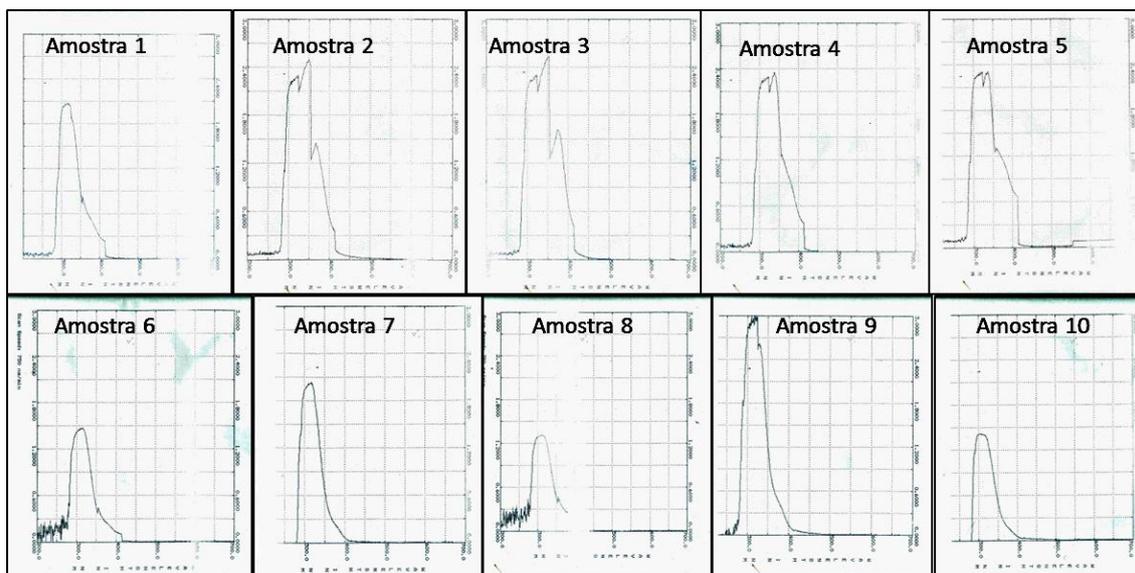
Tabela 6: Resultados do tempo 12 dos teores de flavonóides totais (mg/mL) e compostos fenólicos totais (mg/mL) e valores de CIM e CBM para os microrganismos *s. mutans*, *A. naeslundii* e *S. aureus* das amostras dos extratos de própolis.

Amostra	Fenólicos (µg/mL)	Flavonóides (µg/mL)	CIM (%)			CBM %		
			<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>S.aureus</i>
1	5,48 (±0.09)	0,73 (±0.03)	10	10	10	100	100	100
2	41,86 (±1.72)	4,98 (±1,28)	1	10	10	50	100	100
3	9,91 (±0.09)	4,6 (±3,51)	1	1	1	50	100	100
4	20,11 (±0.31)	2,38 (±0.23)	10	1	10	100	100	100
5	23,1 (±1.08)	1,51 (±0.07)	10	10	10	100	100	100
6	30,99 (±1.19)	2,42 (±0.13)	1	10	1	50	100	100
7	14,46 (±0.13)	1,56 (±0.30)	10	10	10	100	100	100
8	4,36 (±0.16)	0,79 (±0.03)	10	10	10	100	100	100
9	12,37 (±0.16)	3,1 (±0.06)	1	10	10	100	100	100
10	9,06 (±0.06)	0,99 (±0.01)	10	10	10	100	100	100

Valores entre parênteses expressam o Desvio Padrão da média (Flavonóides Totais e Compostos Fenólicos Totais).

Observando-se os perfis químicos obtidos por espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel (Figura 1), nota-se que não houve alteração qualitativa nos perfis das 10 amostras de própolis durante os 9 meses já estudados. Assim sendo, estão expressos neste relatório apenas uma imagem dos perfis químicos das amostras (Figura 1). Nota-se que todas as amostras apresentaram comprimento de onda máximo na faixa entre 310 e 360 nm, demonstrando que a principal classe de compostos presentes nas amostras são os compostos fenólicos, uma vez que esses compostos apresentam absorção na faixa entre 250 e 350 nm (Mabry, Markham, Thomas, 1970). As amostras 1, 6, 7, 8 e 10 apresentaram um perfil químico semelhante entre si, sendo diferente das amostras 2, 3, 4, 5 e 9, as quais foram semelhantes entre si.

Figura 1: Perfil químico obtido por espectrofotometria na região ultravioleta-visível das amostras de própolis produzidos em farmácias de manipulação.



6. DISCUSSÃO

Os testes de concentração de flavonóides total de fenólicos totais foram utilizados para avaliar a atividade das soluções em relação ao passado tempo justamente porque a legislação brasileira preconiza que o extrato da própolis disponível no comércio deve conter, no mínimo, 0,25% de flavonóides totais e 0,5% para fenólicos totais. (BRASIL, 2001) No entanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que logo no primeiro mês, 5 amostras já não se apresentavam de acordo com as normas da ANVISA, uma vez que elas apresentavam-se abaixo do que é tido como o mínimo para comercialização e uso. Após 1 ano de estudos observamos que 8 amostras passaram a não cumprir as exigências da legislação brasileira para comercialização, no entanto, essas 8 amostras continuaram apresentando propriedades antimicrobianas para os microrganismos testados.

Além disso, nota-se que o perfil químico das amostras do presente projeto não é semelhante a nenhum espectro dos 13 tipos de própolis brasileiras já descritas anteriormente (Park *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008). Acredita-se que essa diferença seja devido à presença de outras substâncias tais como cera, restos de abelhas durante a preparação dos extratos de própolis pelas empresas, o que não ocorre quando a própolis é preparada para fins científicos.

Os microrganismos testados durante o projeto são bactérias de grande interesse médico-odontológico e por isso foram selecionados para a avaliação da atividade antimicrobiana das soluções de própolis comercializadas na região central de Piracicaba.

Em relação à CIM de cada solução de própolis é nítido observar que todas apresentaram uma boa atividade antimicrobiana, sendo a própolis da farmácia 3 a que melhor apresentou atividade em relação a todos os microrganismos testados neste experimento (*Streptococcus mutans* UA159, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104.), tornando-se assim a melhor própolis presente para comercialização em Piracicaba, uma vez que passados o ano do experimento ela ainda apresentava-se dentro das normas da ANVISA e ainda apresentando uma excelente atividade antimicrobiana.

Além disso, a atividade biológica de 4 amostras, (amostras 2, 4, 6 e 9) para os microrganismos testados, foi reduzida. Sugere-se que a diminuição no teor de flavonóides seja o responsável pela diminuição da atividade da atividade biológica das 4 amostras. Os resultados inesperados apresentados nos tempos 6 e 9 podem ser explicados por conta do etanol volatilizado durante a abertura e fechamento dos frascos ao longo dos experimentos, uma vez que essas amostras não apresentavam o lacre correto de suas embalagens para que isso fosse evitado. Assim, mesmo não sendo um objetivo do projeto, foi verificado que a embalagem de armazenamento de algumas das soluções de própolis não é o adequado, pois não permite o uso de batoque para evitar que o álcool evapore, concentrando assim a amostra.

Portanto, os resultados desse trabalho levam a um questionamento da legislação brasileira, colocando em dúvida se estão adequadas às concentrações mínimas de flavonóides totais, exigidas para que a própolis possa ser comercializada, pois algumas amostras não apresentaram teor mínimo exigido para comercialização e mesmo assim, apresentaram atividade antimicrobiana, indicando que o teor de flavonóides presentes nas própolis ainda é suficiente para que o produto apresente atividade antimicrobiana.

Além disso, sabe-se que no Brasil, existem muitos tipos de própolis que não apresentam flavonóides em sua composição e mesmo assim, apresentam propriedades biológicas importantes, que poderiam motivar a sua

comercialização e exportação, como por exemplo, a própolis do tipo 6 da Bahia (DUARTE *et al.*, 2003).

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que após 12 meses de estudo as amostras de extratos de própolis produzidos por farmácias de manipulação em Piracicaba apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos estudados e, sofreram alterações quantitativas, mas não qualitativas em seu perfil químico, sendo que 8 delas passaram a não cumprir as exigências da legislação brasileira para comercialização após o período de armazenamento. No entanto, essas 8 amostras continuaram apresentando propriedades antimicrobianas para os microrganismos testados

REFERÊNCIAS

1. ALENCAR, S. M. Estudo fitoquímico da Origem Botânica da própolis e Avaliação da Composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de Diferentes regiões do Brasil. 2002. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
2. BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry*, Oxford, v. 28, n. 3, p. 871-873, Aug. 1989.
3. BANKOVA, V. S., CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, Paris, v. 31, n.1, p. 3-15, Jan/Feb. 2000.
4. BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, Pittsburgh, v. 61, n.7, p. 896-900, 1998.
5. BRASIL. Resolução - RE nº 560, de 29 de Julho de 2005, publicado no diário oficial de 03 de abril de 2002. Acessado em 01 de abril de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/560_02re.htm.

6. BRASIL. Lei 8078, de 11 de setembro de 1990. Acessado em 22 de abril de 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> .
7. BRASIL. Lei n.1283, de 18 de dezembro de 1950, publicado no diário oficial de 19 de dezembro de 1950. Acessado em 30 de março de 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm>.
8. BRASIL. Instrução normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001, publicado no diário oficial de 23 de janeiro de 2001. Acessado em 22 de abril de 2008. Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instrucoes_normativas.htm .
9. BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food and Chemical Toxicology, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, Apr. 1998.
10. CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. Nature Publishing Groups, Paris, v. 432, p. 829 – 837, Dec. 2004.
11. DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull, v.26. , n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.
12. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2ª edição, 1959. Oficializada pelo governo federal pelo decreto nº45502 de 27 de fevereiro de 1959.
13. FDA. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ds-econ2.html> . Acessado em 30 de março de 2003.
14. GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. Bee World, Benson, v.60, n. 2, p. 59-84, 1979.
15. GONÇALVES, L.S. 50 Anos de Abelhas Africanizadas no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 16, 2006, Aracaju, Anais...Aracaju,2006. 1 CD-ROM.
16. HAYACIBARA, M.F.; DUARTE, S.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. Effects of purified fractions of propolis on mutans streptococci and on glucosyltransferases. J.D.R. – v.81 – Issue A, March 2002. Abstract 2795.

17. HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 101, n. 3, p.371-376, Oct. 2005.
18. JURD, L. Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations. *Phytochemistry*, v.8, p. 445-462, 1969.
19. JURD, L. & GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J. Org. Chem*, v.21, p.1395-1401, 1956
20. KENKOSYOKUHIN KIKAKU KIJUN NO KOSHI. Standard of propolis as food. *Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição*, JUNE, pp. 8-10, 1994.
21. KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y.K.. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Cur. Microbiol.*, v.41, p. 192-196, 2000.
22. MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354p.
23. MANN, J.; DAVIDSON, S.; HOBBS, J.; BANTHORPE, D. Natural products: their chemistry and biological significance. Longmann: Harlow, 1994. 455 p.
24. MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Paris, v. 26, p. 83–99, 1995.
25. MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.
26. MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 74, n. 2, p. 105-112, Feb. 2001.
27. MATSUNO T, MATSUMOTO Y, SAITO M, MORIKAWA J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z Naturforsch C*. 1997 Sep-Oct;52(9-10):702-4.

28. NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. "Green propolis": unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. *Journal of Apicultural Research*, London, v. 42, n. 3, p. 39-41, 2003.
29. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*, Cambridge, v. 17, p. 215-234, 2000.
30. NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Current Cancer Drug Targets*, New York, v. 2, p. 279-308, 2002.
31. PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian própolis. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, no.9, p 2502-2506, 2002.
32. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; WANG, SH.K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K.H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletados em regiões do Brasil. *Mensagem Doce*, v.56, p.2-5, 2000.
33. PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Effects of propolis on *Streptococcus mutants*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 29, p. 143-148, 1998.
34. PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ABREU, J. A. S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, New York, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998.
35. PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R. M. S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321 -326, 2002.
36. PETERSON, J; DWYER, J. Flavonoids: Dietary, Occurrence and Biochemical Activity. *Nutrition Research*, New York, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.
37. PHILIPS I. A guide to sensitivity testing. Report of the working on antibiotic sensitivity testing of the British Society for Antimicrobial Chemoterapy. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 27(Suppl D): 1-50.

38. RICE-EVANS, C. Flavonoids and Isoflavonoids (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v.36, n.7, p.827-828, 2004.
39. SEBRAE. Informações de Mercado sobre Mel e derivados da Colméia. Relatório Completo. Brasília, 243p. 2006
40. SFORCIN JM, FERNANDES A JR, LOPES CA, BANKOVA V, FUNARI SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2000 Nov;73(1-2):243-9.
41. SILVA BB, ROSALEN PL, CURY JA, IKEGAKI M, SOUZA VC, ESTEVES A et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008; 5: 313-6.
42. SIMÕES, C.M.C; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: Da planta ao Medicamento*. 3 ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed. UFSC. Ed: UFRGS, 2001. 833P.
43. TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, Oxford, v. 34, n. 1, p. 191-196, Aug.1993.
44. URBACH, F.L. & TIMMICK, A. Spectrophotometric and spectrofluorometric study of flavonol-aluminum chelates in absolute ethyl alcohol. *Analytical Chem.*, v.40, n.8, p.1269-1272, 1968.
45. WOISKY, R.; SALATINO, A. Analysis of propolis : some parameters and producers for chemical quality control. *Journal Apicultural Research*, London, v.37, n.2, p 99-105, 1998.

PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – QUOTA INSTITUCIONAL UNICAMP

(quota de agosto de 2011 a julho de 2012)

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: FERNANDA MARIA MAZONI DOS REIS – RA 104912

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) PEDRO LUIZ ROSALEN

Projeto: Heterocontrole de soluções de própolis produzidas em farmácias da cidade de Piracicaba, SP, Brasil.

PARECER

A Iniciação Científica sem dúvida foi um excelente exercício para a formação profissional dando ao aluno a oportunidade de sedimentar conceitos e consequentemente maior responsabilidade como Cidadão.

Conclusão do Parecer:

**APROVAR (SIM)
REFORMULAR (NÃO)
REJEITAR (NÃO)**

Pró-Reitoria de Pesquisa, 24 de setembro de 2013.


Mirian Cristina Marcançola
PRP / PIBIC - Unicamp
Matr. 299062