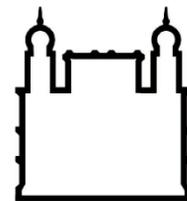




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
ANTIMICROBIANA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
OBTIDOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL OU POR EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA**

DANIELLE DEVEQUI GOMES NUNES

Salvador – Bahia

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
ANTIMICROBIANA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
OBTIDOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL OU POR EXTRAÇÃO
SUPERCRÍTICA**

DANIELLE DEVEQUI GOMES NUNES

Orientadora: Dr^a. Valéria de Matos Borges

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para obtenção do grau de
Mestre.

Salvador – Bahia

2019

**“COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTIMICROBIANA E LEISHMANICIDA
DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS OBTIDOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL OU POR
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA”.**

Danielle Devequi Gomes Nunes

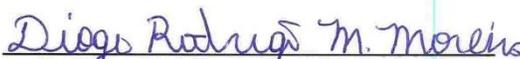
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 04 de julho de 2019.

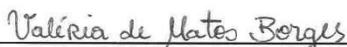
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ricardo Wagner Dias Portela
Professor
UFBA



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por ter me guiado até aqui, me dando forças quando pensei em desistir e abrindo meus caminhos para o futuro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minhas irmãs, por sempre estarem ao meu lado, buscando me abrir os olhos diante das decorrentes dúvidas pessoais, por todo apoio desde de o início, pela paciência, pelo amor e por sempre acreditarem em mim;

À minha orientadora, Dr^a. Valéria Borges, por todo carinho, dedicação e orientação;

À Msc Jéssica Rebouças, por toda ajuda, paciência, apoio técnico e orientação durante todo o período do trabalho;

À Msc Larissa Mendes, por todo apoio moral, me ajudando psicologicamente e emocionalmente, sempre com muito amor e paciência;

Aos Valerianos e a todos os estudantes e pesquisadores do LIB por tornarem o nosso laboratório um ambiente de trabalho amigável e próspero;

À equipe do SENAI-CIMATEC, que me receberam e me ajudaram desde da iniciação científica até a conclusão deste trabalho;

A Gabriel Mota por todo amor e apoio emocional, sempre disposto a me ouvir, me incentivando a concluir mais esta etapa;

Ao meu grupo de amigos, “mangue”, por estarem comigo desde 2011, sempre me motivando a enfrentar as dificuldades;

À equipe técnica da biblioteca por todo apoio na finalização do trabalho;

Às agências de fomento: CAPES E FAPESB, pelo financiamento.

Ao IMG-Fiocruz BA, por toda estrutura.

Por fim, agradeço ao mundo por mudar as coisas, nunca as fazer da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer.

NUNES, Danielle Devequi Gomes. Composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de própolis obtidos pelo método convencional ou por extração supercrítica. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A própolis é um produto natural com diversas atividades biológicas já descritas e seus extratos obtidos por variadas técnicas tem sido utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Variações na composição química dos extratos estão diretamente associadas ao tipo e origem geográfica da própolis e, conseqüentemente, interfere na atividade biológica da própolis. **OBJETIVO:** O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química e da atividade biológica de amostras de extrato de própolis: vermelha, verde e marrom, coletados no Estado da Bahia, Brasil, obtidas pelo método convencional ou pela técnica de extração supercrítica. **MATÉRIAL E MÉTODO:** Inicialmente identificamos o perfil físico-químico em amostras de extrato bruto, quanto ao teor de umidade, atividade de água, teor de cinzas totais, proteínas, lipídios e fibras. Os extratos de própolis obtidos pelos métodos de extração etanólico e supercrítico foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos, flavonóides, atividade antioxidante (DPPH), catequina, ácido ferúlico e luteolina. **RESULTADOS:** Nossos dados indicam que os extratos etanólicos, especialmente os obtidos a partir da própolis vermelha, possuem maiores teores de compostos antioxidantes, bem como melhor ação antimicrobiana contra duas cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), quando comparados com os extratos obtidos pela extração supercrítica, indicando que não houve um incremento dos parâmetros avaliados nesta condição. Por último, comparamos a ação leishmanicida dos extratos etanólico obtidos a partir das própolis verde e vermelha na infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania braziliensis*, principal agente etiológico da forma clínica cutânea da doença. Neste contexto, a própolis vermelha apresentou um maior potencial quanto ao efeito leishmanicida. **CONCLUSÃO:** Os resultados confirmam a influência do tipo de matéria-prima, bem como dos métodos de extração quanto a composição e atividade biológica dos diferentes extratos da própolis, incluindo sua utilização como agentes antimicrobiano e leishmanicida. O presente estudo contribui com novas perspectivas no intuito de possibilitar aplicações tecnológicas da própolis e seus derivados na indústria de produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: Propolis, Antioxidante, Propolis verde, Propolis vermelha, Leishmania.

NUNES, Danielle Devequi Gomes. Composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de própolis obtidos pelo método convencional ou por extração supercrítica. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019. (Chemical composition, antimicrobial, and leishmanicidal biological activity of propolis extracts applied by conventional method or by supercritical extraction)

ABSTRACT

INTRODUCTION: Propolis is a natural product with several biological activities already described and its extracts obtained by various techniques have been used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Variations in the chemical composition are directly associated to the type and geographic origin of the propolis, consequently, interferes in the biological activity of the propolis. **OBJECTIVE:** The aim of this work was to characterize the chemical and biological activity of samples of propolis extract: red, green and brown, collected in different regions of the State of Bahia, Brazil, obtained by the conventional method (ethanolic extraction) or the supercritical extraction technique. **MATERIALS AND METHODS:** First, we identified the physical-chemical profile of the raw samples, as for humidity content, water activity, total ash content, protein, lipids and fibers. The extracts of propolis obtained by the ethanolic and supercritical extraction were evaluated for the content of phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity (DPPH), catechin, ferulic acid and luteolin. **RESULTS:** The results demonstrated that ethanolic extracts, especially those obtained from red propolis, have higher antioxidant compounds, as well as a better antimicrobial activity against two strains of bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), when compared to the extracts obtained by supercritical extraction, indicating that there was no significant efficiency of the parameters evaluated in this condition. Finally, we compared the leishmanicidal action of ethanolic extracts obtained from green and red propolis on the in vitro infection of macrophages by *Leishmania braziliensis*, the main etiologic agent of the cutaneous clinical form of the disease. In this context, red propolis had a greater potential for leishmanicidal effect. **CONCLUSION:** The results confirm the influence of the raw material type as well as the extraction methods regarding the composition and biological activity of the different extracts of propolis, including their use as antimicrobial and leishmanicidal agents. The present study contributes with new perspectives in order to enable technological applications of propolis and its derivatives in the pharmaceutical products industry.

Key words: Propolis, Antioxidant, Green propolis, Red propolis, Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Própolis bruta verde - Barra do Choça (Vitória da Conquista) – Bahia 17
- Figura 2.** Própolis bruta vermelha - Canavieiras – Bahia 18
- Figura 3.** Própolis bruta marrom - Barra do Choça (Vitória da Conquista) – Bahia 20
- Figura 4.** Estágios do processo de extração convencional. 28
- Figura 5.** Diagrama de fases do CO₂ supercrítico. 30
- Figura 6.** Estágios do processo de extração supercrítica 31
- Figura 7.** Unidade de extração supercrítica. Equipamento piloto utilizado neste trabalho, SFT-110 32
- Figura 8.** Avaliação da citotoxicidade celular por Alamar Blue. Os dados representam a viabilidade de macrófagos não infectados tratados por 24 h com meio (Ctr) e com os extratos etanólicos de própolis verde e vermelha. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em quadruplicado para cada grupo experimental. Os dados são mostrados como a média +/- SD e são representativos de três experimentos. 48
- Figura 9.** Redução da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento com os extratos. Os parasitas foram incubados apenas com meio ou com os extratos de própolis etanólicos verde e vermelho por 5 dias. Os parasitas viáveis foram contados diariamente com a câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em quadruplicado para cada grupo experimental (*p <0,05 e **p <0,01). Os dados são mostrados como media + n SD e são representativos de duas experiências 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação do conteúdo de umidade, cinzas totais, proteínas totais, lipídios totais e atividade de água das amostras de própolis marrom, verde e vermelha. **42**
- Tabela 2.** Determinação do conteúdo de compostos fenólicos (mg /GA /g), flavonoides (EQmg / g) e atividade antioxidante por DPPH (IC₅₀) dos extratos de própolis obtidos por extração etanólica (ETOH) e extração supercrítica (SFE). **44**
- Tabela 3.** Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos de própolis obtidos por extração etanólica (ETOH) e extração supercrítica (SFE). **46**
- Tabela 4.** Determinação da concentração mínima inibitória - MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos extratos de diferentes amostras de própolis obtidos por extração etanólica (EtOH) e por extração supercrítica (SFE). **47**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ETOH Extração Etanólica

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

MIC Concentração Mínima Inibitória

SFE Extração com Fluido Supercrítico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A PRÓPOLIS	13
1.2 PRÓPOLIS VERDE, VERMELHA E MARRON.....	16
1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS	21
1.3.1 <i>Atividade Antioxidante</i>	21
1.3.2 <i>Atividade Antibacteriana</i>	23
1.4 EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS.....	27
1.4.1 <i>Extração Etanólica (Convencional)</i>	27
1.4.2 <i>Extração Supercrítica (Sfe – Supercritical Fluid Extraction)</i>	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVO GERAL	34
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E METÓDOS	35
4.1 MATERIAL E REAGENTES	35
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA	35
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL (ETANÓLICO)	35
4.4 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA POR TECNOLOGIA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	36
4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	36
4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	37
4.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICAL (DPPH).....	37
4.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	38
4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	39
4.10 PARASITOS E CAMUNDONGOS.....	39
4.11 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA	40
4.12 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS.....	40
4.13 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E VIABILIDADE INTRACELULAR DE L. (V.) BRAZILIENSIS TRATADOS COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA.....	41

4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRUTAS.....	42
5.2	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E SUPERCRÍTICOS.	43
5.3	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS CATEQUINA, ÁCIDO FERRÚLICO E LUTEOLINA POR HPLC	45
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	47
5.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS	49
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
8.	CONCLUSÃO FINAL	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	78
10.1	CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SIX DIFFERENT EXTRACTS OF PROPOLIS THROUGH CONVENTIONAL METHODS AND SUPERCRITICAL EXTRACTION.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PRÓPOLIS

A própolis é considerada um dos produtos naturais mais utilizados durante séculos pela humanidade. Seu uso já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito, por volta de 1700 a.c. a própolis, então denominada "cera negra", era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores. Na Idade Média foi utilizada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas e pelos Incas como um agente antipirético. A partir do século XVII, a própolis se tornou muito popular na Europa devido a sua atividade antibacteriana (TORETI et al., 2013). Atualmente, além do uso na medicina popular, a própolis é empregada em alimentos e cosméticos (PEREIRA et al., 2002).

A palavra própolis tem origem grega, onde "pró" quer dizer à frente, antes ou defesa e "pólis" significa cidade, dando alusão a defesa da colmeia. As abelhas (*Apis mellífera L.*) a utilizam para proteger a colmeia, reparar frestas, embalsamar a carcaça de invasores, reduzir as aberturas de acesso, evitando a entrada de predadores; revestir os alvéolos antes da postura da rainha, mantendo-os livres de agentes microbianos e patogênicos; evitando assim a contaminação por agentes patológicos e sua putrefação; funcionando também como isolante térmico (WAGH, 2013; APICULTURA, 2018).

A própolis é composta principalmente por resinas e exsudatos de plantas, substâncias gomosas e balsâmicas coletadas a partir de diferentes plantas e transformadas pelas abelhas. A resina coletada é então misturada com enzimas salivares e a este material é adicionada a cera de abelha completando o processo de formação da própolis (CUNHA et al., 2004; MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 2002). Pode também ser conhecida como cola de abelha, por possuir característica elástica, com consistência viscosa e suas cores podem variar desde o verde pardo, castanho, marrom claro ou escuro, negro, amarelado e até mesmo avermelhado; tem sabor

adstringente, acre, por vezes levemente amargo, com cheiro agradável e adocicado (APICULTURA, 2006; CATCHPOLE et al., 2004).

A composição química da própolis, bem como suas características já descritas, está relacionada com a ecologia das regiões visitadas pelas abelhas, e sofrem influência das regiões geográficas, condições climáticas, variedade genética da colmeia, fonte vegetal, época do ano da coleta e outras características fitogeográficas (BANKOVA et al., 1998; KUROPATNICKI et al., 2013).

De forma geral, a composição da própolis inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen, metabólitos secundários, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos, além de microelementos, tais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E, (ABU-MELLAL et al., 2012; PARK et al., 2002). Já foram identificados mais de 300 compostos em amostras diferentes, incluindo ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóides, chalconas) e terpenos, (β - esteróides, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados do estilbeno) (GREENAWAY et al., 1990; AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 1995).

As propriedades de interesse biológico e terapêutico dos compostos encontrados na própolis possuem efeitos benéficos reconhecidos e comprovados cientificamente para a saúde, tais como atividade antimicrobiana (ONG et al., 2017; PICOLI et al., 2016), anti-inflamatória (MOURA et al., 2011), antiparasitária (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2015; SENA-LOPES et al., 2018), cicatrizante (SOUZA et al., 2009) e antioxidante (FRANCHIN et al., 2017; FROZZA et al., 2013; BONAMIGO et al., 2017). Em termos de ação farmacológica, a classe de constituintes mais importante da própolis é a dos compostos fenólicos. (MARCUCCI et al., 1998).

Considerando a grande biodiversidade brasileira, foram encontrados diversos tipos de própolis em todo território nacional. Park e colaboradores (2002), realizaram um estudo no qual classificou a própolis brasileira em 15 grupos, usando como base as propriedades físico-químicas, a cor, a textura e a composição química, além da respectiva origem geográfica.

Por ser relacionada como um remédio popular e tradicional, atualmente essa matriz é amplamente utilizada em formulações cosméticas e produtos farmacêuticos. Encontram-se disponíveis em lojas de produtos naturais ou na internet. Uma quantidade relativamente grande de marcas e produtos feitos à base de própolis, tais como balas, chocolates, doces, shampoos, cremes para pele, soluções antissépticas, pastas de dentes, sabonetes e até mesmo produtos veterinários (LIMA, 2006; COSTA et al., 2013).

A própolis brasileira é bastante valorizada no mercado internacional, sendo que o Brasil se encontra em terceiro lugar no ranking mundial em termos de produção, ganhando importância comercial devido a sua grande variedade de tipos e de benefícios a saúde, já comprovados, uma vez que as condições climáticas, geográficas e as características da vegetação favorecem em produção (SALGUEIRO et al., 2016). A própolis de maior aceitação no mercado internacional é a de cor verde, aroma suave, textura consistente e com predominância de alecrim (*Baccharis sp.*). Segundo dados do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) (2014), o Japão importa 92% de toda própolis *in natura*, sendo considerado um dos grandes importadores da própolis brasileira. Os dados do SEBRAE também informam que o estado de Minas Gerais é o estado brasileiro de maior produção de própolis, sendo responsável por praticamente 70% da produção nacional.

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

Uma vez que a padronização dos extratos de própolis ainda é um desafio, estudos detalhados são extremamente necessários, principalmente em relação a sua

composição química, bem como as suas propriedades biológicas, no intuito de possibilitar maiores aplicações tecnológicas da própolis e seus derivados nos mais diversos setores comerciais.

1.2 PRÓPOLIS VERDE, VERMELHA E MARROM

A própolis verde é considerada a mais popular (**Figura 1**), mais estudada e aceita no mercado internacional, produzida no Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo. É oriunda da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), que lhe confere uma coloração esverdeada (BASTOS, 2001; PARK et al., 2002). Os principais componentes encontrados na própolis verde são os compostos prenilados e derivados do ácido cinâmico (artepelin C, ácido p-cumárico e drupanina), flavonoides, ácido benzoico, ácidos alifáticos e ésteres, além de alcanos e terpenoides (MARCUCCI & BANKOVA, 1999; PARK et al., 2002; BOGDANOV, 2012).

Muitas atividades biológicas importantes já foram conferidas a própolis verde, tais como atividade antioxidante, antitumoral, antiúlcera, imunomoduladora e antimicrobiana. O artepelin C é considerado o composto mais popular e importante relatado em estudos, quando se tratando de efeitos biológicos (HATA et al., 2012).

Estudos relatam a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos de própolis desde de 1980. Atualmente tem sido considerada como um antibiótico “natural” devido aos seus efeitos comprovados contra diversas linhagens de microrganismos. Dantas Silva e colaboradores (2017), relataram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis verde, vermelha e marrom contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Enterococcus sp*. utilizando a técnica de concentração mínima inibitória (MIC).

Sua ação imunomoduladora também foi descrita por Silva-Carvalho e colaboradores (2015), em modelos *in vivo* de inflamação aguda e crônica, utilizando extrato aquoso de própolis verde, observando que os extratos foram capazes de diminuir a inflamação e modular a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, evitando a amplificação da infecção por Leishmania. O potencial efeito leishmanicida de diferentes

extratos de própolis verde também foram testados por Rebouças-Silva e colaboradores (2017), demonstrando baixa citotoxicidade dos extratos estudados e exibindo um efeito dose-dependente na viabilidade de promastigotas, bem como no controle da carga parasitária na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*.

O efeito hepatoprotetor da própolis oriunda da Nigéria foi demonstrado em cultura celulares em modelos animais submetidos à hepatite. Foram relatados efeitos antitumorais tanto em cultura de células como modelos animais que tiveram um tecido carcinogênico implantado, demonstrando que compostos fenólicos são capazes de ser tóxicos contra células tumorais (BANSKOTA et al. 2001).



Figura 1. Própolis bruta verde - Barra do Choça (Vitória da Conquista) – Bahia

Fonte: Autoria própria.

A própolis vermelha (**Figura 2**) é considerada de descoberta relativamente nova e pouco estudada, encontrada nas colmeias localizadas ao longo do litoral e dos rios do Nordeste brasileiro, destacando-se os estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia (DAUGHSCH et al., 2007). Originada da planta *Dalbergia ecastophyllum*, espécie característica dos manguezais do Brasil, conhecida popularmente por rabo-de-bugio. Sua cor avermelhada ocorre devido aos pigmentos encontrados em seu exsudado, tais como retusapurpurina A e B. (BATISTA et al., 2012; FRANCHI et al., 2012).

Já foram identificaram 14 compostos na própolis vermelha, entre eles fenóis, triterpenoides, isoflavonas, benzofenonas preniladas e alguns componentes químicos foram determinados exclusivamente neste tipo de própolis, como a daidzeína, xantocimol, formonometina, neovestitol, vestitol, medicarpin, bioquanina A, liquiritigenina e isoliquiritigenina (BUENO-SILVA et al., 2017; ANDRADE et al., 2017).

É possível encontrar relatos na literatura que reportam seu potencial com ação antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, contra HIV (Human Immunodeficiency Virus) e até mesmo anticarcinogênica (HARISH et al., 1997; GEKKER et al., 2005; ONG et al., 2017; BONAMIGO et al., 2017).

Franchi Jr e colaboradores (2012), demonstraram *in vitro* que o extrato etanólico de própolis vermelha possui efeito citotóxico frente a diferentes células de leucemia humana, quando comparada ao extrato de própolis verde, se mostrando capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas. Seu potencial de auxílio na cicatrização de feridas foi testado por Jacob e colaboradores (2015), e foi comprovado que o extrato etanólico da própolis vermelha brasileira conferiu um efeito estimulatório na migração e proliferação de células de fibroblasto. Machado e colaboradores (2016), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e supercríticos de própolis vermelha, verde e marrom e demonstrou que todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento das cepas gram-positiva *Staphylococcus aureus* e gram-negativa *Escherichia coli*, no entanto, o extrato que apresentou melhores resultados foi o extrato etanólico da própolis vermelha. Confirmando assim seu grande potencial biológico.



Figura 2. Própolis bruta vermelha - Canavieiras – Bahia

Fonte: Aatoria própria.

A espécie vegetal *Copaifera langsdorffii* é a planta da qual se origina a própolis marrom (**Figura 3**) (SAWAYA et al., 2006; MACHADO et al., 2015). Existem estudos na literatura que exploram outros componentes desta espécie vegetal, tais como, o óleo-resina extraído do tronco, que pode ser utilizado, *in natura* como combustível para motores diesel, bem como na medicina popular como antisséptico, cicatrizante, expectorante, diurético, laxativo, estimulante, emoliente e tônico. Os principais ativos responsáveis pela atividade biológica são aos sesquiterpenos (mais de 50% da óleo-resina), diterpenos e ácidos terpênicos. Outro constituinte importante é ácido caurenóico, um diterpeno que possui estudos comprovados nas ações anti-inflamatórias, diurética e efeitos *in vivo* e antimicrobianos, relaxante muscular e ações citotóxicas *in vitro* (CAVALCANTI et al, 2006; PAIVA et al, 2002; COSTA-LOTUFO, 2002; PAIVA et al, 1998).

Em relação aos efeitos antimicrobianos, Picoli e colaboradores (2016), determinaram o tempo de ação necessário para eliminar microrganismos causadores de mastite bovina, avaliando a ação contra as cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, e demonstrou que os extratos hidroalcoólico de própolis marrom, oriunda do sul do Brasil, possui ação antimicrobiana, podendo ser utilizada na prevenção de mastite bovina.

Zaccaria e colaboradores (2017), investigaram os mecanismos base das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de extratos de própolis verde e marrom, avaliando os efeitos sobre os níveis de expressão de miRNAs, mRNAs e proteínas associadas ao estresse oxidativo e respostas inflamatórias em linhagens de células HaCat de queratinócitos humanos. Os resultados encontrados demonstraram que o extrato de própolis marrom induziu mudanças nos níveis de expressão de todos os miRNAs, e foi mais ativo que a própolis verde. Pimenta e colaboradores (2015), também afirmam que a própolis marrom brasileira possui efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*, patógeno capaz de comprometer a flora bucal.

Foi demonstrado por Santana e colaboradores (2014), que extratos de própolis marrom são capazes de inibir significativamente o crescimento de promastigotas de

Leishmania amazonensis, bem como, reduzir a infecção de macrófagos murinos e o número de amastigotas internalizados.



Figura 3. Própolis bruta marrom - Barra do Choça (Vitória da Conquista) – Bahia

Fonte: Autoria própria

Com o aumento da procura produtos naturais, seja para fins medicinais, cosméticos ou alimentícios, tipos de própolis de diversas origens vêm sendo estudados devido as ações biológicas comprovadas.

1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

A complexa composição química da própolis agrega à mesma, uma série de propriedades biológicas já descritas e comprovadas em diversos estudos. Diante deste cenário, a própolis tem se tornado motivo de intensos estudos, tanto farmacológicos quanto químicos, nos últimos anos. As principais atividades biológicas da própolis comprovadas são: antioxidante (PARK et al., 1998; KUMAZAWA et al., 2004; NAGAI et al., 2003); antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 1998; LU et al., 2005); anti-inflamatória (CAVENDISH et al., 2015; MACHADO et al., 2012); anti-HIV (GEKKER et al., 2005; ITO et al., 2001), antitumoral (KIMOTO et al., 1999), leishmanicida (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017) e antitripanossoma (REGUEIRA-NETO et al., 2018).

1.3.1 Atividade Antioxidante

Muitos processos metabólicos no organismo, produzem substâncias que são chamadas de radicais livres, e que podem causar vários efeitos deletérios quando produzido fora da normalidade. Dentre esses efeitos podemos citar, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, reumáticas, osteoporose, neoplasias e outros. (LIMA, 2006). Os compostos antioxidantes são capazes de retardar ou prevenir a oxidação e esta capacidade pode ser medida mediante alguns fatores como a reatividade com o agente doador de elétrons, o potencial em quelar metais de transição, a reatividade frente outros compostos antioxidantes e o destino do derivado do radical antioxidante (RICE-EVANS, 1997).

Os captadores de radicais livres no organismo, podem ter origem endógena (enzimática ou não-enzimática) e exógena. Os antioxidantes enzimáticos produzidos pelo organismo são as enzimas superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase. Os não-enzimáticos, GSH (glutaciona, reduzida), ácido dihidrolipóico e alguns peptídeos. Os antioxidantes de origem exógena são obtidos a partir da dieta alimentar, como vitamina E, vitamina C, β -caroteno e substâncias fenólicas (HIRATA, 2004; BARREIROS, et al., 2006).

A atividade antioxidante da própolis se deve principalmente à presença de compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e álcoois, estilbenos, tocoferóis e tocotrienóis). Os flavonóides podem ser divididos nos seguintes subgrupos: antocianinas, flavanas (catequina), flavononas, flavonas (luteonina), flavonóis e isoflavonóides. São capazes de diminuir a peroxidação lipídica, inibir a ativação de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos polinsaturados na ativação de mediadores, como a fosfolipase A2, cicloxigenase e lipoxigenase, combatendo os radicais livres (NAGAI et al., 2003; MARCUCCI et al., 1998).

Diversos métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante extracelularmente dos extratos, especialmente os métodos espectrofotométricos. Um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil – DPPH. O DPPH é um radical livre estável, de coloração púrpura, que possui um elétron livre sobre toda a molécula. Na presença de um antioxidante ou espécie radicalar (R^*), o DPPH é reduzido em difenil-picril-hidrazina, devido à doação de um átomo de hidrogênio, que estabiliza a molécula de DPPH resultando em uma coloração amarela e diminuindo sua absorbância (YEN et al., 1999).

É possível encontrar na literatura, estudos que comprovam o potencial antioxidante das diferentes própolis, extraídas por metodologias distintas, comprovando o potencial antioxidante contra células tumorais humanas de glioblastoma, ovário e cólon (de MENDONÇA et al., 2015), possuindo efeito também contra a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (VALENTE et al., 2011), podendo prevenir doenças ocasionadas pelos radicais livres (ROCHA et al., 2013; MOUHOUBI-TAFININE et al., 2017; ZABAIYOU et al., 2017).

1.3.2 Atividade Antibacteriana

As propriedades antimicrobianas da própolis têm sido intensamente estudadas, sendo considerada as atividades biológicas mais investigada. Acredita-se que o aumento pela busca por “antibióticos naturais”, se deu devido à crescente taxa de resistência desenvolvida pelos microrganismos patogênicos frente aos antibióticos tradicionais utilizados na medicina (GINZBURG et al., 2000). Com isso, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais, como a própolis e seus extratos, buscando encontrar compostos que possuam propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana (AMINIMOGHADAMFAROUJ et al., 2017).

Os compostos encontrados em abundância na própolis são os grandes responsáveis por seu potencial antibacteriano, dentre os quais poderemos citar: os flavonóides, ácidos fenólicos, ésteres, cetonas, aldeídos fenólicos. Pertencentes ao grupo dos flavonoides, a flavanona, flavonol e o éster feniletil, atuam na inibição da RNA-polimerase bacteriana. A quercetina, bem como, os ácidos fenólicos como os ácido cafeíco, ácido benzóico e ácido cinâmico, causam danos funcionais e estruturais na membrana ou parede celular do microrganismo. Acredita-se que tais substâncias, em sinergia, atuam na inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase), inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH-citocromo c-redutase) podendo afetar o transporte e capacidade de geração de energia por ATP de microrganismos (NEDJI et al., 2014; PICOLI et al., 2016).

Uma das primeiras investigações de atividade antibacteriana da própolis foi descrita por Kivalkina, nos anos 40, citado por Ghisalberti (1979) que mostrou o efeito bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* e o bacilo da tifoide. Desde então várias pesquisas foram realizadas para comprovar esta ação frente a outras cepas bacterianas. Yildirim e colaboradores (2004), pesquisaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos da própolis turca contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador de infecção tuberculósica. Nascimento e colaboradores (2013), avaliaram a atividade antimicrobiana da própolis, utilizando *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*, e foi demonstrada ação dos extratos de própolis frente a estas cepas. Yoshimasu e colaboradores (2018), avaliaram a ação antibacteriana de

extratos etanólicos de própolis contra cepa *Porphyromonas gingivalis*, um importante patógeno para doenças periodontais, demonstrando que os extratos induziram a morte das células de *P. gingivalis* aumentando a permeabilidade da membrana.

Os efeitos bactericidas/bacteriostáticos da própolis dependem da concentração dos extratos utilizados nos ensaios e sofrem influência pelo método de extração (PAVIANI et al., 2012). Tais efeitos podem acontecer via ação direta sobre os microrganismos ou através da estimulação do sistema imunitário (SFORCIN, 2007).

Scazzocchio e colaboradores (2006), estudaram a atividade antimicrobiana da própolis contra 263 cepas bacterianas de isolados clínicos sendo 140 *Staphylococcus* spp. (35 *S. aureus*, 63 *S. epidermidis*, 7 *S. hominis*, 18 *S. haemolyticus*, 10 *S. warnerii*, 4 *S. capitis*, 3 *S. auricularis*), 64 *Streptococcus* spp. (30 *S. viridans*, 15 *S. β -haemolyticus*, 19 *S. pneumoniae*) e 59 *Enterococcus faecalis*. Foi visto a ação antimicrobiana da própolis de duas formas: em sinergismo com os antibióticos ampicilina, gentamicina e estreptomicina, diminuindo a concentração inibitória mínima dos mesmos, e também como droga única de escolha.

Diversos estudos comprovam que a própolis possui efeito inibitório contra bactérias do tipo Gram-positivas - *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* sp. e *Micobacterium* sp.- e Gram-negativas - *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Klebsiella*- (CAMPOS et al.,2014; BARRIENTOS et al. 2013; NASCIMENTO et al. 2013; SILVA et al. 2017). É possível notar nos resultados encontrados na literatura, que a própolis apresenta um menor efeito contra bactérias Gram-negativas e os autores relatam que a estrutura em múltiplas camadas e maior teor de ácidos graxos na parede celular podem ser mais resistentes ao efeito da própolis (de KRAKER et al., 2011; BANKOVA et al., 1998; CHRISTOV et al., 1999).

1.2.3 Atividade Leishmanicida

As leishmanioses, são doenças negligenciadas ao redor do mundo, as quais que tem protozoários parasitos do gênero *Leishmania* como agentes etiológicos, associadas a países em desenvolvimento, de população pobre, que sofrem com a mal nutrição, moradias precárias e deficiência imunológica. Se trata de uma doença de grande importância em saúde pública no Brasil, devido à sua vasta distribuição por todo território nacional, ocorrência de formas clínicas graves e às dificuldades enfrentadas durante o diagnóstico e tratamento. *L. braziliensis* é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil, sendo capaz de causar lesões cutâneas e mucosas (KANSAL et al., 2012; PACE, 2014; WHO, 2012; SAVOIA, 2015).

O tratamento da leishmaniose é considerado complexo, sendo as drogas denominadas como de primeira e segunda escolha. Os antimoniais pentavalentes (Sb+5) são usados desde 1945. Como drogas de primeira escolha no tratamento, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania* e caso o tratamento não seja satisfatório, as drogas consideradas de segunda escolha são utilizadas, tais como: Anfotericina B e a Pentamidina (LIMA et al., 2007). As drogas utilizadas demonstram em torno de 90% de eficácia e apesar dessa alta porcentagem, existem relatos de que a eficácia pode ser considerada variável, uma vez que diversos fatores podem interferir, tais como, a espécie de *Leishmania*, sua região geográfica, a presença ou não de cepas resistentes e quais os esquemas terapêuticos empregados (WORTMANN et al. 2010; KAUR e RAJPUT, 2014; LLANOS-CUENTAS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2005).

As terapias disponíveis para o tratamento desta doença apresentam efeitos colaterais significativos que acabam se tornando limitações para o indivíduo afetado, tais como mialgia, artralgia, anorexia, febre e urticária, e uma toxicidade significativa para o fígado, rins baço, além da baixa eficácia e alto custo. (FRÉZARD et al., 2014; ZUCCA et al., 2013; KANSAL et al., 2012). Outro problema observado durante a aplicação da terapia são a taxa de recaídas, em que parasitos podem se tornar detectáveis após um tempo, nestas situações, podem não responder ao fármaco utilizado no primeiro tratamento (CARVALHO e FERREIRA, 2001).

A atividade da própolis contra diversos protozoários já foi demonstrada e pode ser encontrada por diversos autores na literatura. Higashi & de Castro (1994) demonstraram atividade da própolis extraída em etanol e em dimetilsulfóxido contra formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Dantas e colaboradores (2006), também demonstraram atividade da própolis búlgara contra *T. cruzi*.

Alguns autores demonstraram a atividade leishmanicida de diferentes própolis principalmente em extratos etanólicos, mas também em extratos aquosos e glicólicos em diferentes espécies de *Leishmania*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017; AYRES et al., 2007; PONTIN et al., 2008). A própolis atua diretamente sobre as formas promastigotas e amastigotas, capaz de ativar macrófagos e estimulando a produção de substâncias microbicidas, além de diminuir as lesões causadas pelo parasito, em experimentos *in vivo* (ODA et al., 2011). O extrato hidroalcoólico de própolis brasileira foi capaz de modular o efeito de macrófagos em matar os parasitas (*Leishmania braziliensis*), aumentando a produção do fator de necrose tumoral (TNF) em modelos *in vivo* (da SILVA et al., 2013).

Cunha (2017), concluíram que extrato hidroalcoólico da própolis verde (Cytopropolis®) possui efeitos inibitórios concentração-dependente sobre *L. amazonensis in vitro* e possui efeito leishmanicida nos estágios iniciais da infecção *in vivo*. Ferreira e colaboradores (2014), evidenciaram atividade do extrato aquoso da própolis verde brasileira contra *L. infantum in vivo*. Silva e colaboradores (2015), demonstraram que a própolis foi capaz de reduzir a inflamação causada pela *Leishmania amazonensis* no fígado de camundongos BALB/c, diminuindo os níveis de enzimas hepáticas, a deposição de fibras colágenas e produção de citocinas pró-inflamatórias e também revertendo a hepatoesplenomegalia. Miranda e colaboradores (2015), avaliaram a associação de óxido nítrico e própolis e demonstraram que esta combinação foi capaz de acelerar a reparação tecidual modular a migração celular, a produção de citocinas e até mesmo a deposição de colágeno.

Diante deste cenário, a própolis vem sendo estudada quanto à sua propriedade leishmanicida e representa um potencial alternativa para auxiliar no tratamento da leishmaniose

1.4 EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

O processo de extração de um biocomposto ativo ou uma matriz natural é de extrema importância para a obtenção de um produto final de qualidade. O tipo de método deve ser determinado baseado nos compostos que se deseja extrair, sabendo que é necessária uma extração com solventes de polaridade compatível com as características do fitocomposto de interesse. É importante levar em conta também como vai ser realizada a separação entre o solvente do soluto (composto) ao final da extração (ANDREO & JORGE, 2006). Além do solvente, outros fatores precisam ser analisados, pois pode influenciar durante o processo de extração, como: o tamanho de partícula, razão sólido-líquido, temperatura, tempo de extração, dentre outros (GALANAKIS et al., 2010).

A própolis é comumente extraída por diferentes métodos, tais como a maceração, que leva em torno de 10 dias para obtenção final dos extratos, a extração aquosa ou *Soxhlet*, infusão e extração etanólica, utilizando solvente orgânico. Novas metodologias estão sendo estudadas, com o objetivo diminuir o tempo de extração e melhorar a eficiência da técnica. A extração supercrítica é um método alternativo e inovador que visa a não utilização de solventes orgânicos, alta eficiência e menor tempo de extração. (BARROS et al., 2013; BISCAIA e FERREIRA, 2009; MACHADO et al., 2015)

1.4.1 *Extração Etanólica (Convencional)*

A extração etanólica denominada de convencional é o método mais utilizado para obtenção de extratos de própolis, diversos estudos são feitos e produtos comercializados utilizando este tipo de extração, que tem como maior desvantagem, a utilização de um solvente orgânico, o etanol. Esta metodologia, fornece compostos lipofílicos, que estão presentes em grandes quantidades e atrai um interesse considerável dos pesquisadores (MACHADO et al., 2015). Park e colaboradores (1998), avaliaram a extração utilizando água e a extração utilizando o etanol, e demonstrou que os extratos com 60 a 80% do solvente orgânico etanol tiveram os melhores resultados para extração de flavonoides da própolis.

O processo de extração etanólica é simples. Primeiramente a própolis bruta é triturada e em seguida o etanol é adicionado, em uma porcentagem pré-estabelecida previamente. A mistura é levada a um shaker (agitador) onde realmente ocorre a extração dos biocompostos de interesse. Em seguida toda a mistura é centrifugada para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante é homogeneizado e levado à secagem em estufa a temperatura aproximada de 50°C (PARK et al., 1998; SILVA et al. 2016). Na **Figura 4** é apresentada a sequência do processo de extração convencional (Etanólico).

A utilização de solventes orgânicos para extração de compostos com propriedades bioativas é complexa, devido a utilização de elevadas temperaturas que podem ser nocivas aos compostos por serem substâncias termolábeis e susceptíveis à oxidação, grande quantidade de solventes e longa duração, impossibilitando suas aplicações industriais (KONG et al., 2015). Apresentando uma grande desvantagem, a geração de resíduos tóxicos, que promove danos graves ao meio ambiente (SILVA et al., 2016).

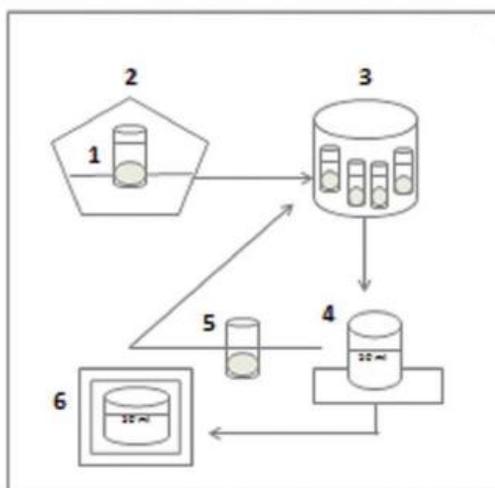


Figura 4. Estágios do Processo de Extração Convencional: 1 – Amostra de própolis em etanol; 2 – Extração em shaker; 3 – Centrifugação; 4 – Retirada do sobrenadante e centrifugação; 5 – Homogeneização do sobrenadante e secagem; 6 – Extrato de própolis.

Fonte: MACHADO et al., 2016.

1.4.2 *Extração Supercrítica (Sfe – Supercritical Fluid Extraction)*

A extração supercrítica foi desenvolvida em 1960 (LIN et al., 1999), mas foi no final da década de setenta que o processo foi implantado industrialmente na produção de café descafeinado (CASSEL et al., 2008). A extração supercrítica é uma tecnologia de extração inovadora que utiliza como solvente uma substância em seu estado supercrítico, visando o isolamento e obtenção de compostos a partir de matrizes naturais (AGHEL et al., 2004).

Com o avanço da tecnologia e busca por compostos naturais, a exemplo os antioxidantes, que são aplicados na área alimentícia, farmacêutica e cosmética, o número de pesquisas envolvendo à extração de substâncias com potencial biológico cresceu fortemente, e a extração supercrítica tem sido bastante utilizada para obtenção tanto de fragrâncias e aromas quanto de compostos biologicamente ativos a partir de matrizes vegetais (CAPUZZO et al., 2013).

Um fluido supercrítico se caracteriza ao se encontrar em condições acima da temperatura e pressão críticas em uma única fase. A partir do ponto crítico, não existe diferença entre a fase gasosa e a líquida, o fluido não é liquefeito com o aumento da pressão, nem transformado em gás pelo aumento da temperatura (SHIVONEN et al., 1999). O grande interesse por fluidos supercríticos também se deve as suas propriedades físico-químicas intermediárias àquelas dos líquidos ou dos gases, por exemplo, uma baixa viscosidade de um gás, um alto poder de solvatação de um líquido e uma difusão intermediária entre gases e líquidos, variando conforme densidade (CARRILHO et al., 2001; HAJIMIRSADEGHI, 2007; GOMES et al., 2007). Além disso, são considerados de fácil adaptação aos processos de separação, uma vez que a temperatura e pressão podem sofrer modificações, permitindo extração de diversos materiais instáveis como óleos e gorduras, compostos antioxidantes, e outros, em baixas temperaturas (BRUNNER, 2007). A **Figura 5** apresenta um diagrama de fases do CO₂ supercríticos.

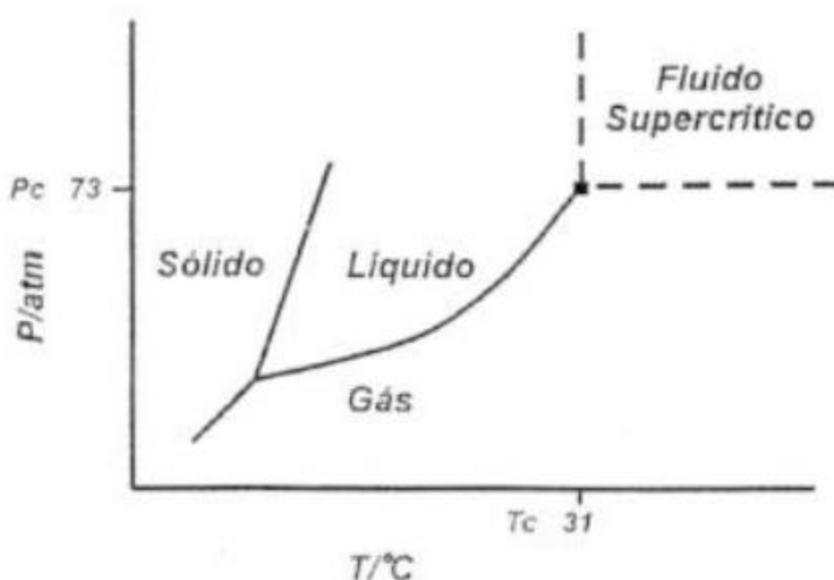


Figura 5. Diagrama de fases do CO₂ supercrítico.

Fonte: CARRILHO et al., 2001.

O fluido mais adotado como solvente e utilizado neste estudo é o dióxido de carbono (CO₂) devido às suas inúmeras vantagens: considerado não tóxico e não inflamável, possui parâmetros supercríticos de temperatura e pressão acessíveis (73,8 bar e 31,06 °C), facilmente encontrado em alta pureza e baixo custo. Após o final da extração, o CO₂, em condições de temperatura e pressão ambiente, é facilmente separado dos extratos, não havendo problemas quanto à sua eliminação para meio ambiente (REVERCHON e DE MARCO, 2006; CASSEL et al., 2008; ABBAS et al., 2008; STARMANS e NIJHUIS, 1996).

Por ser uma substância apolar, o CO₂, em geral apresenta facilidade em extrair/solubilizar compostos orgânicos apolares ou levemente polares, que apresentem baixo peso molecular, como monoterpenos e sesquiterpenos. Compostos polares e de maior peso molecular, como ácidos fenólicos e flavonóides, são razoavelmente solúveis, enquanto compostos altamente polares e de maior peso molecular, como açúcares, polissacarídeos, proteínas e taninos, dificilmente são solúveis no CO₂ supercrítico (TAYLOR, 1996; MUKHOPADHYAY, 2000). Sendo assim, a adição de um co-solvente ao fluido supercrítico se faz necessária, com objetivo de aumentar o poder de solvatação.

Co-solvente mais utilizado em processos de extração supercrítica é o etanol, o qual é capaz de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos funcionais polares (HAMBURGER et al., 2004; AZEVEDO et al., 2008).

O início do processo de extração ocorre quando o CO₂ sai do cilindro em direção à bomba, o solvente líquido é então comprimido para dentro da célula de extração até a pressão estabelecida. A célula de extração é acoplada dentro do forno onde a temperatura de operação pode ser controlada. O solvente fluido percorre a matéria-prima extraíndo os compostos e ao atingir a válvula de expansão sua pressão é reduzida até pressão ambiente, voltando à fase gasosa. Os compostos solúveis no fluido supercrítico precipitam no frasco de coleta e o solvente na fase gasosa passa por um rotâmetro e um totalímetro, onde sua vazão é quantificada. O leito de extração é composto por uma camada de lã de vidro em sua base, a matéria-prima triturada e dissolvida no co-solvente, e outra camada de lã de vidro por cima (BISCAIA E FERREIRA, 2009; MACHADO et al., 2015). A **Figura 6** apresenta o processo de extração com fluido supercrítico, enquanto que a **Figura 7** apresenta o equipamento utilizado nesse estudo.

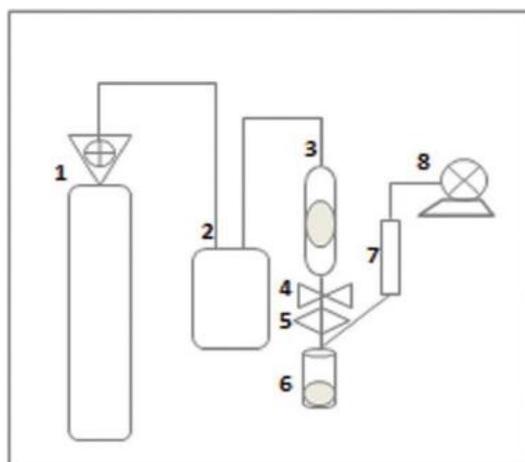


Figura 6 - Estágios do Processo de Extração Supercrítica: 1 – Cilindro de CO₂ com tubo pescador; 2 – Bomba de alta pressão; 3 – Célula de extração; 4 – Válvula dinâmica/estática; 5 – Válvula de restrição; 6 – Vial coletor de amostra; 7 – Medidor de fluxo; 8- Medidor de gás.

Fonte: MACHADO et al., 2016.



Figura 7 - Unidade de Extração Supercrítica. Equipamento piloto utilizado neste trabalho, SFT-110.

Fonte: Autoria própria.

O processo de extração utilizando fluidos supercríticos apresenta algumas vantagens e desvantagens quando comparados aos métodos considerados convencionais de extração. As principais vantagens são: a utilização de gases, forma mais vantajosa em relação a destilação para a extração de compostos termolábeis, devido a utilização de baixas temperaturas; a seletividade, que permite a extração de diferentes classes de composto e por ser um método considerado limpo, pela não utilização de solventes orgânicos. No entanto, trabalhos demonstram que a principal desvantagem deste tipo de extração é o baixo rendimento (CATCHPOLE et al., 2004; WANG et al., 2004; PAVIANI et al., 2012). Sem contar o alto preço do valor agregado da técnica e sua manutenção.

Vale ressaltar que os compostos obtidos por esta técnica de extração, utilizando CO₂, são reconhecidos como seguros (Generally Recognised as Safe – GRAS) para uso na produção de alimentos e medicamentos (GERALD & MAY, 2002), e com isso, novos estudos e aperfeiçoamentos são necessários.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente existe um grande interesse na obtenção de compostos naturais que apresentem atividades biológicas/funcionais e que possam ser aplicadas na indústria de alimentos, farmacêutica e aplicação para áreas de saúde. A própolis é um produto natural, com diversas atividades biológicas testadas e comprovadas tendo pelo menos 300 componentes diferentes identificados. A extração com solventes orgânicos apresenta baixos rendimentos nos teores dos compostos bioativos e se tornam um problema para o ambiente quando precisam ser descartados. Os processos de separação envolvendo o CO₂ supercrítico visam resolver alguns problemas, pois são processos alternativos e inovadores que buscam minimizar o impacto ambiental, pela diminuição de resíduos tóxicos e aproveitamento dos subprodutos. Tal tecnologia tem-se mostrado eficaz para aplicações em processos químicos, petroquímicos, farmacêuticos, ambientais e alimentícios, por ser considerada limpa e ter a capacidade de manter as propriedades antioxidantes dos extratos obtidos devido à utilização de baixas temperaturas, característica importante para as indústrias. Neste trabalho, realizamos a caracterização química e biológica dos extratos de própolis verde, marrom e vermelha, extraídos pelo método convencional e pela extração supercrítica.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de própolis obtidos pelo método convencional ou por extração supercrítica

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química da amostra bruta de própolis verde, marrom e vermelha (Umidade, atividade de água, proteínas, lipídeos totais, fibras, cinzas e minerais);
- Caracterizar os extratos obtidos quanto à capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides;
- Analisar e identificar compostos presentes nos extratos através de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos da própolis obtidos por extração supercrítica e extração convencional contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922;
- Avaliar o efeito citotóxico dos extratos obtidos por extração supercrítica e extração convencional sobre macrófagos;
- Avaliar o efeito dos extratos obtidos por extração supercrítica e extração convencional no controle da infecção de macrófagos por *L. (V.) braziliensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E REAGENTES

Para a obtenção dos extratos bioativos, foram utilizadas aproximadamente 1000g de própolis verde e marrom oriundo de Vitória da Conquista (Barra do Choça) e própolis vermelha de Canavieiras, Estado da Bahia, doadas pela empresa Apis Jordans. A amostra foi triturada em moinho (Cadence-Brasil), para a obtenção de um tamanho de partícula uniforme, aumentando a área superficial durante o processo de extração e promovendo maior homogeneidade do material. Em seguida foram acondicionados em tubos Falcon, protegidas com papel laminado e armazenadas em freezer a -10 °C até o momento da sua utilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA

A análise dos teores de umidade, proteína e cinzas totais foi realizada seguindo os métodos oficiais da Associação dos Químicos Agrícolas Oficiais (AOAC). O conteúdo de fibra foi obtido por meio de um analisador automático de fibras (A-220, ANKON, New York - USA) e foi baseado no modelo de Van-Soest e colaboradores (1967). A quantificação da atividade de água foi realizada utilizando-se um decágono LabMaster (Novasina, Lachen-Suíça), com uma célula eletrolítica CM-2 (25 ° C). Lipídeos totais foram extraídos e quantificados usando o método de extração a frio descrito por Bligh & Dyer (1959). Todas as análises foram executadas em triplicata.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA POR EXTRAÇÃO CONVENCIONAL (ETANÓLICO)

Os extratos etanólicos de própolis foram preparados a partir da adição de 15mL de etanol à 80% em 2 gramas de própolis triturada e homogeneizada (PARK et al., 2002). A extração foi realizada a 70 °C por 30 minutos e sob agitação constante em uma incubadora Shaker (MA 420/Marconi-Brasil) a 710-rpm. Após esta etapa, o extrato foi centrifugado (Centrifuge SIGMA 2-16 KL, EUA) a 8800rpm a 5°C por 10 minutos e o

sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio (15 x 160mm). Ao resíduo foi adicionado mais 10mL de etanol (80%), e a centrifugação foi repetida. Os sobrenadantes obtidos foram homogeneizados e mantidos em condições atmosféricas inertes (N₂) e a temperatura de 5 °C para evitar a degradação.

4.4 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA POR TECNOLOGIA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Para obtenção dos extratos de própolis, utilizou-se o extrator de fluido supercrítico SFT-110 (Supercritical Fluid Technologies, Inc. - USA). Para cada experimento, a célula extratora foi composta por 5 g de amostra de própolis triturada com 1% de co-solvente etanol (m / m), lã e pérolas de vidro. As condições de extração foram: pressão de 350 bar, temperatura de 50 °C, 1% de co-solvente (etanol m / m), fluxo de CO₂ de 6 g / min. O tempo de extração é de cerca de 60 minutos. No final da extração, os extratos coletados foram armazenados e cobertos em folha de alumínio e armazenados em condições atmosféricas inertes (N₂) para evitar a degradação. Os extratos foram mantidos a 5 ° C até o uso (PARK et al., 2002; MACHADO et al., 2015).

4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Woisky e Salatino (1998) usando ácido gálico como padrão. O etanol (95%) foi usado para dissolver os extratos, a fim de se obter uma concentração de 0,1 mg/mL. Em seguida, retirou-se 0,5 mL da alíquota do extrato e misturou-se com 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A solução foi colocada num banho com regulação térmica a 50 ° C durante 5 minutos (Marconi, M127, Brasil), e depois a absorbância foi medida num espectrofotômetro (Lambda 25 UV / vis Systems - Perkin Elmer, Washington, EUA) a 765 nm, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e volume de 3,5 mL. Os resultados das concentrações de compostos fenólicos totais foram comparados a uma curva padrão de ácido gálico (equivalentes de

ácido gálico) (mgGAE.g⁻¹) nas mesmas condições. Todas as análises foram executadas em triplicata.

4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação de flavonoides dos extratos foi realizada de acordo com o método colorimétrico do cloreto de alumínio (MARCUCCI et al., 2001). Inicialmente, 2,0 mL de cada extrato (0,5 mg/mL) foram transferidos para o tubo de ensaio e adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2%. As amostras foram homogeneizadas e deixadas sob o abrigo da luz por um período de 30 min. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro (Lambda 25 UV/vis Systems – PerkinElmer, Washington-USA) a 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas de padrão de quercetina para elaborar uma curva padrão. Além disso, uma amostra em branco foi preparada nas mesmas condições e a quantidade de teor de flavonóides foi expressa como equivalentes de quercetina (EQ) (mg EQ / g). Todas as análises foram executadas em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-RADICAL (DPPH)

A capacidade antioxidante dos extratos das própolis foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Yen and Wu (1999). Os extratos foram diluídos em cinco concentrações (90 - 190 µg/mL) em triplicatas. Em seguida, 1,0 mL de cada diluição foi transferido para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de solução etanólica de DPPH (0,004%). Após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, mediu-se a redução do radical livre DPPH lendo a absorbância em um espectrofotômetro (Lambda 25 UV / vis Systems - Perkin Elmer, Washington, EUA) a 517 nm. Uma amostra em branco foi preparada usando etanol.

A capacidade de sequestro dos radicais livres foi expressa como a percentagem de inibição de oxidação do radical e calculada de acordo com a **Equação 1**. Procedimento similar foi realizado substituindo a amostra de extrato por etanol, obtendo dessa forma o branco. O valor de EC₅₀ (concentração necessária do extrato para sequestrar 50% do radical DPPH) foi calculado através da equação de linha baseada

nas concentrações dos extratos e suas respectivas porcentagens de sequestro do radical DPPH.

% de sequestro = $100 - [(absorvância\ final\ da\ amostra \times 100) / absorvância\ em\ branco]$
(Equação 1)

4.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Para a identificação e quantificação dos compostos catequina, ácido trans-ferúlico e luteolina e a partir dos extratos de própolis, soluções de $10\ mg \cdot min^{-1}$ dos extratos foram obtidas nos diferentes métodos de extração e dissolvidas em etanol, em seguida colocadas em banho ultrassônico (TECNAL - São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Um filtro de membrana de celulose $0,45\ \mu m$ (Micropore) foi usado para filtrar as amostras, antes da injeção em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC). A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema HPLC EZChrom Elite, que consiste de uma bomba (VRW HITACHI L-2130), equipado com um injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD) (VRW HITACHI L-2455) e um forno (VRW HITACHI L-2300). O método utilizado para promover a separação cromatográfica foi adaptado de Dausch (2007) e Machado e colaboradores (2015). Uma coluna LiChroCART Purospher StaR[®] RP18-e ($75\ mm \times 4\ mm\ d.i.$) ($3\ \mu m$) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usada junto com uma pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 ($5\ \mu m$) da Merck. Os padrões analisados foram: Kampferide, Galato de Propila, Ácido Ferúlico, Ácido p-cumárico, Rutina, Formononetin, Artepelin C, Luteolina e Catequina fornecidos pelo SENAI.

As condições de análise foram realizadas com um gradiente de eluição utilizando uma fase móvel de ácido acético a 5% (fase aquosa) e metanol (fase orgânica) em diferentes concentrações e o tempo total da análise foi de 70 minutos. O volume de injeção foi de $10\ \mu L$ e a aquisição cromatográfica foi definida em 290 nm (DAD). Para garantir a confiabilidade dos resultados, foi realizada a validação segundo as metodologias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Esta etapa foi realizada de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e limites de quantificação.

4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) e Koo e colaboradores (2000), através da determinação da MIC (Minimum Inhibitory Concentration) frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As amostras bacterianas, obtidas de estoques congelados a -20 °C, foram semeadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica (Thermo 212 Scientific, Massachusetts, EUA) a 37 °C por 24h, sendo, em seguida, cultivadas em placas BHI ágar, para preparação do inóculo.

O inóculo inicial foi de $1-2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ diluído em meio BHI e a concentração do extrato variou de 3,1 a 1600µg.mL⁻¹, com o objetivo de determinar a MIC. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram observados após a adição de 40 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) e reincubadas a 36 °C por 2h. Coloração azul nas microplacas não mostraram crescimento dos microrganismos investigados enquanto a coloração rosa evidenciava crescimento bacteriano. A análise foi definida como a concentração mínima de um extrato com a capacidade de inibir o crescimento bacteriano (KOO et al., 2000).

4.10 PARASITOS E CAMUNDONGOS

Neste estudo, foi utilizada a cepa de *Leishmania Viannia braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788). As formas promastigotas foram cultivadas a 24°C, em meio Schneider (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 100 U/mL de penicilina, estreptomicina e glutamina (todos da Gibco). Os camundongos machos BALB/c (*Mus musculus*), foram obtidos do Biotério do Instituto Gonçalo Muniz (IGM/FIOCRUZ) e mantidos em condições livre de patógenos, procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética Animal do IGM/FIOCRUZ – protocolo 015/2015.

4.11 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Macrófagos derivados de medula óssea foram isolados através da lavagem do compartimento interno do fêmur e tíbia de camundongos BALB/c. Após a eutanásia, o abdômen e as patas do camundongo foram lavados com álcool 70%. Realizou-se uma incisão na linha média do abdômen e a pele foi puxada, expondo o músculo das patas posteriores. As patas foram removidas com tesoura cirúrgica e a tíbia e o fêmur de cada pata foram dissecados. Os ossos foram lavados com álcool 70% e realizou-se a lavagem interna do fêmur e tíbia com meio RPMI. As células obtidas foram cultivadas a 37°C, 5% CO₂, em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 20% de sobrenadante de fibroblastos L929 e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina-glutamina (todos da Gibco).

4.12 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS.

Macrófagos murinos (2×10^5 /poço) derivados de medula não infectados foram então tratados com os extratos de própolis em concentrações variadas (5,10,20, 40,80 e 160 µg / mL) a 37 °C por 48 h. Em seguida, as células foram reincubadas por mais 4 horas com meio suplementado com RPMI contendo 10% de Alamar Blue. A absorbância do reagente foi lida a 570 nm e 600 nm usando um espectrofotômetro (SPECTRA Max 190). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo.

4.13 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E VIABILIDADE INTRACELULAR DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* TRATADOS COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA.

A avaliação da viabilidade das promastigotas recuperadas em macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis in vitro* foi realizada infectando-se por 24h macrófagos murinos derivados de medula (10^5 /poço) com promastigotas em fase estacionária na proporção 10:1 (parasito: macrófago). Após 24h de infecção, os macrófagos infectados, cultivados em meio RPMI suplementado, foram lavados com salina, para retirada dos parasitos não internalizados, e tratados com os extratos nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 10, 5 μ g por 48h, à 37°C e 5% de CO₂. A anfotericina B (250 ng/mL), foi utilizada como controle positivo. Em seguida, o meio celular foi substituído por meio Schneider suplementado e a placa foi incubada por seis dias em estufa B.O.D à 24°C. Após seis dias de troca de meio, foi realizada a contagem dos promastigotas viáveis no sobrenadante por microscopia óptica utilizando-se Câmara de Neubauer.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa Statistica16.0 da StatSoft (Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos resultados e para identificar diferenças significativas entre as médias. O teste ANOVA one-way foi utilizado para identificar as diferenças entre as concentrações de compostos fenólicos, flavonóides, atividade antioxidante e a concentração dos compostos por HPLC nos extratos obtidos através dos dois métodos de extração para as três amostras de própolis (verde, vermelho e marrom), mínimo de 3 repetições. Além disso, o mesmo teste foi aplicado para avaliar as diferenças entre as análises de caracterização das amostras de própolis bruta. Em todos os procedimentos estatísticos, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Em relação aos resultados da infecção, foi utilizado o GraphPad Prism Software 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para as análises. Para experimento *in vitro* utilizando células, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas. A análise ad hoc de tendência linear foi utilizada para avaliar a significância estatística entre os grupos, considerada quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRUTAS.

Os resultados da caracterização físico-químico dos três diferentes extratos de própolis (verde, vermelha e marrom) são encontrados na **Tabela 1**. Diferenças significativas foram encontradas nas análises de umidade, atividade da água e lipídios. A própolis marrom mostrou um valor da umidade de 8,03%, ligeiramente fora do padrão exigido (um máximo de 8%) (PAULINO et al., 2008), diferente dos resultados para a própolis verde e vermelha, que demonstraram estar dentro do padrão.

Em relação à atividade da água, as amostras apresentaram um valor de 0,765% para vermelha, 0,803% para verde e 0,876% para a própolis marrom. Nos resultados para a análise de cinzas totais, as amostras demonstraram valores similares e se encontram de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (máximo de 5%). (ANVISA). Os valores de proteínas totais, lipídeos e fibras não demonstraram diferenças significativas entre as amostras.

Tabela 1. Determinação do teor de umidade, atividade da água, cinzas totais, proteína totais, lipídeos totais e fibras de amostras de própolis marrom, verde e vermelha.

Amostras	Umidade (%)	Atividade de água (%)	Cinzas Totais (%)	Proteínas Totais (%)	Lípidos (%)	Fibra (%)
Marrom	8,03±0,12 ^a	0,876±0,006 ^a	1,35±0,19 ^a	2,49±0,08 ^a	11,04±0,12 ^b	70,82±5,91 ^a
Verde	6,30±0,30 ^b	0,803±0,003 ^b	1,44±0,10 ^a	2,31±0,08 ^a	8,19 ±0,64 ^c	70,02±6,86 ^a
Vermelha	7,64±0,12 ^a	0,765±0,003 ^c	1,43±0,05 ^a	2,12±0,09 ^a	15,61±1,01 ^a	68,72±2,89 ^a

Valores com a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) através do teste Tukey em um nível de confiança de 95%.

5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOÍDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E SUPERCRÍTICOS.

As principais classes químicas presentes na própolis são os flavonóides, os fenóis e compostos aromáticos, sendo assim, suas determinações são extremamente importantes. Os resultados para a análise de fenólicos, flavonóides e capacidade antioxidante dos extratos de própolis verde, vermelha e marrom obtidos através de métodos convencionais (etanol) e extração supercrítica são encontradas na **Tabela 2**.

O teor de compostos fenólicos variou de $113.41 \pm 0,01$ (Marrom SFE) para 481.59 ± 0.02 mg EAG/g (Vermelha EtOH), enquanto o teor de flavonóides variou de $29.67 \pm 0,01$ (Marrom EtOH) a $186.96 \pm 0,01$ mg EQ/g (Vermelha EtOH), entre outras amostras, já a capacidade antioxidante variou de $371.12 \pm 0,01$ (Marrom SFE) a 89.90 ± 0.02 (Vermelha EtOH) (IC_{50}).

Os resultados mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) para os extratos analisados ao comparar o método de extração para a mesma amostra, bem como para os extratos obtidos pelo mesmo método e amostras diferentes.

Tabela 2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonóides (mg EQ/g) e da atividade antioxidante por DPPH (EC₅₀) de extratos de três diferentes amostras obtidas por extração etanólica (EtOH) e supercrítica (SFE).

Amostras	Compostos Fenólicos (mg EAG/g)	Flavonóides (mg EQ/g)	DPPH (EC₅₀)
Marrom EtOH	249,28±0,01 ^a	29,67±0,01 ^a	159,74±0,03 ^a
Marrom SFE	113,41±0,01 ^b	102,02±0,01 ^b	371,12±0,01 ^b
Verde EtOH	374,10±0,01 ^c	131,69±0,01 ^c	133,25±0,02 ^c
Verde SFE	174,31±0,02 ^d	96,86±0,01 ^d	263,92±0,02 ^d
Vermelha EtOH	481,59±0,02 ^e	186,96±0,01 ^e	89,90±0,02 ^e
Vermelha SFE	171,33±0,01 ^d	103,30±0,09 ^b	141,81±0,01 ^f

EtOH – Extrato obtido por extração etanólica; SFE: Extrato obtido por extração supercrítica; IC₅₀: Valores baixos de IC₅₀ indicam uma atividade maior de eliminação radical. Valores com a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p <0,05) usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95%

5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS CATEQUINA, ÁCIDO FERRÚLICO E LUTEOLINA POR HPLC

Os resultados da análise quantitativa de catequina (polifenol), ácido ferrúlico/análogo (ácido aromático) e luteolina (flavonóides) estão demonstrados na Tabela 3.

Os três compostos mencionados acima foram encontrados nos extratos etanólicos de própolis marrom e verdes em diferentes concentrações. Apenas ácido Trans ferrúlico foi encontrado na amostra de própolis vermelha extraída pelo método convencional. O teor de catequina variou de 49,39 (Marrom EtOH) a 76,70 (Verde EtOH) mg/g. A quantidade de ácido Trans ferrúlico variou de 0,109 (Marrom EtOH) a 0,60 (Vermelha EtOH), enquanto o composto luteolina variou de 4,25 (Verde EtOH) a 5,24 (Marrom EtOH). Os compostos investigados não foram encontrados nos extratos de própolis obtidos por extração supercrítica.

Tabela 3. Quantificação de catequina, ácido trans ferrúico e luteolina nos extratos de própolis marrom, verde e vermelha obtidos por extração etanólica (EtOH) e supercrítica (SFE).

Amostras	Catequina (mg/g)	Ácido trans ferrúico (mg/g)	Luteolina (mg/g)
Marrom EtOH	49.39	0.10	5.24
Marrom SFE	<LD	<LD	<LD
Verde EtOH	76.70	0.50	4.25
Verde SFE	<LD	<LD	<LD
Vermelha EtOH	<LD	0.60	<LD
Vermelha SFE	<LD	<LD	<LD

EtOH – Extratos obtidos por extração etanólica; SFE – Extratos obtidos por extração supercrítica (CO₂ como fluido supercrítico); < LD: abaixo do nível de detecção.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Os resultados da determinação da concentração mínima inibitória (MIC) para os extratos de própolis marrom, verde e vermelha, extraídas pelos dois métodos utilizados, etanólicos e supercríticos são encontrados na **Tabela 5**. Observou-se que todos os extratos demonstraram atividade contra bactérias gram-positivas *S. aureus* (ATCC 29213) e bactérias Gram-negativas *E. coli* (ATCC 25922). A MIC para *S. aureus* variou de 200 a 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para *E. coli*, a variação foi de 400 a 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5). Não encontramos diferença entre a ação antimicrobiana dos extratos etanólicos ou supercríticos.

Tabela 4. Determinação da concentração mínima inibitória - MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos extratos de diferentes amostras de própolis obtidos por extração etanólica (EtOH) e por extração supercrítica (SFE).

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Marrom EtOH	800-400	1600-800
Marrom SFE	1600-800	1600
Verde EtOH	400-200	1600-400
Verde SFE	800-400	1600
Vermelha EtOH	200	400
Vermelha SFE	400	800

5.5 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS SOBRE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS

Sabendo que os macrófagos são a principal defesa das células hospedeiras dos mamíferos contra a infecção por *Leishmania* (LIU, 2012), avaliamos a viabilidade dos macrófagos na presença dos extratos de própolis. Levando em consideração os resultados encontrados neste estudo, os extratos etanólicos das própolis verde e vermelha foram utilizados nos experimentos a seguir.

De acordo com os resultados encontrados (Figura. 8), a viabilidade celular não foi afetada nas concentrações entre 5 a 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos extratos etanólico de própolis verde e vermelha testados. Ambos os extratos foram tóxicos a partir da concentração de 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, medida pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue. Não foi possível avaliar a citotoxicidade em relação aos extratos supercríticos devido a problemas técnicos ao longo do trabalho.

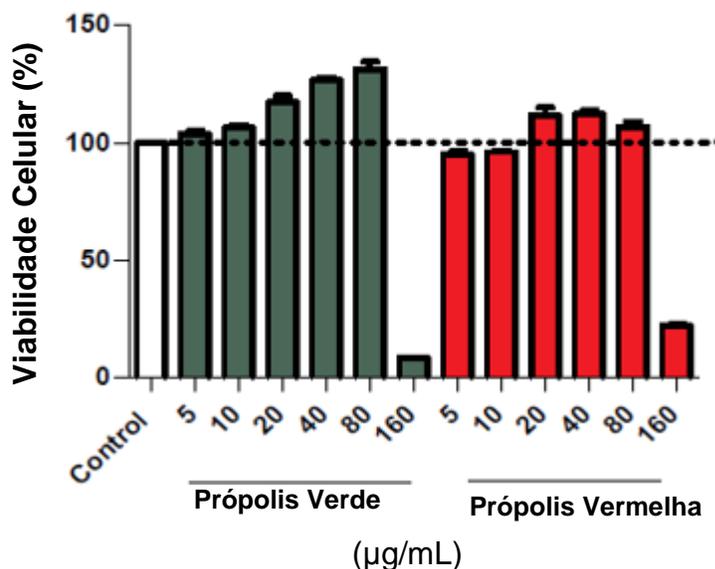


Figura 8. Avaliação da citotoxicidade celular por Alamar Blue. Os dados representam a viabilidade de macrófagos não infectados tratados por 48h com meio (Ctr) e com os extratos etanólicos de própolis verde e vermelha. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes para cada grupo experimental. Os dados são mostrados como a média \pm SD e são representativos de três experimentos.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS

Uma vez estabelecida as concentrações não tóxicas para os macrófagos não infectados, avaliamos se a exposição ao extrato de própolis reduz a viabilidade intracelular de *Leishmania (V.) braziliensis*. O efeito leishmanicida dos dois extratos etanólicos (verde e vermelho) da própolis foi avaliado em macrófagos BALB / c infectados com *L. (V.) braziliensis*. Ambos os extratos de própolis demonstraram reduzir a carga de maneira dose-dependente (Figura 9).

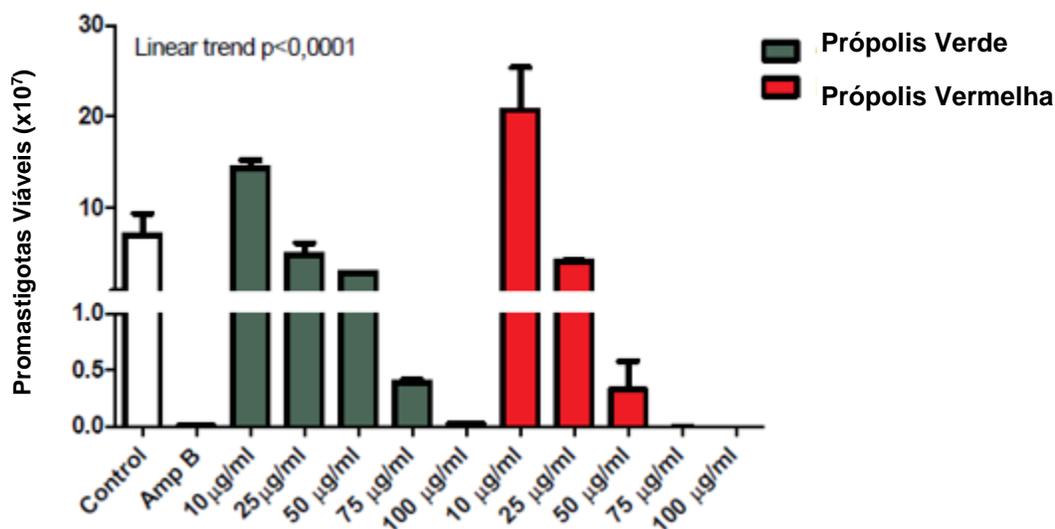


Figura 9. Redução da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento com os extratos. Os parasitas foram incubados apenas com meio ou com os extratos de própolis etanólicos verde e vermelho por 48 horas. Os parasitas viáveis foram contados com a câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em quadruplicado para cada grupo experimental (*p < 0,05 e **p < 0,01). Os dados são mostrados como média + n SD e são representativos de duas experiências

6. DISCUSSÃO

Atualmente, o interesse por produtos naturais vem crescendo, principalmente compostos que apresentem atividades biológicas/funcionais comprovadas e que tenham aplicabilidade em diversas áreas, na busca pela substituição dos produtos sintéticos. A própolis é um produto natural de alta produção no Brasil, com efeitos benéficos à saúde comprovados na literatura. A análise da composição físico-química é extremamente importante para determinar a qualidade do material em questão, uma vez que se tem interesse em utilizar este produto para fins comerciais com aplicação nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêuticas.

A fim de caracterizar as amostras de própolis bruta, das três variedades estudadas, foram realizadas: análises de umidade, atividade de água, cinzas totais, proteínas, lipídeos e fibras (Tabela 1). Nos resultados que se referem a umidade e atividade de água, é importante notar que, os valores concordam entre si, onde as amostras com maior umidade mostraram maior atividade de água. Por se tratar de um produto que vem sendo utilizado como alimento funcional ou aditivo a outros produtos, os parâmetros de umidade e atividade de água são necessários. O teor de umidade nos informa a quantidade de água total contida em um alimento, permitindo a determinação da qualidade do mesmo, sua estabilidade e sua conformidade com o padrão estabelecido. Já a atividade de água define a água disponível no alimento que pode reagir com microrganismos e reações enzimáticas, importante medida na conservação de alimentos (LEWICKI, 2004).

A determinação do teor de cinzas totais é importante, uma vez que amostras de própolis podem ser comercializadas em formato de pó, onde esta análise auxilia a identificação de possíveis adulterações (BANKOVA et al., 2000). Neste estudo os resultados não apresentaram diferença significativa, demonstrando um percentual pouco abaixo do encontrado na literatura por Machado e colaboradores (2016).

Segundo Bogdanov (2017), o a porcentagem de proteína que demonstra qualidade da amostra de própolis precisa estar acima de 0,7%. Com isso, as amostras

de própolis analisadas neste estudo foram consideradas de qualidade e apresentando percentuais superiores ao encontrado na literatura.

Os resultados para a análise de lipídeos mostraram que a própolis vermelha foi 47,54% e 29,27% mais lipídica em comparação com as variedades marrom e verde, respectivamente. Valores abaixo dos encontrados por Machado e colaboradores (2016), para a própolis vermelha (65,74%) proveniente de Sergipe. Os resultados de fibras não demonstraram diferença significativa, estando de acordo com o encontrado na literatura por Machado et colaboradores (2016).

Diversas são as maneiras como a própolis bruta e/ou os extratos da própolis podem ser utilizados, sendo suas aplicações, em sua maioria, nas indústrias alimentícia e farmacêutica. As suas aplicações nessas áreas estão relacionadas, principalmente, as suas propriedades biológicas já testadas e comprovadas na literatura e atualmente sabe-se que alguns aspectos, como a qualidade e composição das amostras, estão relacionados com a técnica de extração empregada no processo de obtenção do respectivo extrato (TORETI et al., 2013; MONROY et al., 2018). As variações identificadas entre as amostras já eram esperadas, considerando que própolis de diferentes tipos exibem perfis químicos muito diferentes (KUJUMGIEV et al., 1999; DE LIMA et al., 2016). É possível associar tais variações com as várias origens botânicas e geográficas, o que causa uma diferença significativa nos teores de polifenóis, flavonóides e componentes ativos nas diversas própolis encontradas na literatura (Serra Bonvehí e Ventura., 2000).

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que a composição química e, conseqüentemente, as características dos extratos tem relação com o tipo de própolis (origem botânica), método de extração utilizado e o tipo de solvente envolvido no processo, corroborando com dados encontrados na literatura. (DE LIMA et al., 2016). Os resultados apresentados na **Tabela 2** demonstram a importância do método de extração na composição do extrato e ao comparar os valores, é possível notar uma diferença significativa ($p < 0,05$), para as análises realizadas (compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante), onde a extração etanólica apresentou melhores resultados para as amostras de mesmo tipo, bem como para as amostras de diferentes

tipos. Na literatura é possível encontrar resultados semelhantes onde as maiores concentrações de compostos antioxidantes foram encontradas nos extratos etanólicos, como o encontrado por Zordi e colaboradores (2014), ao analisar própolis italianas, comparando as com os extratos obtidos pelo processo de extração supercrítica sob diferentes condições. Valores mais elevados de fenóis totais e flavonóides também foram encontrados em extratos etanólicos, em relação aos extratos supercríticos, amostras de própolis brasileira (MACHADO et al., 2016; DANTAS SILVA et al., 2017).

Apesar de ser um solvente orgânico, o etanol é o solvente mais utilizado nos diferentes processos de extração de própolis ao redor do mundo, escolhido principalmente devido à afinidade de suas características químicas com a matriz da própolis. Segundo Biscaia e colaboradores (2009), baixas concentrações de ácidos fenólicos, fenólicos e atividade antioxidante foram mostradas nos extratos obtidos por extração supercrítica e podem justificadas pela existência de substâncias indesejáveis como resina, cera e outros materiais presentes na própolis em altas concentrações. A cera e outros resíduos orgânicos são removidos durante o processo de extração etanólica.

A extração supercrítica é uma tecnologia de extração inovadora que utiliza como solvente uma substância em seu estado supercrítico, sendo uma alternativa aos processos convencionais (WU et al., 2009; CHEN et al., 2009; PAVIANI et al., 2012; TYSKIEWICZ et al., 2018; CIKOŠ et al., 2018). Embora alguns estudos mostrem vantagens no uso desta técnica para obtenção de extratos ecologicamente limpos e com maior potencial biotecnológico, neste presente estudo a extração convencional demonstrou ser mais eficiente. A maioria dos compostos fenólicos polares é praticamente insolúvel em CO₂ puro, mas é suficientemente solúvel em uma mistura de CO₂ + etanol ou em uma mistura de CO₂ + etanol + água, permitindo sua separação com base em pesos moleculares e polaridade. Monroy e colaboradores (2018), usaram a própolis verde do sudeste do Brasil para obter extratos concentrados de compostos fenólicos usando dióxido de carbono supercrítico como anti-solvente para fracionar seletivamente os extratos etanólico e hidroalcoólico da própolis verde por precipitação em quatro separadores em série.

Os principais compostos encontrados na própolis são os compostos flavonóides, fenólicos e aromáticos, agregando uma capacidade biológica aos extratos. Para as principais análises, a extração etanólica obteve os melhores resultados. A extração etanólica da própolis vermelha apresentou 48% mais compostos fenólicos em comparação com a própolis marrom e 23,89% mais do que a variedade verde. Comparando os valores referentes as extrações supercríticas em relação aos compostos fenólicos, a própolis verde rendeu 1,7% a mais em relação à própolis vermelha e 34,9% a mais que a própolis marrom.

Os resultados encontrados nas amostras analisadas demonstraram 70,9% mais compostos fenólicos quando comparados com cinco amostras de própolis verde da Paraíba (Brasil) e cinco amostras de Minas Gerais (Brasil) analisadas por Tei e colaboradores (2008). Frozza e colaboradores (2013), demonstraram 68,53% menos compostos fenólicos para própolis vermelha e Machado e colaboradores (2016), 13,61% menos para a própolis marrom do Paraná (Brasil) extraída pelo método de extração com fluido supercrítico. AL-Ani e colaboradores (2018), avaliaram três própolis de diferentes origens (Irlanda, Alemanha e República Checa) e seu maior resultado demonstrou 26,9% menos compostos fenólicos quando comparado com a própolis vermelha avaliada neste estudo, ambos extratos obtidos por extração etanólica.

Quanto à análise de flavonóides, a própolis vermelha apresentou uma diferença de 84,13% mais flavonóides em relação à própolis marrom e 29,56% a mais que a variedade verde, todos os extratos obtidos pelo mesmo método (etanólico). Comparando os resultados em relação a extração supercrítica, a diferença demonstrada pelas amostras foi de 1,24% para a variedade vermelha em relação à marrom e 6,23% em relação à própolis verde. A amostra verde avaliada neste estudo apresentou 64,46% a mais de flavonóides que os resultados identificados por Machado e colaboradores (2016), para mesmo tipo de própolis, oriunda de Minas Gerais, extraídas pelo mesmo método (extração etanólica) e 74,17% mais flavonóides em comparação com a mesma amostra (verde) extraída por extração supercrítica. Alencar e colaboradores (2007), também encontraram valores mais baixos de conteúdo de flavonóides para extratos etanólicos de própolis vermelha de Sergipe. Touzani e colaboradores (2018), avaliaram

sete própolis de diferentes partes do Marrocos e encontraram 33,3% menos flavonóides. Os valores identificados neste estudo para as amostras vermelha e verde parecem ser superiores aos valores encontrados na literatura. Estes resultados podem ser justificados pela diferença nas origens das amostras.

A atividade antioxidante das própolis foi analisada e valores mais baixos de IC_{50} indicam uma maior atividade de remoção de radicais. O extrato das própolis marrom e verde obtidos pelo método etanólico apresentaram 77,68% e 48,22% menos atividade antioxidante quando comparada à própolis vermelha, respectivamente. Em relação ao método supercrítico, a própolis verde apresentou 86,10% a menos de atividade antioxidante em relação a variedade vermelha. Frozza et al (2013), encontraram um valor de IC_{50} de 270,13 para a própolis vermelha do nordeste do Brasil, mostrando que a própolis vermelha estudada necessitou de menos massa para inibir 50% da formação do radical DPPH.

De maneira geral, a própolis vermelha apresentou os melhores níveis de compostos antioxidantes, independentemente do método de extração utilizado. A própolis vermelha foi classificada como um tipo separado baseado em sua composição química única, particularmente rica em isoflavonóides (RIGHI et al., 2013). Além disso, a extração etanólica foi mais eficiente na obtenção de extratos com maior capacidade antioxidante. A extração com etanol é particularmente adequada para obter extratos de própolis desparafinados ricos em polifenóis componentes (PIETTA et al., 2002; MACHADO et al., 2016; HATANO et al., 2012).

Na **Tabela 3** estão apresentados os resultados para a quantificação dos compostos, catequina, ácido trans ferúlico e luteolina. Nenhum dos compostos investigados foi quantificado para extratos obtidos por extração com fluido supercrítico e a extração com etanol demonstrou maior eficiência. Sabe-se que o método de extração influencia no extrato final, e diferentes extratos da mesma amostra de própolis podem apresentar propriedades distintas. O rendimento e a seletividade de alguns compostos são diretamente afetados pelo método de extração (COTTICA et al., 2011; CHRISTOV et al., 2005; KUBILIENE et al., 2015; TYŚKIEWICZ 2018; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2018).

Quando comparado com dados da literatura, esses compostos identificados são comumente encontrados em diferentes tipos de própolis de várias regiões do mundo (MOHDALY et al., 2015; KASIOTIS et al., 2017; DOGANLI et al., 2016; de MENDONÇA et al., 2015). Os resultados encontrados neste estudo comprovam cientificamente que a composição química, e conseqüentemente sua propriedade biológica, das diferentes própolis ao redor do mundo depende das condições geoclimáticas e da fonte botânica do substrato (exsudatos/pólen) que as abelhas utilizam para a produção desse material, diferenciando os tipos de própolis e suas características químicas.

A concentração de flavonóides, compostos fenólicos, aromáticos e até mesmo compostos ainda não determinados pela comunidade científica determinam as características de diferentes amostras de própolis. A quantidade (mg.g^{-1} de extrato) observada neste estudo correlaciona-se com valores observados na literatura, e a diferente concentração, presença ou não de um composto nos extratos de própolis (de diferentes regiões) reforça os resultados previamente abordados (RIGHI et al., 2013; FERNANDES-SILVA et al., 2013; HATANO et al., 2012; CAO et al., 2004; CUI-PING et al., 2014; YANG et al., 2013; HEGAZI AND EL HADY, 2002; CROCI et al., 2009; POPOVA et al., 2017).

Atualmente, as principais análises realizadas com os extratos de própolis avaliam suas atividades biológicas frente a diferentes modelos experimentais. Neste estudo, os seis diferentes extratos de própolis foram analisados quanto a sua capacidade antimicrobiana e os resultados encontrados (Tabela 4) demonstraram atividade contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 29213) e as bactérias Gram-negativas *E. coli* (ATCC 25922). As bactérias utilizadas como modelo são a causa de infecções comuns na população, e estão associadas a complicações em um ambiente inflamatório. Apesar de ser encontrada na pele de aproximadamente 15% dos seres humanos, a *S. aureus* é responsável pela geração de infecções e contaminação de alimentos, da mesma forma a *E. coli* é uma bactéria que vive naturalmente no intestino de seres humanos e alguns animais, mas seu crescimento de forma descontrolada pode causar problemas como infecções intestinais e do trato urinário, especialmente em indivíduos

que consomem alimentos ou água contaminados (de KRAKER et al., 2011; DOGANLI et al., 2016).

É possível notar nos resultados que a atividade antimicrobiana foi maior contra bactérias Gram-positivas. Estudos confirmam que esta capacidade acontece devido aos flavonóides e compostos aromáticos (REZENDE et al., 2006; SILICI et al., 2005; WILSON et al., 2015). Esses compostos químicos atuam na estrutura das paredes celulares bacterianas Gram-positivas, mas o mecanismo dessa ação ainda é desconhecido (GONÇALVES et al., 2011; MARCUCCI et al., 2001). As bactérias Gram-negativas possuem maior teor de gordura e uma estrutura de membrana externa quimicamente mais complexa, que pode ser mais resistente aos extratos de própolis (de KRAKER et al., 2011; CHRISTOV et al., 1999; WESTON et al., 1999; BANKOVA et al., 1998).

Comparando os métodos de extração, os extratos etanólicos demonstraram uma melhor atividade antimicrobiana em comparação aos extratos supercríticos, o que corrobora com os resultados onde os extratos etanólicos também demonstraram maior teor de ácidos fenólicos totais e flavonóides, além de melhor atividade antioxidante. A própolis vermelha apresentou uma melhor atividade antimicrobiana *in vitro* para as duas cepas bacterianas testadas, em comparação com a própolis marrom ou verde.

Jug e colaboradores (2014), avaliaram a eficiência antibacteriana e antifúngica dos extratos de própolis obtidos por diferentes métodos de extração e determinaram que o extrato etanólico apresentou o melhor potencial antimicrobiano. Alencar e colaboradores (2007), também demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos etanólico e clorofórmico da própolis vermelha brasileira do estado de Alagoas, contra o *S. aureus* (com MIC de 50–100, extrato etanólico e um MIC de 200–400) e *Staphylococcus mutans*.

Al-Waili (2018), avaliou dois tipos de própolis coletados em diferentes áreas geográficas no Iraque e demonstrou que os extratos etanólicos possuem capacidade antimicrobiana contra as cepas *E. coli*, *S. aureus*, e *C. albicans*, e auxiliam na cicatrização de feridas em camundongos *in vivo*. Acredita-se que a atividade antimicrobiana ocorre devido aos complexos efeitos sinérgicos entre os ácidos fenólicos

e compostos flavonóides, bem como seus derivados, que estão presentes na própolis (WILSON et al., 2015; SAWAYA et al., 2004; MELLIOU et al., 2007).

No presente trabalho, avaliamos o potencial leishmanicida dos extratos de própolis, uma vez que se tem conhecimento da importância social e dos problemas relacionados ao tratamento para a doença da leishmaniose, sendo considerado difícil e doloroso, com isso muitos pacientes acabam desistindo do tratamento. Na tentativa de encontrar um caminho alternativo para o tratamento, produtos naturais vêm sendo estudados no intuito de ajudar a combater esses parasitas. Diversos estudos sobre a conhecida atividade biológica *in vitro* da própolis foram realizados contra espécies de *Leishmania*. Própolis de diferentes origens geográficas e tipos (marrom, verde e vermelho) já demonstraram atividade contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* (REGUEIRA-NETO et al., 2018; AYRES et al., 2011; NINA et al., 2016; SANTANA et al., 2014, REBOUÇAS-SILVA et al., 2017).

De acordo com a ISO Biological Evaluation of Medical Devices (2009), concentrações de um composto são consideradas citotóxicas quando matam mais de 30% das células. Como demonstrado na Figura 9, os extratos de própolis verde e vermelha demonstraram não ser tóxicas aos macrófagos de medula nas concentrações menores que $160\mu\text{l}/\text{mL}^{-1}$. O mesmo resultado foi encontrado por Rebouças-Silva e colaboradores (2017) para extratos alcoólicos e glicólicos de própolis verde. Este resultado confirma e potencializa a utilização de extrato de própolis para aplicação biológica, uma vez que o mesmo não afeta a viabilidade celular. A partir desta observação foram realizados o teste de infecção *in vitro*.

O efeito leishmanicida dos dois extratos etanólicos (verde e vermelha) de própolis foi avaliado em macrófagos BALB / c infectados com *L. (V.) braziliensis*. Ambos extratos de própolis demonstraram reduzir a carga de *L. (V.) braziliensis* de maneira dose-dependente (**Figura 10**). Rebouças-Silva et al (2017), demonstraram resultados semelhantes com a própolis verde obtida a partir de três diferentes preparações farmacêuticas: extratos seco, alcoólico e glicólico. O extrato de própolis vermelha apresentou melhor redução quando comparado ao extrato verde, corroborando os resultados de que a própolis vermelha apresentou atividade antioxidante mais efetiva

(Tabela 2). A concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou quase o mesmo efeito que a Anfotericina b, que foi utilizada como controle positivo. Estes resultados mostram que a própolis vermelha da Bahia apresenta atividade citotóxica contra *L. (V) braziliensis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Santana e colaboradores (2014), com extrato hidroalcoólico da própolis marrom, da região semi-árida do Piauí (Brasil). Em outro estudo com própolis vermelha cubana, a propriedade anti-protozoária foi avaliada e pode estar associada à composição química. As amostras apresentaram $3,3 - 16,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *L. infantum* (MONZOTE et al., 2012). Regueira-Neto et al (2018), avaliaram as atividades antileishmanial e citotóxica de amostras de própolis etanólica vermelha coletadas de diferentes estados brasileiros (Pernambuco e Alagoas) e estações enquanto buscavam possíveis diferenças de atividade. Todos os extratos apresentaram atividade antileishmanial e citotóxica.

Ayres et al (2011), avaliaram o efeito do gel de própolis vermelho brasileiro (propaina) isoladamente ou combinado com glucantime na infecção por *L. amazonensis*. A própolis vermelha contendo alta concentração de compostos bioativos (prenilados e benzofenonas) mostrou-se o extrato mais ativo contra a *L. amazonensis*. Os extratos etanólicos da própolis foram capazes de reduzir a carga parasitária, monitorada pela porcentagem de macrófagos infectados e pelo número de parasitas intracelulares. A carga parasitária dos macrófagos foi reduzida pelo extrato ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), não apresentando efeitos tóxicos diretos nas formas promastigotas e amastigotas extracelulares.

Apesar de confirmar o potencial leishmanicida dos extratos de própolis avaliados comparados a estudos prévios, ainda permanece por ser explorado os mecanismos celulares responsáveis pelo controle da carga parasitária em macrófagos infectados. Além disso, será importante aprofundar estes estudos com compostos isolados obtidos a partir dos extratos totais da própolis a fim de melhor caracterizar as vias de ativação imunoregulatórias deflagradas durante a interação da Leishmania com sua célula hospedeira.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande diversidade de componentes presentes na matéria-prima bruta da própolis é evidenciada pelas suas características, bem como dos distintos extratos, levando em consideração também pelos valores dos compostos obtidos a partir de dois métodos de extração. Apesar de ser considerada uma extração de tecnologia inovadora, diversos parâmetros da extração supercrítica precisam ser reavaliados, afim de se otimizar a obtenção do produto final. Diante disso, a extração etanólica demonstrou ser o método mais eficiente para a obtenção de extratos com alto teor de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos e flavonóides, associados ao potencial biológico do extrato de própolis. Produtos naturais complexos como a própolis podem resultar em produtos diferentes, dependendo do método de obtenção usado. Portanto, a viabilidade do processo está relacionada ao seu rendimento e à qualidade do produto (extrato), a fim de potencializar o seu potencial biológico. Então, considerando as vantagens para alcançar a concentração de substâncias ativas biológicas, a extração etanólica foi a mais eficiente. Dentre as amostras avaliadas, a própolis vermelha apresentou o maior potencial biológico, assim como o maior teor de compostos antioxidantes. Essas amostras continham diferentes constituintes que podem exercer efeitos antimicrobianos e anti-protozoários, que podem ser úteis para o desenvolvimento de novos fármacos.

8. CONCLUSÃO FINAL

Os resultados deste trabalho ratificaram as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-protozoárias de extratos de própolis de três tipos coletados em duas regiões do estado de Bahia (Nordeste do Brasil). Também foi demonstrado que o método de extração pode influenciar na extração de compostos presentes na própolis e, conseqüentemente, na atividade biológica dos extratos. Nossos dados confirmam a própolis com grande potencial de aplicabilidade na indústria farmacêutica, na área da saúde.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K.A. *et al.* A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 345-353, 2008.
- ABU-MELLAL *et al.* Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. **Phytochemistry**, p. 251-259, 2012.
- AGA *et al.* Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945–946, 1994.
- AGHEL, N. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-411, 2004.
- AL-ANI, I. *et al.* Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 2, 2018.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALMEIDA, R. P. *et al.* Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 79–81, 2005.
- AL-WAILI, N. Mixing two different propolis samples potentiates their antimicrobial activity and wound healing property: A novel approach in wound healing and infection. **Veterinary World**, v. 11, n. 8, p. 1188–1195, 2018.
- AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A. Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drug discovery development: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1290, 2017.
- ANDRADE, J. K. S. *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, p. 129–138, 2017.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **Digital Library of Journals**, v. 24, n.2, p. 319-336, 2006.

APICULTURA.< www.breyer.ind.br/apicultura_propolis.htm>. Acesso em 24 setembro 2018.

AYRES, D.C. *et al.* Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, n. 2, p. 215–220, 2007.

AZEVEDO, A.B.A. *et al.* T.G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 543-552, 2008.

BANKOVA V. *et al.* “Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur NaturforschungC - A Journal of Biosciences**, v.50, n. 3-4, p. 167–172, 1995.

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

BANSKOTA, A.H. *et al.* Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytoterapy research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BARREIROS, A.L.B.S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006

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

BARROS, J. M. *et al.* Multivariate Optimization of an Ultrasound- assisted Extraction Procedure for Cu, Mn, Ni and Zn Determination in Ration to Chickens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n.3, p. 891-902, 2013.

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

BATISTA, L. L. V. *et al.* Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n. 6, p. 515–520, 2012.

BERA, A; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas , v. 27, n. 1, p. 49-52, 2007 .

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

BLIGHT, E.G. *et al.* A Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemical Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BOGDANOV S. Propolis: composition, health, medicine: a review. **Bee Product Science**, p. 1-40, 2017.

BOGDANOV S. Propolis: composition, health, medicine: a review. Disponível em: <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>, 2012. Acesso em: 01 out 2018.

BONAMIGO, T. *et al.* L. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **Plos One**, v. 12, n.9, p. e0183983, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico de Identidade e qualidade da própolis**, Anexo VI. 2001.

BRAZIL. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency (**ANVISA**). Resolution nº 899, of May 29, 2003: **Guide to the validation of analytical and bioanalytical methods**. 2003.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21–33, 2007.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 100–107, 2017.

CAMPOS, J.F. *et al.* Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food Chemical Toxicology**, v. 65, p.374–80.

CAO, J. *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. **Analytica Chimica Acta**, v. 963, p. 24–32, 2017.

- CAPUZZO, A. *et al.* Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. **Molecules**, v. 18, p. 7194-7238, 2013.
- CARRILHO, E. *et al.* Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: thermodynamic definitions. **Química Nova**, v. 24, p. 509-515, 2001.
- CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**. v. 72, p.599-618, 2001.
- CARVALHO, R. *et al.* Propolis : a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development propolis : a complex natural product with a plethora of biological activities that can be. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 29, 2015.
- CASSEL, E. *et al.* Processos de extração supercrítica aplicados a produtos naturais. In: Cassel, E.; Rocha, L.M. (Org.). **Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos**, 2.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 213-228, 2008.
- CATCHPOLE, O. J. *et al.* Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **Journal of Supercritical Fluids**, 29, 97- 106, 2004.
- CAVALCANTI, B.C. *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, V.44, issue 3. 2006.
- CAVENDISH, R. L. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Brazilian Red Propolis Extract and Formononetin in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, n.1, p. 127-133, 2015.
- CHEN, C. R. *et al.* Precipitation of sub-micron particles of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid in Brazilian propolis from supercritical carbon dioxide anti-solvent solutions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, n. 2, p. 176–182, 2009.
- CHRISTOV, R. *et al.* Chemical composition of Egyptian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**. v. 53c, p. 197–200
- CHRISTOV, R. *et al.* Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Nature Products Research**, v. 19, n. 7, p. 673–678, 2005.

- CHRISTOV, R. *et al* .Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, v. 19, p. 673-678, 2005.
- CIKOŠ, A.-M. *et al* .Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 348, 2018.
- COSTA, A. S. *et al* . Survey of studies with propolis produced in the state of Bahia, Brazil. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-7, 2013.
- COSTA-LOTUFO, L.V.*et al* .The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleoresin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-234, 2002.
- COTTICA, S. M.*et al* .Antioxidant activity and composite on of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 929- 935, 2011.
- CRANE, E. The Past and Present Importance of Bee Products to Man. **Bee Products**, p. 1–13, 1997.
- CROCI, A. N.*et al* . HPLC evaluation of phenolic and polyphenolic acids from propolis. **Farmacia**, v. 57, n. 1, p. 52–57, 2009.
- CUI-PING, Z.; *et al* . Development of High-Performance Liquid Chromatographic for Quality and Authenticity Control of Chinese Propolis. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1–8, 2014.
- CUNHA, BEATRIZ CARVALHO. **Avaliação da atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde**. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2017.
- CUNHA, I.B.S. *et al* . Anti-trypanosomal activity of Brazilian- ian propolis from *Apis mellifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 602–604,2004.
- DA SILVA, S. S.*et al* . Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 7, 2013.
- DANTAS SILVA. *et al* . Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, p. 1–18, 2017.

DAUGSCH, A. *et al.* Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2007.

de KRAKER, M.E.A. *et al.* Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. **PLoS Medicine**, v.8, n. 10, p. e1001104. doi: 10.1371/journal.pmed.1001104, 2011.

DE LIMA, G. G. *et al.* Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 3, p. 1248–1257, 2016.

DE MENDONÇA, I. C. G. *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 15, n.357, p. 1-12, 2015.

DE ZORDI, N. *et al.* The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 491–498, 2014.

DOGANLI, G. A. *et al.* Phenolic Content and Antibiofilm Activity of Propolis Against Clinical MSSA Strains. **Records of Natural Products - ACG Publications**, v. 10, n. 5, p. 617–627, 2016.

FERNANDES-SILVA, C. *et al.* Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Quimica Nova**, v. 36, n. 2, p. 237–240, 2013.

FERREIRA, F.M. *et al.* Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 113, p. 533–543, 2014.

FRANCHI, G. C. JR. *et al.* Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT Assay. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n.1, p. 1-6, 2012.

FRANCHIN, M. *et al.* The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49-55, 2017.

- FRÉZARD, F. *et al.* Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites, **Biophysical Reviews**, v. 6, p. 119–132, 2014.
- FROZZA C.O.S. *et al.* Salvador M, Moura S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol**, v. 52 p. 137–42, 2013.
- GALANAKIS, C. M. *et al.* Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n.8, p. 1148-1155, 2010.
- GEKKER G. *et al.* Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 158–163, 2005.
- GEKKER, G. *et al.* Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 158–163, 2005.
- GERALD D. *et al.* Herb and spice carbon dioxide extracts-versatile, safe ingredients for premium food and health food. **Food Technology**, v.8, p. 1–5, 2002.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis. A review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979
- GINZBURG, E. *et al.* Gram positive infection in trauma patients: new strategies to decrease emerging Gram-positive resistance and vancomycin toxicity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. S39-S42, 2000.
- GOMES, P. B. *et al.* Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 50–60, 2007.
- GONÇALVES G.M.S. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. **Revista de Ciências Farmácia Básica Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 349–356, 2011.
- GREENAWAY, W. *et al.* The composition and plant origin of propolis: a report of work Oxford, **Bee World**, v.71, n.3,p. 107–118, 1990.
- HAJIMIRSADEGHI, S. S. *et al.* Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1162, p. 2–24, 2007.
- HAMBURGER, M. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants - effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances.

Phytochemical Analysis, v. 15, p. 46-54, 2004.

HARISH, Z. *et al.* Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drugs and Experimental Clinical Research**, v. 23, p. 89–96, 1997.

HATA, T. *et al.* Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v.7, p. e48072, 2012.

HATANO, A. *et al.* Antioxidant Activity and Phenolic Constituents of Red Propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577–584, 2012

HEGAZI, A. G. *et al.* Egyptian Propolis : 3 . Antioxidant , Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Zeitschrift für Naturforschung C A Journal of Biosciences**, v. 57, n. 3–4, p. 395–402, 2002.

HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpinaceae, em serum.** 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

HIGASHI, KO. *et al.* Propolis extracts are effective against Trypanosoma cruzi and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 149-155, 1994.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** ISO 2009, p. 9 -28, Genève, 2009.

ITO, J. *et al.* Anti-AIDS agents: 48 (1) anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1278–1281, 2001.

JACOB, A. *et al.* The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 294, 2015

JUG M. *et al.* Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **Lebenson Wiss Technol.** v. 57, p. 530–537, 2014.

KANSAL, S. *et al.* Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2650–2660, 2012.

KASIOTIS, K. M. *et al.* Revisiting Greek Propolis : Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. **PLoS ONE**, v. 12, p. e0170077, 2017.

KAUR, G. *et al.* Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in leishmania, **Journal of Parasitology Research**, v.2014. 2014.

KIM, Y. H. *et al.* J. The effects of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 713–718, 2011.

KIMOTO, N. *et al.* Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 Rats. **Cancer Letters**. v.147, p.221-227, 1999.

KONG, F. *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) leaves using response surface methodology. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n.43, p. 463-469, 2015.

KOO, H. *et al.* Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on *Mutants Streptococci*. **Current Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 192–196, 2000.

KUBILIENE, L. *et al.* Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.

KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.

KUMAZAWA, S. *et al.* Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

KUROPATNICKI, A. K. *et al.* Historical aspects of propolis research in modern times historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-Based**

Complementary and Alternative Medicine, n. 4, 2013.

LEWICKI, P. P. Water as the determinant of food engineering properties. A review. **Journal Food Eng.** 2004, v. 61, n. 4, p. 483–495.

LIMA M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista, SP: Editora e Gráfica, 2006.

LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.

LIN, M. C *et al.* Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix*. **Journal of Chromatography A**, v. 830, n. 2, p. 387–395, 1999.

LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, 46, n. 2, p. 223–231, 2008.

LU, L. *et al.* Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 213-220, 2005.

LIU D. *et al.* The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers Cell Infection Microbiology**, n. 2, jun. 1–8, 2012. Disponível em: doi: 10.3389/fcimb.2012.00083.

MACHADO, J. L., *et al.* Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity,” **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.10, 2012.

MACHADO, B. A. S. *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, p. e0134489, 2015

MARCUCCI, M.C. *et al.* Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo State. **Zeitschrift fur Naturforsch – Sect. C. Journal Bioscience**, v. 53, n. 1–2, p. 8–10, 1998.

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

MELLIUO E. *et al.* Volatile constituents of propolis from various regions of Greece - Antimicrobial activity. **Food Chem**, v. 103, n. 2, p. 375–380, 2007

MIRANDA, M. M. *et al*/ Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

MOHDALY, A. A. *et al*. Phenolic extract from propolis and bee pollen : composition , antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Food Biochemistry**, 2015.

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

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

MONZOTE L. *et al*. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n 8, p. 978–984, 2012

MOUHOUBI-TAFININE, Z. *et al*. Antioxydant Activity of Some Algerian Honey and Propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 88, n.1, p. 85-90, 2017.

MOURA, S.A.L. *et al*. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p.1-7, 2011.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Boca Raton, Fla; London: CRC Press, v. 1, p. 360, c2000.

NAGAI, T. *et al*. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

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

NATIONAL INSTITUTE OF METROLOGY, STANDARDIZATION AND INDUSTRIAL QUALITY. **INMETRO. Guidelines for chemical testing methods validation**. 2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M100-S10 (M7))**. 5^aed. Approved standard. Wayne, PA: NCCLS; 2000.

NEDJI, N. *et al.* Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 433-437, 2014.

NINA N *et al.* Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. **Letters Applied Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 290–296, 2016.

ODA, J. M. M. *et al.* Ação do extrato de própolis na Leishmaniose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 32, n. 1, p. 111-121, 2011.

ONG TH, *et al.* Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.

PACE, D. Leishmaniasis. **The Journal of Infection**, v.69, Supl 1, p. S10–S18, 2014.

PAULINO N. *et al.* Anti-inflammatory effects of a bio- available compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal Pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 296–301, 2008

PAIVA, L. A. F. *et al.* Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharm.**, v. 62, 1998.

PAIVA, L. A.F. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p. 303–307, 2002

PARK Y.K. *et al.* Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.

PARK, Y.K. *et al.* Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p.313-318, 1998.

PASUPULETI VR. *et al.* Propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longe*, 2017.

PAVIANI, L. C. *et al.* Supercritical CO² extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 243–251, 2012.

- PAVIANI, L. C. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, 2012.
- PEREIRA, A. S. *et al.* Própolis: 100 anos de pesquisa e suas respectivas futuras. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
- PICOLI, T. *et al.* Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 365–371, 2016.
- PIETTA P.G. *et al.* Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. S7–S20, 2002.
- PIMENTA, H. C. *et al.* In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2015.
- PONTIN, K. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103. p. 487–492, 2008.
- POPOVA, M. *et al.* Characterization and biological evaluation of propolis from poland. **Molecules**, v. 22, p. 1159, 2017
- REBOUÇAS-SILVA, J. *et al.* Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by standardized propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–14, 2017.
- REGUEIRA-NETO M da S. *et al.* Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food Chemical Toxicology**, v. 119, p. 215–21, 2018.
- REVERCHON, E. *et al.* Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.
- REZENDE, G. P. S. R. *et al.* Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, v. 5, p. 967- 970, 2006.
- RICE-EVANS, C. *et al.* The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical. Research**. v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.
- RIGHI, A. A. *et al.* Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 14, 2013.

ROCHA, B.A.*et al.* Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterization. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 1, p. 11, 2013.

RUFATTO LC. *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 591–598. 2017

SALGUEIRO, F. B. *et al.* Comparação Entre a Composição Química e Capacidade Antioxidante de Diferentes Extratos de Própolis Verde. **Química Nova**, v. 39, n.10, 1192-1199, 2016.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. del P.*et al.*Recent applications of on-line supercritical fluid extraction coupled to advanced analytical techniques for compounds extraction and identification. **Journal of Separation Science**, p. 1–42, 2018.

SANTANA, L. C. L. R. *et al.* Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 5, p. 340–343, 2014.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal Infectious Dev Ctries**, v. 9, p. 588-596, 2015.

SAWAYA A.C.H.F.*et al.* Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their In vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 104–109, 2004.

SAWAYA, A.C.H.F. *et al.* Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**. v. 37, p. 398–407, 2006.

SCAZZOCCHIO, F. *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, p. 327-333, 2006.

SENA-LOPES, A. *et al.* Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **Plos One**, v. 13, n.3, p. e0191797, 2018.

SERRA BONVEHI, J, *et al.* Study on propolis quality from China and Uruguay. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 778–784, 2000.

SHIVONEN, M. *et al.* Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 6-7, p.217-222, 1999.

SFORCIN JM. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1–14, 2006.

SILICI S. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 69– 73, 2005.

SILVA, R. P. D.*et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n.3, p. e0172585, 2017.

SILVA, R. P. D.*et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

SILVA, R. P. D. *et al.* Aplicação de Extrato de Própolis em Produtos Alimentícios: Uma Prospecção Baseada em Documentos de Patentes. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n.5, p. 1251, 2016.

SILVA, S.S. *et al.* Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1557-66, 2016.

Sítio do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **SEBRAE**.

Disponível em:

http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf. Acesso em: 25 nov 2018.

SOUZA, A. P. B. *et al.* Efetividade da Delphinium staphysagria 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. **Brazilian Homeopathic Journal**, v. 11, n.1, p. 13-14 2009.

STARMANS, D.A.J.*et al.* Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 191-197, 1996.

TAYLOR, L.T. **Supercritical fluid extraction**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.

TEI, A.N.A. *et al.* Quantificação de cera, compostos fenólicos totais e determinação da atividade anti-radical da própolis bruta. *In*: CONGRESSO INTERNO - INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16, 2008, São Paulo, 2008. Resumo [...] São Paulo: Anais... 2008.

TORETI V.C. *et al.* Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med** v. 2013, p. 1–13, 2013.

TOUZANI, S.*et al.* Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 7, p. 436–442, 2018.

TYŚKIEWICZ, K.*et al.* The Application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2625, 2018.

VALENTE, M.J. *et al.* Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 86-92, 2011.

VAN-SOEST, P.J. *et al.* Use of detergents in analysis of fibrous feeds. In: Determination of plant cell wall constituents. **Journal of Association of Analytical Chemistry**, v. 50, p. 50, 1967.

WAGH, V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Adv. Pharmacol. Sci.** v. 2013, p. 308249, 2013.

WANG, B. J.*et al.* Supercritical fluid extractive fractionation-study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, p. 237-243, 2004.

WESTON, R.J.*et al.* Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chem**, v. 64, n. 3, p. 295–301, 1999

WILSON M.B.*et al.* Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 124, p. 44–50, 2015.

WOISKY, R.G.*et al.* Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apic Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: worldwide epidemiology and drug access update, **WHO**, 2012. Acesso em: 26 set 2018.

WORTMANN, G. *et al.* Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 2010.

WU, J. J.*et al.* Supercritical carbon dioxide anti-solvent process for purification of micronized propolis particulates and associated anti-cancer activity. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n. 2, p. 190–198, 2009.

YANG, L.*et al.* High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in propolis. **Tropical Journal of Pharmaceutical**, v. 12, n. 8, p. 771–776, 2013

YEN G.C. *et al.* Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chem**, v. 65, n. 3, p. 375–379, 1999.

YILDIRIM, Z. *et al.* Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research*. v. 49, p. 287–292, 2004.

YOSHIMASU, Y.*et al.* Rapid bactericidal action of propolis against *porphyromonas gingivalis*. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 8, p. 928–936, 2018.

ZABAIYOU, N.*et al.* Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, n. B, p. 214- 222, 2017.

ZACCARIA, V.M.*et al.* Expression Levels of microRNAs , mRNAs and and Inflammation. **Nutrients**, v. 9, p. 1–17, 2017.

ZUCCA, M., *et al.* New Chemotherapeutic strategies against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiases, **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 502–526, 2013.

ANEXO

10.1 Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction

Danielle Devequi-Nunes Bruna Aparecida Souza Machado, Gabriele de Abreu Barreto, Jéssica Rebouças Silva, Danielle Figuerêdo da Silva, José Luiz Carneiro da Rocha, Hugo Neves Brandão, Valéria M. Borges, Marcelo Andres Umsza-Guez

Abstract

Propolis is a natural product with many demonstrated biological activities and propolis extract has been used in the food, pharmaceutical and cosmetics industries. Different works have showed the variations in the chemical composition, and consequently, on the biological activity of the propolis that are associated with its type and geographic origin. Due to this study evaluated propolis extracts obtained through supercritical extraction and ethanolic extraction (conventional) in three samples of different types of propolis (red, green and brown), collected from different regions in Brazil (state of Bahia). Analyses were performed to determine the humidity, water activity, the content of total ash, proteins, lipids and fiber in raw propolis samples. The content of phenolic compounds, flavonoids, in vitro antioxidant activity (DPPH), catechin, ferulic acid and luteolin and antimicrobial activity against two bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) were determined for all extracts. For the green and red ethanolic extracts the anti-leishmanicidal potential was also evaluated. The physicochemical profiles showed agreement in relation to the literature. The results identified significant differences among the extracts ($p > 0.05$), which are in conformity with their extraction method, as well as with type and botanical origin of the samples. The extraction with supercritical fluid was not efficient to obtain extracts with the highest contents of antioxidants compounds, when compared with the ethanolic extracts. The best results were shown for the extracts obtained through the conventional extraction method (ethanolic) indicating a higher selectivity for the extraction of antioxidants compounds. The red variety showed the largest biological potential, which included the content of antioxidants compounds. The results found in this study confirm the influence of the type of the raw material on the composition and characteristics of the extracts. The parameters analysis were important to characterize and evaluate the quality of the different Brazilian propolis extracts based on the increased use of propolis by the natural products industry.