

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA BAÍA DO IGUAPE,
BAHIA, BRASIL**

MARIZA ALVES FERREIRA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2017**

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL

MARIZA ALVES FERREIRA

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Geni da Silva Sodré

Coorientador: Prof^a. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

F383a

Ferreira, Mariza Alves.

Análise microbiológica e atividade antimicrobiana da própolis da Baía do Iguape, Bahia, Brasil / Geni da Silva Sodré. – Cruz das Almas, BA, 2017.

121f.; il.

Orientadora: Geni da Silva Sodré.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Própolis – Análise microbiológica. 2.Própolis – Atividade antimicrobiana. 3.Iguape, Baía de (BA) – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 638.16

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PRÓPOLIS DA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
MARIZA ALVES FERREIRA**

Realizada em 16 de Fevereiro de 2017

Prof^a. Dr^a Geni da Silva Sodré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Orientadora)

Prof^a. Dr^a Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a Daniela Almeida Anacleto
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IF Baiano
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a Edna Lôbo Machado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

³E não somente isto, mas também nos gloriamos nas tribulações; sabendo que a tribulação produz a paciência,
⁴E a paciência a experiência, e a experiência a esperança.

⁵E a esperança não traz confusão, porquanto o amor de Deus está derramado em nossos corações pelo Espírito Santo que nos foi dado.”

Romanos 5:3-5

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela existência de todos aqueles que contribuíram para a efetivação deste trabalho.

Às Instituições, pela oportunidade e financiamentos:

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB);

Instituto Politécnico de Bragança (IPB);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Aos grupos de pesquisa, pelo espaço e condições laboratoriais:

Núcleo de Estudo dos Insetos – INSECTA (UFRB);

Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA (UFRB);

Centro de Investigação de Montanha – CIMO (IPB).

Aos professores (doutores), pela orientação:

Geni da Silva Sodré (UFRB);

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho (UFRB);

Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho (IPB);

Norma Suely Evangelista-Barreto (UFRB);

Altino Choupina (IPB);

Luís Avelino Guimarães Dias (IPB);

Fabiane de Lima Silva (UFRB).

Aos amigos e colegas, pela colaboração e convivência, em especial:

Adailton Ferreira, Antônio Santos, Carla Miquez, Cátia Lucas, Cerilene Machado, Daiane Oliveira, Eloi Alves, Fábio Nascimento, Flaviane Sousa, Irana Paim, Lorena Nunes, Luanda Emely, Maiara Caldas, Marivalda Santa-Barbara, Marly Silveira, Polyana dos Santos, Renata de Lima, Rodrigo Arthur Costa, Samira da Silva, Vanessa Matos.

À minha família pelo apoio e compreensão, em especial:

Murilo Alves Mutti (filho), Maria das Graças Ferreira (mãe), Jaqueline Ferreira e Ricardo Ferreira (irmãos). E a minha vó (Yolanda Alves Lima), *in memoriam*, que me educou.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO01

ARTIGO 1

**INFLUÊNCIA DO MANEJO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA PRÓPOLIS
PRODUZIDA NA BAHIA, BRASIL 21**

ARTIGO 2

**IDENTIFICAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS ENCONTRADOS NA PRÓPOLIS
PROVENIENTE DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL..... 50**

ARTIGO 3

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA BAÍA DO
IGUAPE, BRASIL72**

ARTIGO 4

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS SOBRE
FITOPATÓGENOS 90**

CONSIDERAÇÕES FINAIS117

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA BAÍA DO IGUAPE, BAHIA, BRASIL

Autora: Mariza Alves Ferreira
Orientadora: Dr^a. Geni da Silva Sodré

RESUMO: Neste estudo, foi analisada a atividade antimicrobiana e a existência de agentes contaminantes na própolis produzida por *Apis mellifera*, na Baía do Iguape, Bahia, Brasil, bem como a identificação morfológica, bioquímica e molecular dos fungos isolados das amostras. Bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli*, Enterobacterias e Estafilococos coagulase positiva estiveram presentes tanto no manejo convencional quanto no manejo onde foram empregadas Boas Práticas de Fabricação. Foram identificadas dezesseis espécies de fungos filamentosos, isolados da própolis: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sp.*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella sp.*, *Flavodon flavus*, *Fusarium incarnatum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraphoma fimeti*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium citrinum*, *Phoma medicaginis*, *Phoma sp.*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e *Stagonosporopsis valerianellae*; e seis espécies de leveduras: *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodomaia ohmeri* e *Trichosporon asahiu*. Os resultados para a análise da atividade antibacteriana indicaram que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis foram inibidas pelo extrato da própolis. Ao ser avaliada a atividade antifúngica, os resultados demonstraram que os fungos *Colletotrihum gloerosporieoides*, *Penicillium digitatum* e *Fusarium moniliforme* foram sensíveis aos extratos da própolis.

Palavras chave: microbiologia, antibacteriana, *Apis mellifera*, fungos, antifúngica, fitopatógeno

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS FROM IGUAPE BAY, BAHIA, BRAZIL

Author: Mariza Alves Ferreira

Advisor: Dr^a. Geni da Silva Sodré

ABSTRACT: This study analyzes antimicrobial activity and the presence of contaminants in propolis produced by *Apis mellifera* in Iguape Bay, Bahia, Brazil, as well as morphological, biochemical and molecular identification of fungal isolates from samples. Aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria, molds and yeasts, total coliforms, *Escherichia coli*, Enterobacteria and Estafilococos coagulase were present both in the conventional management as the management that employed Good Manufacturing Practices. Sixteen species of filamentous fungi were found in propolis isolates: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sp.*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella sp.*, *Flavodon flavus*, *Fusarium incarnatum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraphoma fimeti*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium citrinum*, *Phoma medicaginis*, *Phoma sp.*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum* and *Stagonosporopsis valerianellae* and six yeast species: *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodomaia ohmeri* and *Trichosporon asahiu*. The results for the antibacterial activity analysis indicated that *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enterteridis were inhibited by the propolis extract, and Gram-positive bacteria showed to be more sensitive when compared to Gram-negative bacteria. When the antifungal activity was evaluated, the results showed that the fungi *Colletotrihum gloerosporieoides*, *Penicillium digitatum* and *Fusarium moniliforme* were sensitive to extracts of propolis.

Keywords: microbiology, antibacterial, *Apis mellifera*, fungi, antifungal, phytopathogenic

REFERENCIAL TEÓRICO

Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas, de brotos, flores e exudatos de plantas. As abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração final da própolis (BRASIL, 2001). A palavra própolis (do grego *pro* = em defesa de, e *polis* = cidade) reflete sua importância para as abelhas, uma vez que elas revestem a parede interna das colmeias, protegem a colônia contra doenças, criando, não só uma barreira física como um ambiente asséptico para o desenvolvimento das larvas, que é possível em virtude da ação antimicrobiana de alguns componentes da própolis (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A própolis apresenta, em sua composição química, mais de 300 componentes diferentes, sendo distribuídos entre diversos tipos de própolis provenientes de várias regiões (BANKOVA, 2000). A própolis contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de pequenas quantidades de minerais e vitaminas, tais como ferro, cobre, alumínio, cálcio, estrôncio, tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido ascórbico (C), alfatocoferol (E) e ácido pantotênico (B5) (GHISALBERTI, 1979; FEÁS et al., 2014).

Esse produto apícola é classificado, como um produto opoterápico e, que apresenta propriedades terapêuticas e farmacológicas comprovadas e promissoras, sendo utilizada como suplemento alimentar, atuando, assim, como alimento funcional para melhorar a saúde e prevenir doenças cardíacas, diabetes, inflamações, e até mesmo o câncer (BRASIL, 2003; CARVALHO et al., 2011). Diversos estudos revelam surpreendentes propriedades biológicas, tais como atividade antibacteriana (DE LIMA et al., 2016) antiviral (MAZIA et al., 2016), antioxidante (WANG et al., 2015), anticancerígenas (EBEID et al., 2016).

Contudo, a própolis não é uma descoberta recente, tendo sido utilizada, na antiguidade, para embalsamar mortos, em cicatrização de ferimentos oriundos da guerra e na medicina popular (SFORCIN, 2009). Em 1968, o *Chemical Abstracts*, relatou o surgimento da primeira patente utilizando a própolis para a produção de loções para banho, oriunda da Romênia (RO 48101). O autor do livro “Abelhas e Saúde”, reporta as qualidades terapêuticas da própolis, enfatizando suas

2

propriedades como antibiótico natural e seu uso, desde 1600 d.C., pelos incas, como anti-inflamatório natural e como remédio eficiente para tratar a pirexia, ressaltando que apresenta melhor efeito bacteriostático do que as sulfonamidas e estreptomicinas (BREYER, 1991).

Os bancos de dados disponíveis, gratuitamente, na website *European Patent Office*, tomando-se o *Worldwide* como base de dados, mostrou, que até o ano de 2015, haviam mais de 2926 resultados de patentes relacionadas a própolis e mais de 3213 publicações foram reveladas em uma busca realizada na base de dados do *Scopus*, evidenciando um interesse mundial pela própolis e tecnologias correlatas. Esses dados podem ser explicados pelo interesse das indústrias médica e farmacêutica por seus compostos bioativos. No Brasil, em 1981, surgiu a primeira publicação sobre a própolis, relatando um estudo sobre a atividade da própolis e suas combinações com antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*, no qual, houve sinergismo no efeito de própolis e antibióticos (SHUB et al., 1981).

Todavia, vale ressaltar, que a composição química da própolis é altamente variável, principalmente devido à variabilidade de espécies de plantas que crescem em torno dos apiários, à partir da qual as abelhas recolhem as exsudações (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Dentre estes compostos químicos, são apresentados, os polifenóis (flavonoides agliconas, ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas), sesquiterpeno quininos, cumarinas, aminoácidos e compostos inorgânicos (BANKOVA, 2005; FALCÃO et al., 2013). Flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), ácidos aromáticos e compostos fenólicos são os constituintes ativos mais importantes da própolis e parecem ser os principais componentes responsáveis pelas atividades biológicas de amostras de própolis (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

Alguns tipos de própolis apresentam composições químicas bastante diferentes em relação à outros tipos que são provenientes de regiões geográficas diferentes, no entanto, a própolis vermelha, por ser proveniente da *Dalbergia* spp., apresenta semelhanças em sua composição química, ainda que seja oriunda de diferentes zonas tropicais (FREIRES et al., 2016a). As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, e este é possivelmente o maior problema para a sua padronização e utilização em apiterapia. A composição química da própolis se modifica de acordo com a flora da

região, época de colheita, com a espécie da abelha e com o método empregado para obtenção dos extratos (FREIRES et al., 2016b).

Importância do manejo na qualidade microbiológica da própolis

A determinação da procedência geográfica e, principalmente, a fonte vegetal, aliada à fenologia da planta, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002). A biodiversidade no entorno das colmeias determina a composição química da própolis (AGUERO et al., 2011). A produção da própolis é fortemente influenciada pelo clima da região, conseqüentemente pela visita das abelhas, sendo que o período de maior produção acontece no verão e na época chuvosa, ou seja, na época de brotamento das plantas. Em virtude da queda das folhas ocorre uma queda na produção durante as demais estações do ano (BASTOS et al., 2011).

A variação sazonal influencia nos efeitos antimicrobianos e na solubilidade das amostras, entretanto as própolis originadas de clima tropical podem apresentar maior atividade antimicrobiana em relação à própolis proveniente dos demais climas (MIGUEL; ANTUNES, 2011). Entre os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis encontram-se os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas (FERNANDEZ-JÚNIOR et al., 2006).

Sabe-se que as abelhas coletoras de resina possuem uma preferência por uma determinada fonte vegetal, mas ainda não são conhecidos os fatores que tornam esta coleta seletiva (SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005). Acredita-se que a própolis ideal é aquela produzida em regiões onde existe um mínimo de poluição ambiental, distante dos grandes centros e fábricas poluentes (ANDRÉA et al., 2005), isso porque, havendo ausência de vegetação, as abelhas são forçadas a procurar outras fontes de resina, contaminadas com tinta, asfaltos, e impurezas que comprometem, substancialmente, a qualidade do produto final (WIESE, 2005).

Análises microbiológicas são realizadas visando obter padrões seguros e uniformes para a comercialização dos produtos de origem animal. Microrganismos patogênicos, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* têm

sido relatados como agentes causadores de infecções graves e perigosas em humanos e outros animais, devido à ingestão de alimentos contaminados (NEDJI; LOUCIF-AYAD, 2014). Alguns microrganismos indicadores de contaminação higiênico-sanitária são frequentemente pesquisados para manter os parâmetros microbiológicos na comercialização do mel e do pólen (GOMES et al., 2010; PUCCIARELLI et al., 2014; BÁRBARA et al., 2015; DE-MELO et al., 2016), entretanto pesquisas com estes aspectos não são relatadas para a própolis (DIAS et al., 2012).

Comercialmente, uma própolis de boa qualidade tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às inúmeras constatações das diferentes atividades biológicas. A produção de própolis no país é estimada em torno de 100 toneladas, chegando a 150 toneladas anuais, sendo que 30% da produção anual é destinada à exportação, tanto na forma bruta como em produtos manufaturados, alcançando elevados preços no comércio exterior e representando uma importante fonte de renda (BRIGHENTI et al., 2006).

O Brasil possui potencial para a obtenção de quantidades expressivas de produtos apícolas, devido às condições climáticas favoráveis na maior parte do território; extensas áreas ocupadas com cobertura vegetal natural diversificada ou substituída por várias culturas agrícolas, pomares comerciais e reflorestamentos que apresentam interesse apícola (SFORCIN, 2009).

Segundo a ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) microrganismos indicadores podem ser agrupados em: (I) Microrganismos que não oferecem riscos diretos a saúde: contagem de bactérias mesófilas, contagem de psicrotróficos e termófilos e contagem de bolores e leveduras e, (II) Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde; coliformes totais e fecais, *Enterococcus*, Enterobactériaceae totais e *Escherichia coli* (SILVA; GALLO, 2003).

Para produtos de origem animal a segurança e a qualidade podem ser estimadas com o uso da contagem de microrganismos indicadores nomeadamente a contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*. Para mensurar a qualidade higiênica dos equipamentos e utensílios é realizada a

contagem de bolores e leveduras. Outro importante microrganismo indicador é *Staphylococcus aureus*, que sugere falhas na manipulação (LIANG et al., 2016).

Durante o processo de colheita, a própolis pode sofrer contaminação por microrganismos que prejudicam seu valor comercial. Desta forma, é necessário ter um controle de qualidade rigoroso que deve abranger todas as fases de manipulação, desde a coleta da matéria prima até a elaboração final do produto (LACERDA et al., 2011).

Após a coleta, controles específicos devem ser realizados na própolis in natura, os ensaios devem contemplar tanto os parâmetros físicos e químicos, quanto, os microbiológicos. A existência de agentes contaminantes na própolis é verificada através de análises microbiológicas de alimentos, seguindo, ainda, os critérios das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos, conforme Portaria nº 368, de 04/09/97, preconizado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997).

A temperatura ambiental é um fator que afeta a velocidade de crescimento dos microrganismos. A maioria dos microrganismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos, apresentando, de acordo com a espécie, uma temperatura mínima, ótima e máxima específicas (TORTORA et al., 2012). Este tipo de determinação os classifica em diferentes grupos, dentre os mais comuns estão os microrganismos mesófilos: *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Shigella* spp., *Acetobacter* spp., *Campylobacter* spp. e *Chromobacterium* spp. e os microrganismos psicrófilos: *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Micrococcus* spp., *Erwinia* spp., *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Citrobacter* spp., *Alcaligenes* spp. e *Bacillus* spp. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Além de propiciar o surgimento e crescimento de microrganismos, a temperatura deve ser verificada, também, por conta do correto armazenamento da própolis. À temperaturas baixas, a própolis apresenta aspecto quebradiço e se torna maleável ao ser aquecida, à temperatura de 15° C é compacta e dura, sendo fragmentada com facilidade, a temperaturas superiores a 30° C, é maleável, ficando viscosa, a 60° C e 70° C, quando ocorre seu ponto de fusão (CONTI, 2014).

Por ser um produto orgânico, o armazenamento da própolis por longos períodos ocasiona perdas nas suas características e propriedades biológicas. Marghitas e colaboradores (2013) ressaltam a importância da realização de análises da própolis in natura, visto que nos possibilita analisar características discernentes à cor, textura, composição física, química e biológica, revelando, também, sua origem botânica.

Estudos mostram que a identidade microbiológica do mel e do pólen apresentam, sempre, melhores resultados quando comparadas aos estudos de qualidade microbiológica da própolis, devido aos esforços e dedicação na manipulação do mel e do pólen. No entanto, uma vez que a própolis tem um grande potencial terapêutico é essencial que haja estudos, visando os cuidados e acompanhamento da sua qualidade à partir do processo de extração (DIAS et al., 2012).

A própolis é considerada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como um produto de origem animal, devendo seguir instruções normativas para ser utilizada para o consumo humano e animal, não podendo ser comercializada com indicação que lhe atribuam propriedades medicamentosas e/ou terapêuticas. A limpeza, classificação, armazenamento e a embalagem da própolis in natura, bem como a elaboração dos extratos, devem ser efetuadas em lugar adequado, livre de impurezas, tais como pedaços de madeira, cera, pólen e abelhas mortas, sendo indispensável a eliminação e purificação da amostra antes da preparação dos extratos (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA, 2005).

No Brasil, existe uma legislação que regulamenta a identidade e qualidade dos produtos apícolas, onde, a instrução normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001, anexo VI, determina como impurezas permissíveis existentes na propólis, somente, os fragmentos, acidentalmente presentes, de abelhas, madeira, vegetais e outros, inerentes ao processo de obtenção da própolis (BRASIL, 2001).

Identificação de bolores e leveduras da Própolis

Os fungos são microrganismos largamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água e o solo. Podem produzir toxinas que representam riscos para a saúde humana e animal gerando doenças que levam à morte. Desta forma a

detecção, quantificação e identificação de fungos são análises essenciais na caracterização microbiológica dos alimentos, sendo, a população fúngica um parâmetro importante na avaliação das condições higiênico-sanitárias ao longo do processo de colheita e beneficiamento do produto (CORREA-JUNIOR, 2006).

Os fungos filamentosos são organismos formados por uma estrutura básica chamada hifa, que em conjunto formam um arranjo mais complexo denominado micélio. O conhecimento destas estruturas é fundamental para a diferenciação entre bolores de espécies diferentes, pois é responsável pela aparência das colônias formadas, as quais podem apresentar aspecto cotonoso, cerebriforme, gelatinoso, flocoso, aveludado, úmido, lanoso, seco e pulverulento, variando, ainda na coloração (PELCZAR et al., 1996). Com células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores. Comumente, uma análise macroscópica das colônias formadas direciona a identificar ao nível do gênero ao qual o fungo pertence (SALVATIERRA, 2014).

As técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade (AZEVEDO et al., 2006).

O uso de vários antimicrobianos sintéticos apresentam restrições por conterem substâncias tóxicas ao consumo. Neste sentido, os produtos naturais, derivados de plantas e fungos, têm surgido como opção de compostos efetivos e capazes de fornecer segurança microbiológica para os alimentos (SOUZA et al., 2007; KUMAR et al., 2010).

As plantas e fungos possuem uma grande capacidade de sintetizar substâncias aromáticas, principalmente os fenóis ou os seus derivados oxigenados. Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismo de defesa contra predadores e parasitas, como os microrganismos, insetos e herbívoros (HARBONE, 1982).

A ação da própolis contra microrganismos foi muito estudada, o que indica que fungos que a colonizam apresentariam um metabolismo diferenciado. Assim, fungos da própolis teriam rotas enzimáticas/metabólicas muito diferentes de fungos isolados de outros ambientes. A identificação dos fungos oriundos da própolis é de

fundamental importância para elucidar questionamentos sobre os efeitos causados neste produto e testificar se são fungos deteriorantes ou benéficos. A própolis pode ser considerada uma fonte promissora de fungos que produzem agentes ativos contra bactérias patogênicas relevantes e fitopatogênicos (DE SOUZA et al., 2013).

Propriedades antimicrobianas da própolis

A procura por produtos naturais com atividade antimicrobiana surgiu como uma alternativa viável para o tratamento de diversas doenças infecciosas. Novos fármacos tem sido uma forma alternativa de evitar a resistência microbiana aos antibióticos. Um dos produtos naturais utilizados no combate à infecções é a própolis que é produzida a partir de resinas encontradas em exsudados, brotos ou cascas das plantas, que são coletadas pelas abelhas *Apis mellifera* e modificadas por reações enzimáticas na saliva (FEÁS et al., 2014).

Entre as propriedades antimicrobianas mais ilustradas, em relação à própolis, está a ação eficaz no controle e combate às bactérias e aos fungos. Estudos com alguns tipos de própolis relataram atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, cicatrizante e antitumoral (CASTRO et al., 2007; CABRAL et al., 2009; VICTORINO et al., 2009). Entre as propriedades antifúngicas da própolis menciona-se seu efeito fungicida e fungistático (FONTANA et al., 2004; LONGHINI et al., 2007).

A atividade antibacteriana da própolis é atribuída à ação dos flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina. Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis (CABRAL et al., 2009). Várias funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre as quais são mencionadas a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, ação antioxidante, inibição enzimática e proteção contra microrganismos patogênicos (MACHADO, 2008).

Estudos de avaliação da atividade antibacteriana da própolis vermelha, por exemplo, revelam que os extratos obtidos das regiões brasileiras, apresentam melhor ação biológica em comparação aos resultados obtidos com extratos norte-americanos (BASTOS et al., 2008). Segundo Dausch et al. (2007), as amostras de própolis vermelha brasileira da região Nordeste apresentam grande potencial

antimicrobiano e eficiência comprovada frente a *Staphylococcus aureus* em baixas concentrações.

A atividade antifúngica da própolis é uma propriedade biológica bastante explorada, sendo atribuída, sobretudo, aos componentes ativos, tais, como, flavonol galagina, flavonona pinocembrina e ao éster feniletil do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado, possivelmente, na inibição da RNA-polimerase bacteriano (UZEL et al., 2005). Outros componentes como os flavonóides, ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2005; DIMKIC et al., 2016).

A ação antifúngica da própolis é fundamental no controle de alguns fungos patogênicos. Sua ação antimicótica se deve a presença do ácido cinâmico e ao flavonóide crisina. Um dos primeiros relatórios da ação antimicrobiana da própolis contra os fungos patogênicos de plantas foi de Ghaly et al. (1998), que determinou a eficácia de um extrato etanólico de própolis contra o fungo *Aspergillus flavus*, com o objetivo de reduzir a produção de aflatoxinas.

A utilização de produtos naturais como a própolis no controle de doenças fúngicas em plantas é considerada uma alternativa promissora aos fungicidas sintéticos, pois causa menor impacto negativo sobre o ambiente, além disso diminui os efeitos decorrentes da resistência dos fungos aos fungicidas químicos (CURIFUTA et al., 2012)

Segundo Da Silva et al. (2009), a maioria dos estudos comprovam a eficácia da própolis no controle de doenças incitadas por fungos filamentosos ou leveduras que causam danos à saúde humana. Entretanto, poucas são as pesquisas que descrevem o potencial de uso da própolis no controle de fungos fitopatogênicos e poucos relatos do uso da própolis no controle de fungos causadores de podridões pós-colheita. É importante salientar que para a confecção de extratos para uso na agricultura, é possível utilizar refugos da própolis que sobram após sua classificação e direcionamento da produção, diminuindo significativamente o custo econômico.

Além de potencialmente inibir o crescimento micelial e germinação de esporos de fungos, a própolis pode atuar na inibição da produção de toxinas produzidas por estes microrganismos (KHERZI et al., 2006). Os fungos apresentam

diferentes comportamentos quanto a sensibilidade e tolerância frente à própolis, podendo haver influência do grupo ao qual eles pertencem (*Ascomycota*, *Zigomycota*, *Basidiomycota* ou *Oomycota*) ou até mesmo a fase do seu ciclo de vida (DA SILVA et al., 2008).

Atualmente, diversos estudos comentam as atividades biológicas da própolis e suas aplicações terapêuticas. Embora aceita por órgãos regulatórios como produto benéfico à saúde, a própolis precisa ser padronizada quimicamente para assegurar sua qualidade, eficácia e segurança. Para tanto, são imprescindíveis pesquisas que relacionem a composição química com a atividade biológica, pois assim será possível correlacionar o tipo de própolis com a sua aplicação terapêutica (LUSTOSA et al., 2008).

O objetivo deste trabalho de tese foi estudar a atividade antimicrobiana e analisar a existência de agentes contaminantes na própolis produzida por *Apis mellifera*, na Baía do Iguape, Bahia, Brasil, bem como a identificação dos fungos encontrados nas amostras, contribuindo para a caracterização biológica, de maneira a fornecer subsídios para programas e medidas de incremento à atividade apícola da região. Para tanto este trabalho foi dividido nos seguintes artigos:

- Artigo 1: Influência do manejo na qualidade microbiológica da própolis produzida na Bahia, Brasil;
- Artigo 2: Identificação de bolores e leveduras encontrados na própolis da Baía do Iguape Brasil;
- Artigo 3: Atividade antibacteriana da própolis produzida na Baía do Iguape, Brasil;
- Artigo 4: Potencial antifúngico de extratos da própolis sobre fitopatógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉA, M. V.; COSTA, C. N.; CLARTON, L. Própolis na cura e prevenção de doenças? Pode ser uma boa alternativa! **Bahia Agrícola**, v.7, p.19-21, 2005.

AGUERO, M. B.; SVETAZ, L.; SÁNCHEZ, M.; LUNA, L.; LIMA, B.; María Liza LÓPEZ, M. L.; ZACCHINO, S.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; FERESIN, G. E.; TAPIA, A. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea*

nitida Cav. (Zygothylaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1970-1978, 2011.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A. **Taxonomia de fungos**. In Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus. (J.L. Azevedo & R.F. Vazoller, coord.). 50p., 2006.

BÁRBARA, M. S.; MACHADO, C.S.; SODRÉ, G.S.; DIAS, L.G.; ESTEVINHO, L. M. F.; CARVALHO, C. A. L. de. Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. **Moléculas**, v.20, p.12.525-12.544, 2015.

BASTOS, E. M.; SANTANA, R. A.; CALAÇA-COSTA, A. G.; THIAGO, P. S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p.727-734, 2011.

BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 273-281, 2008.

BANKOVA, V. S. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003). Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis Resolução – RDC nº 132, de 02 de janeiro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 janeiro 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 368, de 08 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, Seção 1, p. 19697, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2001). Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BREYER, E. U. **Abelha e Saúde**. 6ªed. União da Vitória: Coleção Vale do Iguaçu, n. 40, 79p, 1991.

BRIGHENTI, D. M.; SANTOS, F.C. dos; BRIGHENTI, C.R. Método para Intensificar a Produção de Própolis. **Mensagem Doce**, n. 85, 2006.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, p.1523-1527, 2009.

CARVALHO, A. A.; FINGER, D.; MACHADO, C.S.; SCHMIDT, E. M.; COSTA, P.M.; ALVES, A. P. N. N.; MORAIS, T. M. F.; QUEIROZ, M. G. R.; QUINÁIA, S.P.; ROSA, M. R.; SANTOS, J. M. T.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; TORRES, Y. R.; In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, p.1239-1245, 2011.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v.30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

CONTI, B. J. **Extratos e composição química da própolis**. In.: Potencial da Própolis: Para o desenvolvimento de novas drogas. Sforcin, José Maurício. São Paulo: Editora Unesp, Capítulo 1, p. 10-13, 2014.

CORREA-JUNIOR, A. **Microbiologia**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, v.1, 60p., 2006.

CURIFUTA, M.; VIDAL, J.; SÁNCHEZ-VENEGAS, J.; CONTRERAS, A.; SALAZAR, L. A.; ALVEAR, M. The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. **Ciencia e Investigacion Agraria**. v.39, p.347-359, 2012.

DA SILVA, A. F.; CHAVES, J. B. P.; BATISTA, T. A. S.; SOARES, D. J.; PEREIRA, O. L.; MESSAGE, D. Extractos de propóleos: una alternativa para el control de hongos postcosecha. In.: **IV Congreso Latino Americano de Micología**. Mar del Plata: Argentina. 2008.

DA SILVA, A. F.; ARAUJO, L. D.; CHAVES, J. B. P. Atividade antifúngica de extratos de pólen e própolis. In: **IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, 2009.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435-441, 2007.

DE LIMA, G. G.; SOUZA R.O. de; BOZZI, A.D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D.M.; NUGENT, M.J.; Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.1248-1257, 2016.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A. da S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation

between quality parameters, *LWT - Food Science and Technology*, v.65, p.808-815, 2016.

DE SOUZA, G. G.; PFENNING, L. H.; DE MOURA, F.; SALGADO, M. ; TAKAHASHI, J. A. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. *Natural Product Research* (Print), v.1, p.1-3, 2013.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food Chemistry*, v. 50, p.4246-4253, 2012.

DIMKIC, I.; RISTIVOJEVIC, P.; JANAKIEV, T.; BERIC, T.; TRIFKOVIC, J.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; STANKOVIC, S. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis, *Industrial Crops and Products*, v.94, p.856-871, 2016.

EBEID, S. A.; MONEIM, N. A. A.; EI-BENHAWY, S. A.; HUSSAIN, N. G.; HUSSAIN, M. I. Assessment of the radioprotective effect of propolis in breast cancer patients undergoing radiotherapy. New perspective for an old honey bee product, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v.9, p.431-440, 2016.

ESPAENET – European Patent Office.

http://worldwide.espacenet.com/searchResults?submitted=true&locale=en_EP&DB=EPODOC&ST=advanced&TI=&AB=propolis&PN=&AP=&PR=&PD=&PA=&IN=&CPC=&IC=&Submit=Pesquisa Acessado em 04 de maio de 2015.

FALCÃO, S. I.; TOMÁS, A.; VALE, N.; GOMES, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 805-812, 2013.

FEÁS, X.; PACHECO, L.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Use of propolis in the sanitization of lettuce. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p.12243-57, 2014.

FERNANDES-JÚNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.294-297, 2006.

FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C. A. de; LANÇAS, F. M. **Propolis**: chemical micro- heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: Humana Press, p.203-218. 2004.

FREIRES, I. A.; MATIAS, A. S.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.1, p. 33, 2016a.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. de; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp., **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 26, p.122-132, 2016b.

GHALY, M. F.; EZZAT, S. M.; SARHAN, M. M. Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. **Folia Microbiologica**, v.43, p.156-160, 1998.

GHISALBERTI, V. Q. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. M. F. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.544-548, 2010.

HARBONE, J. B. **Higher plant-lower plant interaction: phytoalexins and phytotoxins.** In: A. Press (Ed.). Introduction to Ecological Biochemistry. New York. Higher plant-lower plant interaction: phytoalexins and phytotoxins. p.227-261, 1982.

KHEZRI, M.; ROSTAMI, S.; RISEH, R. S.; ALIZADEH, A. Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (*Pistacia vera* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**, v.8, p.606-608, 2006.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v.6, p.539-543, 2010.

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; ALENCAR, S. M. Própolis e Segurança Alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, p.99-106, 2011.

LIANG, W. L.; PAN, Y. L.; CHENG, H. L.; LI, T. C.; YU, P. H. F.; CHAN, S. W. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, v.69, p.45-50, 2016.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.17, p.388-395, 2007.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia química. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.447-454, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. Boletim do **Centro de Biologia Reprodução**, v.27, p.33-39, 2008.

MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN D.S.; BOBIS O. Important developments in Romanian propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 9p, 2013.

MAZIA, R. S; PEREIRA, R. R. de A.; FRANCISCO, L. M. B. de; NATALI, M. R. M.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; BRUSCHI, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermo-responsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.113-121, 2016.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. Is propolis safe as an alternative medicine? **Journal of Pharmacy e Bioallied Sciences**, v.3, p.479-495, 2011.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. 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.

PARK, Y. Yong Park extrai mais esperança da própolis. **Jornal da Unicamp - Universidade Estadual de Campinas** - 3 a 9 de novembro 2003, p.5, 2003.

PARK, Y.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, p.997-1003, 2002.

PELCZAR, J. R. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. 2ª Ed., Editora Makron Books, São Paulo, 1996.

PUCCIARELLI, A. B.; SCHAPOVALOFF, M. E.; KUMMRITZ, S.; SEÑUK, I. A.; BRUMOVSKY, L. A.; DALLAGNOL, A. M. Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. **Revista Argentina de Microbiología**, v.46, p.325-332, 2014.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGREI, G.; MENSAGEM, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.33-38, 2005.

SALVATIERRA, C. M. **Microbiologia** - Aspectos Morfológicos, bioquímicos e metodológicos. 1. ed. São Paulo: Editora Erica - Grupo Saraiva, v.1, 120p., 2014.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, v. 4, p.327-333, 2005.

SCOPUS - **Elsevier's**. <http://www.scopus.com/results/results.url?sort=plf-f&src=s&st1=propolis&sid=1C6521D43471BD487A4F1DCCC56E4C38.WXhD7YyTQ6A7Pvk9AIA%3a50&sot=b&sdt=b&sl=23&s=TITLE-ABS-KEY%28propolis%29&origin=searchbasic&txGid=1C6521D43471BD487A4F1DCCC56E4C38.WXhD7YyTQ6A7Pvk9AIA%3a5> Acesso em 04 de janeiro de 2015.

SFORCIN, J. M. **Própolis e Imunidade: Comprovações científicas**. São Paulo: ed. UNESP, 532 p. 2009.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potencial for the development of a new drug? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.253-260, 2011.

SHUB, T. A.; KAGRAMANOVA, K. A.; VOROPAEVA, S. D.; KIVMAN, G. Y. A. Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. **Antibiotiki**, v. 26, p.68-71, 1981.

SILVA, M. C.; GALLO, C. R. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 75-85, 2003.

SIRIPATRAWAN, U., VITCHAYAKITTI, W., Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with propolis. **Food Hydrocolloids**, v.6, p.239-252, 2016.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M; LIMA, E. O; TRAJANO, V.N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v.18, p.409-413, 2007.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.85- 92, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 894p., 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6.ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONÇAG, O.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v. 160, p.189-195, 2005.

VICTORINO, F. R.; BRAMANTE, C. M., WATANABE, E.; ITO, I.; YOKO, F.; SELMA L.; HIDALGO, M. M. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, p.795-800, 2009.

WANG, K.; HU, L.; JIN X.; MA, Q.; MARCUCCI, M. C; NETTO, A. A. L.; SAWAYA, A. C. H. F.; HUANG, S.; REN, W.; CONLON, M. A.; TOPPING, D. L.; FU-LIANG HU, F. "Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B," **Journal of Functional Foods**, v.19, p.464-478, 2015.

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**. Guaíba: Novos Livros. 2. ed., p.378, 2005.

ARTIGO 1

INFLUÊNCIA DO MANEJO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA BAHIA, BRASIL¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Letters in Applied Microbiology*.

Influência do manejo na qualidade microbiológica da própolis produzida na Bahia, Brasil

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica da própolis in natura, utilizando dois diferentes manejos durante a coleta. Foram coletadas na Baía do Iguape, Bahia, Brasil, um total de 36 amostras, sendo que, 18 foram manuseadas utilizando facas de aço inox e colocadas em plásticos atóxicos, posteriormente procedeu-se à limpeza das impurezas visíveis, em seguida pesadas, etiquetadas e acondicionadas em *freezer* (manejo 1). As outras 18 amostras foram coletadas seguindo BPF (Boas Práticas de Fabricação), as análises foram realizadas, imediatamente, ao chegarem ao laboratório, procedendo-se à pesagem e seleção do material em câmara de fluxo laminar (manejo 2). Os parâmetros microbiológicos foram analisados para aeróbios mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli*, Enterobacterias, Estafilococos coagulase positiva, Clostrídios sulfito redutores e *Salmonella* spp. Foi constatado para todos os parâmetros microbiológicos avaliados, que não houve diferença significativa entre as médias das amostras obtidas entre apiários e nem entre as diferentes épocas avaliadas, no entanto verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os manejos empregados. Bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli*, Enterobacterias e Estafilococos coagulase positiva estiveram presentes em ambos os manejos analisados, todavia houve uma redução ao ser aplicadas as técnicas de manejo 2. Em relação aos Clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella* spp. não foram encontradas nas amostras analisadas. A adoção das Boas Práticas de Fabricação para a coleta e manipulação da própolis é fundamental para manter a qualidade microbiológica desse produto.

Palavras chave: *Apis mellifera*, bioindicadores, manipulação

Handling Influence on the microbiological quality of propolis produced in Bahia, Brazil

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the microbiological quality of the *in natura* propolis, using different treatments during the collection. A total of 36 samples were collected in Iguape Bay, Bahia, Brazil, 18 of which were handled using stainless steel knives and placed in non-toxic plastics, and then the visible impurities were cleaned, then weighed, labeled and packaged in a freezer (handling 1). The other 18 samples were collected following GMP (Good Manufacturing Practices), the analyzes were performed immediately upon arriving at the laboratory, weighing and selecting material in laminar flow chamber (handling 2). Microbiological parameters were analyzed for mesophilic and psychrotrophic aerobes, molds and yeasts, total coliforms and *Escherichia coli*, Enterobacteria and *Staphylococcus aureus* positive, Clostridium sulphite reducers and *Salmonella* spp. It was verified for all the microbiological parameters evaluated that there was no significant difference in the average from the samples obtained between apiaries and nor between the different evaluated times, however, there were statistically significant differences between the handlings used. *Escherichia coli* and Enterobacteria and *Staphylococcus aureus* were present in both treatments, although there was a reduction when handling 2 techniques were applied. In relation to Sulfite-reducing clostridium and *Salmonella* spp. were not found in the analyzed samples. The adoption of Good Manufacturing Practices for the collection and manipulation of propolis is fundamental to maintain the product's microbiological quality.

Keywords: *Apis mellifera*, bioindicators, manipulation

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto resinoso que as abelhas colhem à partir das gemas e exsudatos das plantas, sofrendo transformações enzimáticas em suas glândulas salivares e adição de ácidos graxos. Sforcin et al. (2009) define a própolis como um material lipofílico, apresentando cor variável entre verde, vermelho e diferentes tons de marrom. Em sua composição, a própolis apresenta mais de 300 componentes, distribuídos entre resina de bálsamo vegetal (50%), cera (30%), óleos essenciais e aromático (10%), pólen (5%) e outros compostos orgânicos (5%) (FEÁS et al., 2014), bem como minerais como o alumínio, o cálcio, estrôncio, ferro, cobre e manganês, e, pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (LACERDA et al., 2011).

A complexidade química que envolve a própolis varia de acordo com a região e as características fitogeográficas em torno da colmeia, fator determinante da sua qualidade e do seu potencial de ação terapêutica (SFORCIN et al., 2014). Estudos revelam que, no Brasil, as interferências sazonais não são significativas, havendo concentrações dos compostos biologicamente ativos em todas as estações do ano. Este fato sugere que, na mesma região geográfica, as abelhas coletam a própolis das mesmas espécies botânicas (CONTI, 2014).

Durante o processo de coleta, a própolis pode sofrer contaminação por microrganismos que prejudicam seu valor comercial. Desta forma, é necessário adotar as Boas Práticas de Fabricação, que deve abranger todas as fases de manipulação, desde a coleta da matéria prima até a elaboração do produto final (FÉAS et al., 2014). A localização do apiário deve ser cuidadosamente escolhida, pois em ambientes onde são usados dejetos animais, fertilizantes ou água contaminada para irrigação é comum a existência de patógenos intestinais, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Shigella* spp. (GERMANO; GERMANO, 2011).

As fontes de contaminação por microrganismos mésófilos são, em geral, decorrentes dos processos de produção e preparo, visto que são microrganismos encontrados na água, no solo, nas plantas, nos utensílios, no trato intestinal do homem e dos animais, nos manipuladores, no ar, na poeira e por vezes na pele dos animais (FORSYTHE, 2013). Assim, as fontes de contaminação por bactérias gram-negativas podem ser, frequentemente, oriundas da água e do solo, enquanto

os fungos são geralmente veiculados por plantas, o trato intestinal do homem e de outros animais é a principal fonte de contaminação por bactérias enteropatogênicas. O controle destes microrganismos exige cuidados maximizados de higiene tanto dos manipuladores quanto dos utensílios e locais de processamento de produtos (TRABULSI, 2015), fato que se aplica, perfeitamente, a própolis. As análises microbiológicas são realizadas, visando obter padrões seguros e uniformes para a comercialização dos produtos de origem animal.

No Brasil, a qualidade da própolis é regulamentada pela Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001, que em seu anexo VI, estabelece que as práticas de higiene para elaboração da própolis devem “estar de acordo com o estabelecido na Portaria nº 368, de 04/09/97 - Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil”. Definindo que o “produto não deve conter substâncias estranhas, com exceção dos fragmentos, acidentalmente presentes, de abelhas, madeira, vegetais e outros, inerentes ao processo de obtenção da própolis pelas abelhas” (BRASIL, 2001).

Existem poucos estudos sobre a qualidade microbiológica da própolis, e também, não existe legislação que regule os parâmetros microbiológicos com precisão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica da própolis in natura, proveniente da Baía do Iguape, Brasil, utilizando dois diferentes manejos durante a coleta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em três apiários da Baía do Iguape, Brasil (12° 45' S; 38° 53' W), onde foram selecionadas oito colônias por apiário. Estas colônias foram induzidas à produção da própolis, sendo oferecida alimentação artificial (energética e proteica). Após observações visuais e manejo adequado nas colônias foram introduzidos os coletores TP (Tira e põe), confeccionados em madeira e inseridos, sob a tampa de cada colônia.

Coleta e acondicionamento das amostras de própolis

As análises foram realizadas com as coletas da própolis produzida por *Apis mellifera* entre os meses de agosto de 2013 a janeiro de 2014. Foram coletadas mensalmente em três apiários (1 amostras/apiário/mês/manejo), totalizando 36 amostras, sendo que, 18 amostras foram manuseadas conforme especificações na literatura utilizando facas de aço inox e colocadas em plásticos atóxicos, posteriormente procedeu-se à limpeza das impurezas visíveis (madeira, folhas, restos mortais de abelhas e insetos). Após pesadas e etiquetadas, as amostras foram acondicionadas em *freezer*, sendo, denominadas por: manejo 1. As outras 18 amostras foram coletadas seguindo BPF (Boas Práticas de Fabricação), comumente utilizadas na colheita do mel e pólen, adaptado de Fonseca et al (2006). Foram utilizadas facas em aço inox autoclavadas para retirar as amostras da própolis que foram envasadas em coletores assépticos e acondicionadas em caixas isolantes de temperatura. As análises foram realizadas, imediatamente, ao chegarem ao laboratório, procedendo-se à pesagem e seleção do material em câmara de fluxo laminar (manejo 2).

Determinações Microbiológicas

Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de aeróbios mesófilos e psicotróficos, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem de Enterobacterias contagem de Estafilococos coagulase positiva, contagem de esporos de Clostrídio sulfito redutor e pesquisa de *Salmonella* spp. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a contagem das colônias foi seguido a metodologia descrita por Silva et al. (2010).

Preparo das amostras

A preparação das amostras foi realizada seguindo o método da *American Public Health Association* (APHA) descrito nas normas internacionais (DOWNES; ITO, 2001). Para tanto, uma alíquota de 25 g de cada amostra foi tomada para preparação da primeira diluição (10^{-1}) em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (H₂O_p) a 0,1%, e a preparação das diluições decimais subsequentes (10^{-2} à 10^{-6}) foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente.

Aeróbios mesófilos e psicrotróficos

De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 1 mL para placas de Petri, em seguida foram inoculadas em profundidade em Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Himedia®), incubadas a $37 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 48 h para a contagem de aeróbios mesófilos. Para a contagem de bactérias psicrotróficas, a inoculação ocorreu em superfície, sendo as placas incubadas a 7°C por 10 dias.

Bolores e leveduras

De cada diluição foram retiradas, alíquotas de 0,1 mL para uma placa de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud (Himedia®), adicionado clorafenicol. As placas foram incubadas em estufa (BOD), em temperatura de 25°C , por cinco dias.

Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi utilizado o método CEC-CI SimPlate (AOAC® Official Method 2005) (BioControl Sistema, Bellevue, Washington, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O meio fornecido foi hidratado em 100 mL de água estéril, posteriormente foram acrescentados aos 9 mL do meio de hidratação uma alíquota de 1 mL da amostra, sendo homogeneizado em vórtex e distribuídos por espalhamento nas placas, em movimentos circulares, para que os 84 poços ficassem cobertos e sem bolhas de ar. As placas foram incubadas a 35°C durante 24-48h. Após incubação, a contagem de coliformes totais foi efetuada contabilizando como resultados positivos, os poços com alteração da cor inicial do meio de cultura. A quantificação de *E. coli* foi realizada expondo cada placa a fluorescência da luz UV (365nm) contando como positivos os poços onde se verificava mudança de cor e fluorescência. Os resultados foram determinados com base na quantidade de poços positivos correlacionadas com a tabela de conversão SimPlate.

Quantificação de Enterobacteriaceae

Para a contagem de Enterobacteriaceae foi utilizado o método TPC-CI SimPlate (AOAC® Official Method 2005) (BioControl® Sistema, Bellevue, Washington, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O meio fornecido foi hidratado em 100 mL de água estéril, posteriormente foram acrescentados aos

9 mL do meio de hidratação, 1 mL da amostra, sendo homogeneizado em vórtex e distribuídos por espalhamento nas placas em movimentos circulares, para que os 84 poços ficassem cobertos e sem bolhas de ar. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24-48h. Após incubação, a contagem das colônias foi efetuada contabilizando como resultados positivos, os poços com alteração da cor inicial do meio de cultura. Os resultados foram determinados com base na quantidade de poços positivos correlacionadas com a tabela de conversão SimPlate.

Pesquisa e Quantificação de Clostrídios sulfito redutores

Os esporos de clostrídios sulfito-redutores foram detectados e enumeradas de acordo com a norma ISO 15213:2003. Em tubos de ensaio previamente estéreis foram adicionados, 1 mL, 5mL e 10mL da suspensão inicial da amostra (triplicado). Estes, foram submetidos ao tratamento térmico, isto é, aquecidos em banho-maria a 80°C, durante 15 minutos para a inativação da amostra. Posteriormente, as amostras foram distribuídas em placas de Petri, que foram, em seguida cobertas com meio de cultura Agar sulfito de ferro. As placas foram seladas com parafilme em jarras de anaerobiose. As placas foram incubadas à 37°C ± 1°C durante 24 à 48 horas.

Estafilococos coagulase positiva

Retirou-se 0,1 mL de cada diluição e inoculou-se na superfície de Placas de Petri contendo Agar Baird-Parker (Prolab®), adicionado de gema de ovo e telurito de potássio. O inóculo foi espalhado com auxílio da alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas a 37°C por 48h.

As colônias de *Staphylococcus aureus* negras com halo transparente, foram repicadas e incubadas a 37°C durante 24h para posterior pesquisa da enzima coagulase positiva. Consideram-se reação coagulase positiva quando o coágulo ocupou mais de $\frac{3}{4}$ do volume inicialmente ocupado pelo líquido.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras foi realizada utilizando a técnica de imunodifusão 1-2 test® (AOAC® Método Oficial 989.13), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram interpretados visualmente por

meio da observação do desenvolvimento de uma imunobanda que é padrão característico de imobilização de células.

Análise Estatística

Todos os tratamentos estatísticos foram efetuados usando o programa de estatística R versão 3.2.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), referido como um software livre de ambiente para análise estatística e gráficos (<https://www.r-project.org/>). Os pacotes utilizados foram: ggplot2 (WICKHAM, 2009), agricolae (MENDIBURU, 2016) e MASS (VENABLES; RIPLEY, 2002). Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para todos os parâmetros microbiológicos avaliados estão descritos na tabela 1 (média \pm desvio padrão), segundo o desenho experimental estabelecido. A contagem dos microrganismos foram analisadas em função dos fatores apiário, manejo e época. O desvio padrão relativo (%DPR) foi inferior a 3,0% em todas as análises, exceto em uma amostra que apresentou o valor de 4,37%, indicando, portanto, uma dispersão dos resultados aceitável.

Tabela 1. Resultados da contagem microbiana (\log_{10} UFC.g⁻¹) nas amostras de própolis in natura oriundas da Baía do Iguape, Bahia, Brasil (média \pm desvio padrão).

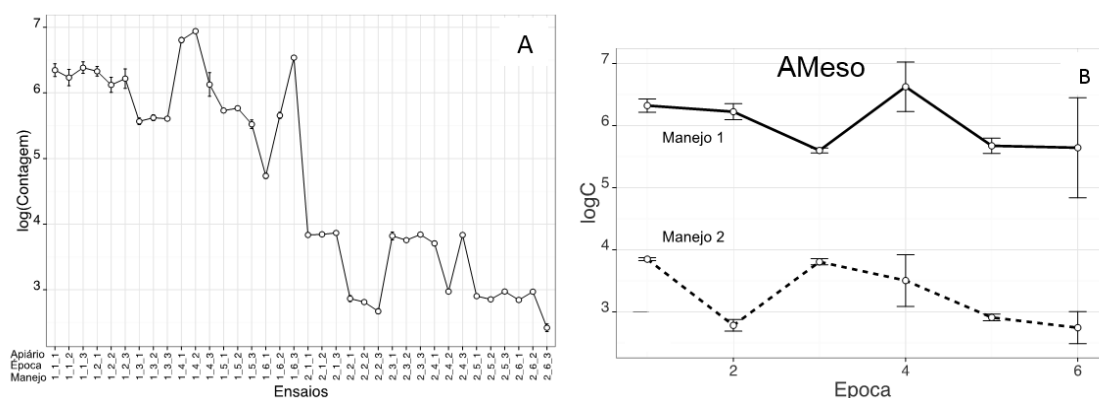
Manejo	Época	Apiário	Aeróbios mesófilos	Psicrotróficos	Bolores e Leveduras	Estafilococos coagulase positiva	Coliformes totais	Enterobacterias	<i>Escherichia coli</i>
1	1	1	6,35 \pm 0,10	4,52 \pm 0,08	4,46 \pm 0,09	4,54 \pm 0,02	4,80 \pm 0,01	4,89 \pm 0,02	2,36 \pm 0,03
1		2	6,23 \pm 0,12	5,09 \pm 0,12	5,32 \pm 0,16	4,31 \pm 0,01	4,11 \pm 0,05	4,43 \pm 0,02	2,18 \pm 0,04
1		3	6,38 \pm 0,09	5,35 \pm 0,14	4,79 \pm 0,01	4,50 \pm 0,04	3,77 \pm 0,04	4,59 \pm 0,02	<1
1	2	1	6,33 \pm 0,07	4,79 \pm 0,01	4,67 \pm 0,03	4,92 \pm 0,01	5,18 \pm 0,04	5,22 \pm 0,02	1,59 \pm 0,02
1		2	6,12 \pm 0,12	5,22 \pm 0,11	4,89 \pm 0,04	4,84 \pm 0,00	5,06 \pm 0,08	5,42 \pm 0,01	<1
1		3	6,22 \pm 0,15	5,14 \pm 0,09	4,82 \pm 0,03	4,97 \pm 0,03	4,11 \pm 0,05	4,11 \pm 0,05	<1
1	3	1	5,57 \pm 0,05	4,60 \pm 0,04	4,18 \pm 0,04	3,41 \pm 0,04	5,74 \pm 0,01	5,23 \pm 0,00	2,61 \pm 0,01
1		2	5,62 \pm 0,04	5,39 \pm 0,10	3,86 \pm 0,00	3,62 \pm 0,01	4,49 \pm 0,02	5,45 \pm 0,01	2,11 \pm 0,05
1		3	5,61 \pm 0,01	5,33 \pm 0,14	4,55 \pm 0,06	3,86 \pm 0,02	5,64 \pm 0,03	4,84 \pm 0,01	2,46 \pm 0,02
1	4	1	6,81 \pm 0,04	6,39 \pm 0,07	5,89 \pm 0,03	3,60 \pm 0,02	3,86 \pm 0,02	1,30 \pm 0,00	1,79 \pm 0,01
1		2	6,94 \pm 0,02	6,81 \pm 0,04	5,74 \pm 0,03	4,13 \pm 0,18	3,87 \pm 0,00	2,30 \pm 0,00	2,67 \pm 0,01
1		3	6,13 \pm 0,18	6,89 \pm 0,03	5,80 \pm 0,02	<1	3,87 \pm 0,00	3,11 \pm 0,05	<1
1	5	1	5,73 \pm 0,02	5,79 \pm 0,02	5,47 \pm 0,05	3,78 \pm 0,04	5,59 \pm 0,02	5,62 \pm 0,01	2,43 \pm 0,02
1		2	5,77 \pm 0,01	5,33 \pm 0,07	5,79 \pm 0,05	3,87 \pm 0,04	5,18 \pm 0,04	5,11 \pm 0,05	2,30 \pm 0,06
1		3	5,52 \pm 0,06	5,77 \pm 0,03	5,64 \pm 0,06	<1	5,43 \pm 0,02	5,40 \pm 0,02	1,89 \pm 0,02
1	6	1	4,74 \pm 0,04	5,74 \pm 0,02	4,78 \pm 0,03	2,38 \pm 0,03	<1	3,87 \pm 0,00	<1
1		2	5,66 \pm 0,05	5,65 \pm 0,03	5,57 \pm 0,02	3,41 \pm 0,02	3,88 \pm 0,01	3,86 \pm 0,00	<1
1		3	6,54 \pm 0,01	5,72 \pm 0,02	4,62 \pm 0,04	<1	3,49 \pm 0,02	3,86 \pm 0,00	<1
2	1	1	3,84 \pm 0,03	2,94 \pm 0,05	3,56 \pm 0,08	<1	3,57 \pm 0,02	2,40 \pm 0,02	<1
2		2	3,84 \pm 0,02	2,62 \pm 0,04	3,83 \pm 0,04	<1	3,04 \pm 0,06	2,84 \pm 0,01	<1
2		3	3,87 \pm 0,02	2,78 \pm 0,07	3,74 \pm 0,03	<1	2,59 \pm 0,02	2,78 \pm 0,02	<1
2	2	1	2,87 \pm 0,05	2,97 \pm 0,03	3,39 \pm 0,06	2,29 \pm 0,08	3,86 \pm 0,02	3,86 \pm 0,00	<1

2		2	$2,81 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,02$	$3,50 \pm 0,05$	$2,64 \pm 0,01$	$3,86 \pm 0,02$	$3,86 \pm 0,00$	<1
2		3	$2,67 \pm 0,04$	$2,90 \pm 0,02$	$2,59 \pm 0,06$	<1	$3,74 \pm 0,01$	$3,86 \pm 0,00$	<1
2	3	1	$3,82 \pm 0,06$	$2,57 \pm 0,04$	$2,36 \pm 0,03$	<1	$2,72 \pm 0,02$	$3,11 \pm 0,05$	<1
2		2	$3,76 \pm 0,00$	$2,40 \pm 0,06$	$3,48 \pm 0,02$	<1	$3,57 \pm 0,02$	$3,18 \pm 0,04$	<1
2		3	$3,84 \pm 0,00$	$2,51 \pm 0,01$	$2,54 \pm 0,03$	<1	$2,61 \pm 0,01$	$2,82 \pm 0,02$	<1
2	4	1	$3,71 \pm 0,04$	$3,56 \pm 0,04$	$3,48 \pm 0,04$	<1	$3,18 \pm 0,04$	$3,74 \pm 0,01$	<1
2		2	$2,97 \pm 0,02$	$2,89 \pm 0,01$	$2,42 \pm 0,08$	<1	$2,93 \pm 0,01$	$3,29 \pm 0,05$	<1
2		3	$3,84 \pm 0,00$	$3,34 \pm 0,12$	$2,29 \pm 0,05$	<1	$2,15 \pm 0,00$	$3,11 \pm 0,05$	<1
2	5	1	$2,90 \pm 0,01$	$2,77 \pm 0,03$	$2,53 \pm 0,02$	$2,20 \pm 0,08$	<1	$3,30 \pm 0,00$	<1
2		2	$2,85 \pm 0,01$	$2,79 \pm 0,02$	$2,28 \pm 0,00$	<1	$2,69 \pm 0,01$	$2,93 \pm 0,01$	<1
2		3	$2,97 \pm 0,01$	$2,32 \pm 0,03$	$2,34 \pm 0,06$	$2,63 \pm 0,00$	<1	$3,86 \pm 0,00$	<1
2	6	1	$2,84 \pm 0,02$	$2,13 \pm 0,07$	$3,45 \pm 0,05$	$2,26 \pm 0,08$	$3,74 \pm 0,01$	$3,86 \pm 0,00$	<1
2		2	$2,97 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,07$	$2,61 \pm 0,06$	<1	$3,40 \pm 0,02$	$3,86 \pm 0,00$	$1,47 \pm 0,00$
2		3	$2,42 \pm 0,06$	$2,38 \pm 0,09$	$3,91 \pm 0,03$	<1	$3,04 \pm 0,06$	$3,57 \pm 0,02$	<1

As análises estatísticas efetuadas neste estudo, incidiram sobre a variável resposta correspondente a contagens que podem assumir zeros e valores inteiros positivos altos. Considerando esta situação, neste trabalho foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM, do inglês Generalized Linear Models) para ajustar a variável dependente (contagem de microrganismos) aos fatores considerados no desenho experimental (variáveis independentes): apiário, época e manejo. O objetivo foi identificar quais os fatores que eram significativos para justificar os valores das contagens de todos os microrganismos avaliados.

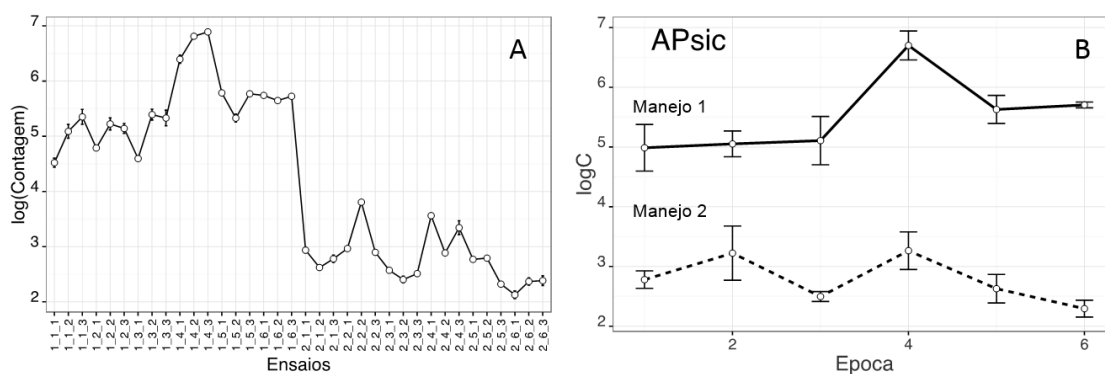
A distribuição que melhor se adequou aos dados para a análise de aeróbios mesófilos, foi a quasi-Poisson, onde a significância de cada termo foi testada, sendo obtido o modelo final com as variáveis manejo e época ($p < 0,001$). O parâmetro de dispersão para a distribuição quasi-Poisson foi de 0,053, explicando 89,3% da variabilidade dos dados. A figura 1.A, mostrou que havia uma diferença evidente, formando dois patamares distintos entre os resultados dos dois manejos, enquanto a figura 1.B, evidencia a variável época e suas variações. Verificou-se que do manejo 1 resultaram amostras com níveis elevados de microrganismos aeróbios mesófilos, ao contrário do manejo 2, mostrando que este procedimento é mais eficiente na redução deste tipo de contaminação. O modelo ajustado apresentou resíduos com aleatoriedade e normalidade satisfatória e sem a presença de *outliers*, bem como, um desempenho satisfatório de previsão comparando os valores previstos com os valores experimentais, tendo-se obtido uma relação linear com R^2 ajustado = 0,89, declive de $0,90 \pm 0,03$ e ordenada na origem, $0,5 \pm 0,2$.

Figura 1 - Valores obtidos para a contagem de microrganismos (A) AMeso (aeróbios mesófilos), na própolis para cada ensaio efetuado considerando as variáveis manejo, época e apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, manejo e época.



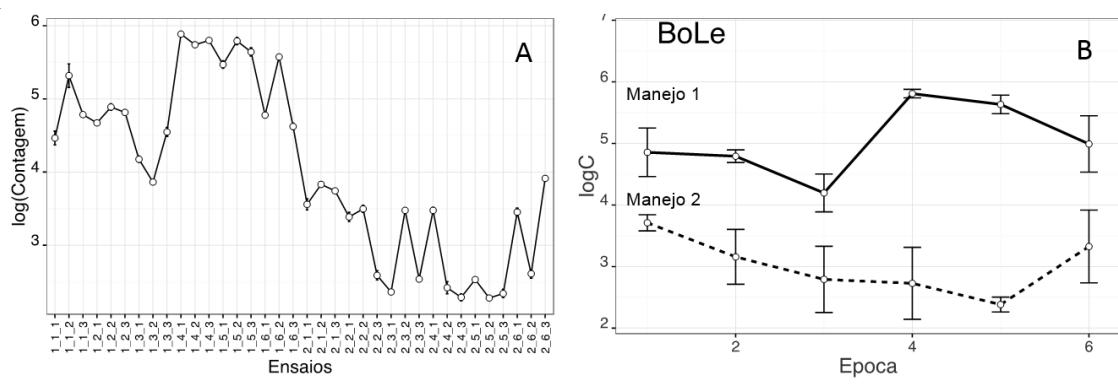
Para as análises dos psicotróficos, o modelo do parâmetro de dispersão (quasi-Poisson) foi de 0,059, mostrando que as variáveis no modelo explicam 89,8% da variabilidade dos dados. Na figura 2, as imagens mostram uma diferença evidente entre os resultados dos dois manejos, enquanto que a influência da variável época se manifesta dentro dos resultados de cada manejo. Assim, tal como se esperava, o manejo 2 demonstrou ser o mais eficiente na redução de contaminações por aeróbios psicotróficos nas amostras de própolis, tendo apresentado, no mínimo, níveis 1,5 vezes mais baixos que os obtidos no manejo 1. O modelo final ajustado mostrou resíduos com aleatoriedade e normalidade satisfatória. O ajuste do modelo foi satisfatório ($R^2_{ajustado} = 0,89$), evidenciando uma relação linear na representação dos valores previstos em função dos experimentais, com declive de $0,89 \pm 0,04$ e ordenada na origem, $0,4 \pm 0,2$. Isto confirma que os resultados devem ser avaliados em função do manejo e da época.

Figura 2 - (A) Valores obtidos para a contagem de microrganismos aeróbios psicotróficos (Apsic) na própolis, para cada ensaio efetuado considerando as variáveis manejo, época e apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, manejo e época.



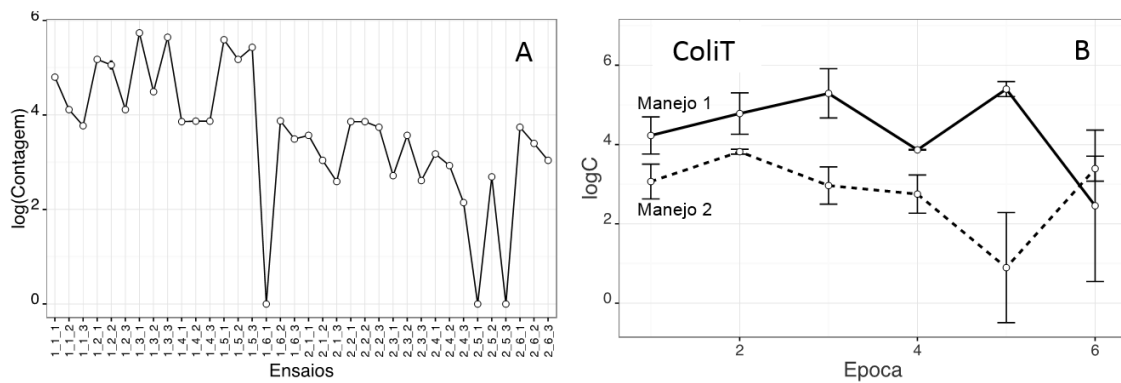
Os resultados obtidos para a contagem dos bolores e leveduras (BoLe) mostraram uma variabilidade que poderia ser ajustada a várias distribuições, mas sempre com fraca concordância. A distribuição quasi-Poisson esteve dentro dos melhores resultados de ajuste. O modelo final mostrou maior dispersão nos valores experimentais (variável dependente), pois o parâmetro de dispersão para a distribuição quasi-Poisson foi de 0,088, explicando, desta forma, 76,6% da variabilidade dos dados. Na figura 3 apresentam-se os resultados obtidos para os bolores e leveduras em cada um dos ensaios definidos pelo desenho experimental. Foi notável que o fator de maior inferência na contagem dos bolores e leveduras foi o manejo, que, semelhantemente aos resultados obtidos na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, obteve-se resultados mais elevados no manejo 1 do que no manejo 2. Os resíduos do modelo final mostraram aleatoriedade e normalidade satisfatória. Embora o desempenho na previsão seja menos satisfatório (R^2 ajustado = 0,78), o modelo mostra que a maior variabilidade dos dados é explicada pela interação entre os fatores manejo e época da coleta da própolis. Corroborando este aspecto, a relação linear entre os valores previstos pelo modelo obtido em função dos valores determinados experimentalmente teve um declive de $0,78 \pm 0,05$ e ordenada na origem de $0,9 \pm 0,2$, mais distantes dos valores teóricos 1 e zero, respectivamente.

Figura 3 - (A) Valores obtidos para a contagem de bolores e leveduras (BoLe) na própolis, para cada ensaio efetuado considerando as variáveis Manejo, Época e Apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, Manejo e Época.



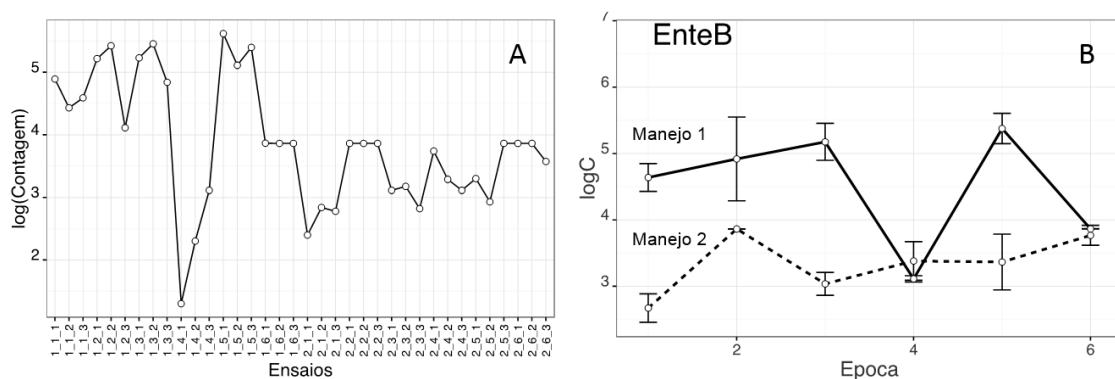
As determinações dos coliformes totais (ColiT) originaram resultados de grande variabilidade e que mostraram fraca concordância com as várias distribuições testadas. O modelo final apresentou o parâmetro de dispersão para a distribuição Quasi-Poisson de 0,48, explicando apenas 24,4% da variabilidade dos dados. O desempenho na previsão dos resultados pelo modelo é fraco, o que está de acordo com a qualidade do ajuste dos valores previstos pelo modelo obtido em função dos valores experimentais (relação linear com $R^2_{ajustado} = 0,35$). Estes resultados mostraram que a elevada variabilidade nos dados não pode ser justificada pelos fatores estabelecidos pelo desenho experimental, e, que os fatores manejo e época demonstram ser importantes tal como nos casos anteriores. Análisisando a figura 4.A verifica-se que os resultados aferidos podem ser justificados pelo fato da ausência de microrganismos ($<1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$) em três dos ensaios efetuados, obtidos nos testes Manejo:Época:Apiário com os códigos de 1:6:1, 2:5:1 e 2:5:3. De modo complementar, também se verificou que o manejo 1 apresentou as contagens mais elevadas e que a influência do fator época mostrou-se mais evidente para estes microrganismos.

Figura 4 - (A) Valores obtidos para a contagem de Coliformes totais (ColiT), na própolis para cada ensaio efetuado considerando as variáveis Manejo, Época e Apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, Manejo e Época.



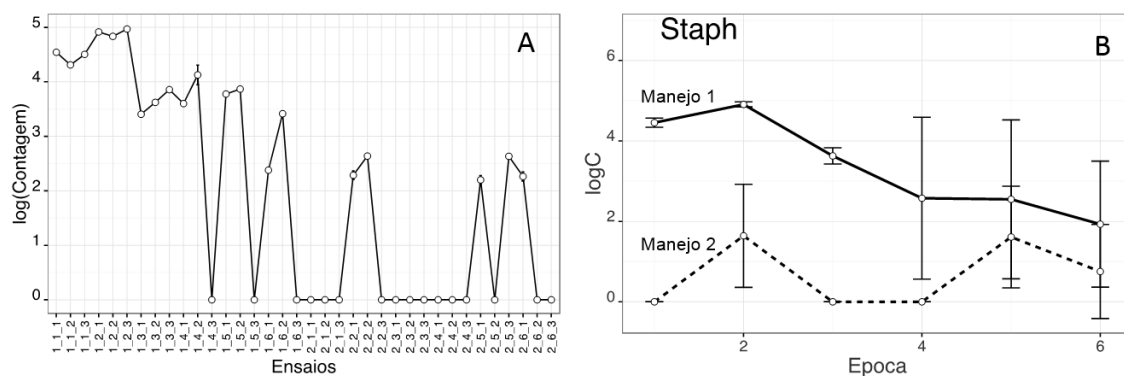
Os resultados da contagem das Enterobactérias (EnteB) originaram grande variabilidade associada a 4 amostras que foram identificadas ao nível dos resíduos, como *outliers*. O modelo final apresentou o parâmetro de dispersão para a distribuição quasi-Poisson de 0,082, explicando 61,1% da variabilidade dos dados. No estudo do desempenho do modelo obtido na previsão, verificou-se haver uma tendência linear visível entre os valores previstos pelo modelo obtido em função dos valores experimentais mas pouco satisfatório pois, obteve-se um declive de $0,60 \pm 0,06$, ordenada na origem, $1,6 \pm 0,2$ e R^2 ajustado de 0,60. Este fato é explicado pela elevada variabilidade nos dados. A figura 5 mostra os resultados obtidos para as Enterobactérias em cada um dos ensaios definidos pelo desenho experimental e também dos valores médios com barras de erros de forma a evidenciar a influência do manejo e época da coleta das amostras. As figuras 5.A e 5.B permitem verificar também que o manejo 1 evidenciou resultados mais elevados de contagem de Enterobactérias na própolis que os obtidos no manejo 2, exceto nas amostras com o número 4 e 6 na variável época que apresentam resultados semelhantes para os dois manejos.

Figura 5 - (A) Valores obtidos para a contagem de Enterobactérias (EnteB), na própolis para cada ensaio efetuado considerando as variáveis Manejo, Época e Apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, manejo e época.



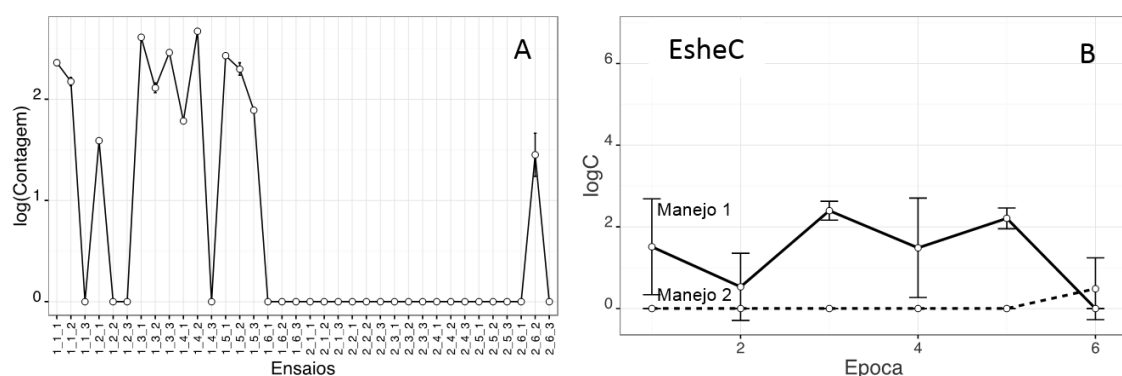
Os resultados obtidos para a contagem dos Estafilococos coagulase positivo (Staph) nas amostras de própolis apresentavam 44% dos ensaios do desenho experimental com ausência de crescimento de colônias bacterianas, o que impediu um ajuste aceitável à distribuição quasi-Poisson. Para verificar quais os fatores mais relevantes na explicação da variação dos dados, usou-se o modelo Poisson hurdle, devido ao elevado número de amostras onde estes microrganismos estavam ausentes. O melhor modelo selecionado continha a variável manejo e as interações manejo-época e época-apiário ($p < 0,05$). Obteve-se uma relação, entre os valores previstos pelo modelo com tendência linear, mas com uma grande variabilidade nos dados representados. A relação apresentou um R^2 ajustado de 0,77, declive de $0,72 \pm 0,04$ e ordenada na origem, $0,5 \pm 0,1$. Mesmo com a elevada variabilidade apresentada pelos dados, o modelo demonstrou que parte da variação foi explicada pelos fatores selecionados. A figura 6 mostra como os valores da contagem dos Estafilococos coagulase positiva variam nos ensaios efetuados.

Figura 6 - (A) Valores obtidos para a contagem de Estafilococos coagulase-positivo (Staph), na própolis para cada ensaio efetuado considerando as variáveis manejo, época e apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, manejo e época.



A figura 7.A apresentam-se os valores de contagem para *Escherichia coli* (EsheC) na própolis proveniente da Baía do Iguape, que, em geral, apresentaram 67% dos ensaios definidos pelo desenho experimental, com ausência na contagem de colônias. Devido a esta frequência não foi possível encontrar um modelo de regressão que traduzisse a variabilidade encontrada nos dados da variável dependente. Considerando este aspecto, efetuou-se a análise dos dados considerando a influência do manejo e época. Conforme esperado, com o manejo 2 (Figura 7.B), as amostras de própolis apresentaram resultado negativo para a contaminação causada por *E. coli* ($<1 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$), com exceção da amostra do ensaio 2:6:2 (Manejo:Época:Apiário). Estes resultados mostram a eficiência do manejo 2 na coleta da própolis ao nível das contaminações microbiológicas. No manejo 1, obtiveram-se 7 ensaios com ausência de contaminações (39%), demonstrando que a contaminação não é pontual. Nestes ensaios não se verificou evidente dependência da época da amostragem.

Figura 7 - (A) Valores obtidos para a contagem de *Escherichia coli* (EsheC), encontradas na própolis para cada ensaio efetuado considerando as variáveis Manejo, Época e Apiário; (B) gráfico dos valores médios das contagens com barras de erros associados em função das variáveis selecionadas no modelo, manejo e época.



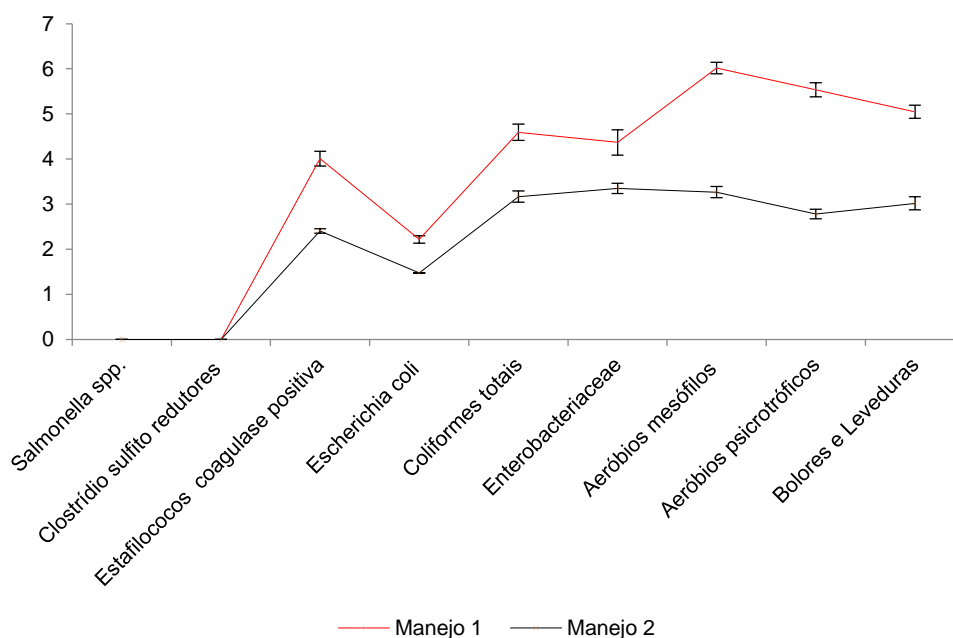
Globalmente, os resultados do presente estudo mostraram que há evidência para uma maior influência do manejo do que da época de coleta, nos resultados de contagem dos microrganismos. Dentro de cada manejo, a influência da época pode ser significativa, mas não foi possível obter explicação para a variabilidade apresentada, considerando-se que esta é afetada por condições externas dificilmente controláveis. Tendo em conta que as amostras de própolis foram in natura (bruta), recebendo tratamentos de limpeza após serem coletadas, estando, por isso, expostas às contaminações associadas aos fatores ambientais, tais como vegetação, solo, vento, chuva, insetos e condições climáticas, dificultando, justificativas para abrangentes decorrentes da época de coleta. Adicionalmente, há de ser considerado que as épocas analisadas sofrem influência direta dos manejos empregados.

Para efeitos de visualização, a figura 8 demonstra as médias gerais (com erros associados) obtidas para cada manejo. Assim, constata-se que as bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, bem como, os bolores e leveduras foram os grupos de contaminantes, em média, mais encontrados na própolis da Baía do Iguape em ambos os manejos aplicados, seguidos das Enterobacterias, dos coliformes totais e Estafilococos coagulase positiva.

Tabela 2 - Resultados obtidos (média \pm erro) para os parâmetros microbiológico (\log_{10} UFC.g⁻¹) nas amostras de própolis in natura oriundas da Baía do Iguape, Bahia, Brasil considerando o fator associado aos manejos 1 e 2.

Microrganismos	Manejos	
	1	2
Aeróbios mesófilos	6,01 \pm 0,54	3,27 \pm 0,52
Psicrotróficos	5,53 \pm 0,66	2,78 \pm 0,44
Bolores e Leveduras	5,05 \pm 0,62	3,02 \pm 0,61
Estafilococos coagulase positiva	3,34 \pm 1,66	0,67 \pm 1,11
Coliformes totais	4,34 \pm 1,32	2,81 \pm 1,14
Enterobacterias	4,37 \pm 1,18	3,35 \pm 0,48
<i>Escherichia coli</i>	1,36 \pm 1,14	0,08 \pm 0,34
Clostrídios sulfito redutores	ausente (0,01g)	ausente (0,01g)
<i>Salmonella</i> spp.	ausente (25g)	ausente (25g)

Figura 8 - Gráfico das médias gerais \pm erro padrão, obtidas nas amostras de própolis coletadas na Bahia, Brasil, entre os manejos 1 e 2.



Conforme verificado na tabela 2, que sumariza as médias obtidas neste estudo, as maiores contagens microbianas foram observadas para as bactérias aeróbias mesófilas, seguidas das psicrotróficas. Estes grupos de microrganismos

incluem organismos deteriorantes que interferem na qualidade do produto, podendo ou não ser patogênicos. Os organismos psicrotróficos são capazes de crescer a temperaturas de refrigeração, causando deterioração na forma de micélio fúngico, limo superficial ou alterações no sabor e/ou na cor (TORTORA et al., 2012).

Outra contagem elevada decorreu da presença dos bolores e leveduras, que, frequentemente, está relacionada à exposição ambiental e armazenamento inadequado do produto. Gomes et al. (2010) relatam que os bolores e leveduras estão entre os principais contaminantes microbianos no mel, juntamente com as bactérias formadoras de esporos. Os autores indicam que existem várias fontes de contaminação microbiana para o mel, incluindo o pólen, o aparelho digestivo das abelhas, o néctar, a poeira, e o solo. Estas fontes primárias são mais difíceis de controlar em comparação com as fontes secundárias que incluem manipuladores, equipamentos e instalações, podendo ser controlada por meio da adoção de boas práticas de fabricação (GOMES et al., 2010). Diante dos resultados encontrados nesta pesquisa, o mesmo pode ser mencionado em relação à própolis.

Globalmente, para as bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, observou-se uma assimetria regular, com uma redução de 53,3% e 50,83% respectivamente, entre os manejos empregados durante as coletas. Na contagem de bolores e leveduras, foi constatada uma redução de, até, 73,93% nos valores limites máximos ao aplicar as técnicas de boas práticas do manejo 2.

Ainda que a própolis não seja um ambiente favorável ao desenvolvimento da *Staphylococcus* spp., pode ser um veículo transmissor para os outros produtos das abelhas (contaminação cruzada). Segundo Nowakiewicz et al. (2016), este grupo de microrganismo é uma potencial ameaça à saúde pública, uma vez que produzem toxinas extremamente nocivas à saúde de várias espécies animais, além de desenvolverem resistência aos antimicrobianos e às condições ambientais adversas. Em relação à contagem de Estafilococos coagulase positiva foi constatada a sua presença em 86,7% das amostras coletadas sem os devidos cuidados higiênico-sanitários, sendo observada a ocorrência de apenas 9,6% destes microrganismos quando a coleta seguiu técnicas de manipulação adequada.

Microrganismos oriundos de contaminação fecal podem ser provenientes de contaminação secundária vinda dos manipuladores, do transporte e/ou recipientes contaminados. Valores encontrados para a contagem da *Escherichia coli*, também

evidenciaram considerável decréscimo no manejo 2, de fato, quando foram aplicadas as boas práticas, somente foi encontrada contagem desta bactéria em um dos apiários avaliados, e, em baixa concentração ($0,08 \pm 0,34 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$). A presença da *E. coli* foi observada em 73,3% das amostras coletadas no manejo 1 e em apenas 4,76% das amostras com manejo 2.

A bactéria *E. coli* está presente em altas concentrações nas fezes dos mamíferos, podendo ser encontrada no solo e na água, servindo de parâmetro indicativo de contaminação fecal. Esta bactéria pode ser distinguida dos outros coliformes totais devido à ausência da produção de enzimas urease e à produção da β -glucuronidase (EDEN, 2014).

A família Enterobacteriaceae é ampla e engloba microrganismos que habitam o trato intestinal dos animais e o solo. Este grupo de microrganismo apresenta, aproximadamente, 20 gêneros, inclusive *E. coli*, e todos os membros do grupo coliformes e os agentes patogênicos de origem alimentar *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Segundo Eden (2014), estes microrganismos, são mais eficientes para serem utilizados como indicadores de boas práticas de fabricação, por apresentarem maior resistência ao meio ambiente do que os coliformes. O que os distingue dos coliformes é sua capacidade de fermentar a glicose, enquanto que os coliformes fermentam a lactose.

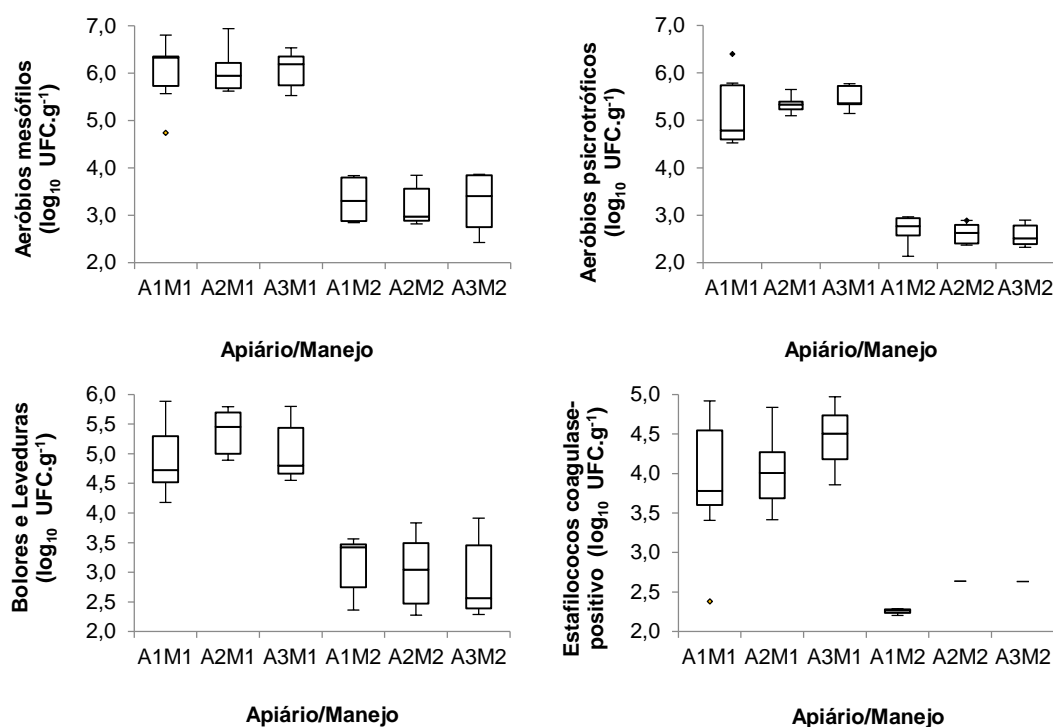
Os Clostrídios sulfito redutores estavam ausentes em todas as amostras analisadas em ambos os manejos empregados ($<1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$). Resultado bastante satisfatório do ponto de vista microbiológico, visto que microrganismos do gênero *Clostridium*, são produtores de toxinas que causam infecções aos animais e danos ao produto (FORSYTHE, 2013). As toxinas são pequenas moléculas solúveis, produzidos por muitos organismos patogênicos, que podem causar danos à saúde do homem e de outros animais. Entre os microrganismos desencadeadores destes danos são mencionados *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Aspergillus flavus* (FORSYTHE, 2013). Resultados ausentes, também, foram constatados quanto à presença de *Salmonella* spp., em todas as amostras analisadas ($<1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$).

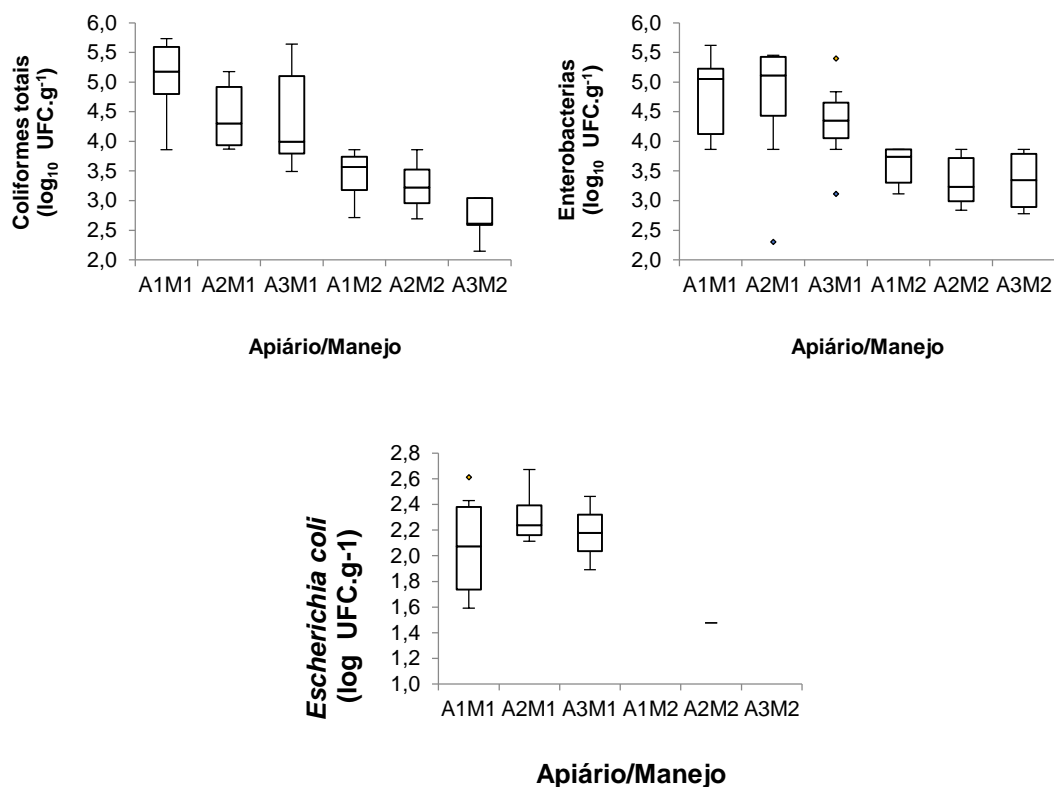
Por fim, com o objetivo de mostrar que realmente o efeito do número do apiário não é significativo, na figura 9 mostra-se o boxplot dos microrganismos

analisados de acordo com as médias gerais dos apiários entre os manejos permitindo uma abordagem sobre a distribuição das médias obtidas com os parâmetros avaliados em todos os apiários.

Da análise da figura 9, verifica-se, na globalidade, maior dispersão nos resultados obtidos utilizando o manejo 1, verificando-se em algumas das análises uma ocorrência de valores extremos. Conforme esperado, a figura 9 mostra que dentro de cada manejo, a variabilidade encontrada em cada apiário é semelhante, corroborando com o fato de não ser significativo para a explicação dos níveis de contaminação de microrganismos encontradas nas amostras.

Figura 9 - Gráficos boxplot para os microrganismos analisados de acordo com as médias gerais dos apiários entre os manejos. A1M1: apiário 1 e manejo 1; A2M1: apiário 2 e manejo 1; A3M1: apiário 3 e manejo 1; A1M2: apiário 1 e manejo 2; A2M2: apiário 2 e manejo 2; A3M2: apiário 3 e manejo 2.





Por haver poucos estudos sobre a qualidade microbiológica da própolis, e inexistência de legislação que regulamente os parâmetros microbiológicos com precisão, estudos desta natureza tornam-se fundamentais para padronizar a própolis por região. A falta de normas para os parâmetros microbiológicos, pode estar relacionada à ausência de diagnósticos, atestando a necessidade, as limitações e condições adequadas ao manejo e beneficiamento da própolis associada à região produtora.

Estes resultados sobrevêm sobre a importância de serem empregadas técnicas de Boas Práticas de Fabricação na coleta e beneficiamento da própolis, conforme acontece, frequentemente, com os outros produtos das abelhas, principalmente o mel e o pólen. Dias et al. (2012) realizaram uma abordagem semelhante ao investigar as características microbiológicas da própolis portuguesa, dando ênfase na escassez de trabalhos discernentes ao tema, bem como, a importância de se avaliar estes parâmetros na própolis in natura, uma vez que a própolis tem um grande potencial terapêutico.

Sforcin (2009) evidencia que, no Brasil, a coleta da própolis ocorre durante todo o ano e que variações sazonais em sua composição são de caráter

quantitativo, havendo concentrações de compostos biologicamente ativos durante todos os meses, além disso há uma atuação sinérgica entre os compostos químicos. Por este motivo a padronização universal da própolis seria impraticável, sendo de suma importância os estudos envolvendo as propriedades biológicas e sua origem botânica (BANKOVA, 2005). Diante dos resultados obtidos podemos constatar que a qualidade microbiológica da própolis é fortemente influenciada por fatores de contaminação primária e secundária, podendo ser controlada por meio de boas práticas de fabricação, como ocorre com o mel e os demais produtos apícolas (GRIGORYAN, 2016).

Segundo De Melo et al. (2016), a presença de alguns tipos de compostos fenólicos, a atividade de água e o pH podem afetar a presença e o crescimento bacteriano. Uma elevada carga microbiana pode influenciar nas características físicas, químicas e biológicas, tornando a própolis inadequada comercialmente e diminuindo o teor de compostos bioativos (ESTEVINHO et al., 2012), além do risco de contaminar os demais produtos oriundos das abelhas.

Por se tratar de um produto amplamente utilizado, é fundamental que se reduza a carga microbiana existente na própolis, para que se possa minimizar possíveis malefícios ocasionados a própolis que será utilizado como agente antimicrobiano (DE LIMA et al., 2016), como alimento funcional (FREIRES et al., 2016) e conservante natural de alimentos (DUMAN e OZPOLAT, 2015). Ademais, microrganismos indicadores de segurança, como *Clostridium* spp. e de qualidade sanitária, como *S. aureus* e *E. coli* denunciam inadequadas condições de higiene dos manipuladores, uma vez que o ser humano é portador assintomático de diversos microrganismos patogênicos (TIDJANI et. al., 2013).

CONCLUSÃO

A forma de coleta, de acondicionamento para transportar, manipulação e armazenamento da própolis influencia consideravelmente na quantidade de microrganismos indicadores de qualidade comercial, sanitária e de segurança ressaltando a importância da adoção das boas práticas de fabricação durante o processo de coleta e beneficiamento da própolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Official Method of Analysis**, 15th ed., AOAC, Washington, DC, aspects, chemistry, microbiology, technology. Utrecht: ECCEAMST. p 31-46, 1990.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114 -117, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2001). Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 janeiro 2001.

CONTI, B. J. **Extratos e composição química da própolis**. In.: Potencial da Própolis: Para o desenvolvimento de novas drogas. Sforcin, José Maurício. São Paulo: Editora Unesp, Capítulo 1, p.10 - 13, 2014.

DE LIMA, G. G.; SOUZA R. O. de; BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M.J.; Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.1248 - 1257, 2016.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A. da S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters, **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p.808 - 815, 2016.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food Chemistry**, v.50, p.4246 - 4253, 2012.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compêndio de métodos de análise microbiológica de alimentos. 4.ed. Washington: **American Public Health Association**, 676p., 2001.

DUMAN, M.; OZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v.189, p.80 - 85, 2015.

EDEN, R. Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* | Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration, In.: **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition), edited by Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello, Academic Press, p.667 - 673, 2014.

ESTEVINHO, M.L.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A.P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science e Technology**, v. 47, p.429 - 435, 2012.

FEÁS, X.; PACHECO, L.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Use of propolis in the sanitization of lettuce. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.12243 - 12257, 2014.

FONSECA, A. A. O.; SODRÉ, G. da S.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B. de A.; P. C. da SILVA, S. M. P. C.; OLIVEIRA, G. A.; MACHADO, C. S.; CLARTON, L. **Qualidade do mel de abelhas sem ferrão**: uma proposta para boas práticas de fabricação, Edição 5, Série Meliponicultura, Editora UFRB, 70p., 2006.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. ArtMed Editora, 2013.

FREIRES, I. A.; MATIAS DE ALENCAR, S.; ROSALEN, P. L; A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.3, p.267 - 279, 2016.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**: qualidade das matérias-primas; doenças transmitidas em alimentos; treinamento de recursos humanos. 4.ed. Editora Manole, 2011.

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. M. F. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 544 - 548, 2010.

GRIGORYAN, K. Safety of Honey. **Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods**. Elsevier Inc. Chapter 12, p.217 - 246, 2016.

HADLEY W. **ggplot2**: elegant graphics for data analysis, Springer-Verlag New York, 2009.

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; DE ALENCAR, S. M. Própolis e Segurança Alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, p.99 - 106, 2011.

MENDIBURU, F. **agricolae**: Statistical Procedures for Agricultural Research, R package version 1.2-4, 2016.

NOWAKIEWICZ, A.; ZIOLKOWSKA, G.; ZIEBA, P.; GNAT, S.; WOJTANOWICZ-MARKIEWICZ, K.; TROSCIANCZYK, A. Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p.21-28, 2016.

R versão 3.2.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), (<https://www.r-project.org/>)

SFORCIN, J.M. **Própolis e Imunidade**: Comprovações científicas. São Paulo: Editora Unesp, p. 67, 2009.

SFORCIN, J. M. **Potencial da Própolis**: Para o desenvolvimento de novas drogas. São Paulo: Editora Unesp, p. 10 -12, 2014.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª edição. São Paulo: Livraria Varela, 614p, 2010.

TIDJANI A.; DOUTOUM, A. A.; BRAHIM, B. O.; BECHIR, M.; DJIGUIDÉ, H. C.; TOUKOUROU, F.; De SOUZA C. A. Assessment of Hygiene Practices and Identification of Critical Control Points Relating to the Production of Skewered Meat Sold in N'Djamena-Chad. **Journal of Food Research**, v.2, p.5, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. I. **Microbiologia**, 10ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p.157 - 162, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**, 4ª edição, Springer, New York, 2002.

WICKHAM, H. **ggplot2**: Elegant graphics for analysis, Springer, New York, 2009.

ARTIGO 2

IDENTIFICAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS ENCONTRADOS NA PRÓPOLIS PROVENIENTE DA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial da Revista Iberoamericana de Micologia - *Journal of Mycology*.

Identificação de bolores e leveduras encontrados na própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil

RESUMO: O presente estudo teve por objetivo efetuar a identificação dos fungos encontrados na própolis produzida por *Apis mellifera* da Baía do Iguape, Brasil. Para tanto, foram utilizadas técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares. Foram averiguadas as características visíveis do crescimento dos fungos em placas de Petri. As leveduras foram identificadas com a utilização de galerias API 20C AUX. Para a análise molecular foi averiguado o perfil de restrição gerado por espaçador interno transcrito (ITS1 e ITS4). O tamanho dos produtos de PCR foram analisados quanto ao perfil de restrição obtidos com endonuclease (HhaI, HaeIII e HinfI) para cada espécie. Foram identificadas dezesseis espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sp.*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella sp.*, *Flavodon flavus*, *Fusarium incarnatum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraphoma fimeti*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium citrinum*, *Phoma medicaginis*, *Phoma sp.*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e *Stagonosporopsis valerianellae*; e seis espécies de leveduras: *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodomaia ohmeri* e *Trichosporon asahiu*. O fungo *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram os microrganismos de maior ocorrência nas amostras da própolis provenientes da Baía do Iguape, Brasil.

Palavras-chave: abelhas, fungos, endonucleases, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Candida sp.*

Identification of molds and yeasts found in propolis from Iguape Bay, Brazil

ABSTRACT: This study aimed identify fungi found in propolis produced by *Apis mellifera* in Iguape Bay of Iguape, Brazil. For that, morphological, biochemical and molecular techniques were used. The fungi growth visible characteristics were investigated in Petri dishes. Yeasts were identified using API 20C AUX galleries. For the molecular analysis the restriction profile generated by internal transcribed spacer (ITS1 and ITS4) was investigated. The size of PCR products were analyzed by restriction profile obtained with endonuclease (HhaI, HaeIII and HinfI) for each species. Sixteen species of filamentous fungi were identified: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium* sp., *Coniothyrium sidae*, *Didymella* sp., *Flavodon flavus*, *Fusarium incarnatum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraphoma fimeti*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium citrinum*, *Phoma medicaginis*, *Phoma* sp., *Stagonosporopsis cucurbitacearum* and *Stagonosporopsis valerianellae*; and six species of yeasts: *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodomaia ohmeri* and *Trichosporon asahii*. The *Stagonosporopsis cucurbitacearum* fungus and yeast belonging to the genus *Candida* were the most found microorganisms in propolis samples from Iguape Bay, Brazil.

Keywords: bees, fungi, endonucleases, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Candida* sp.

INTRODUÇÃO

Os produtos apícolas apresentam compostos químicos que lhes conferem propriedades biológicas de interesse tanto para as indústrias farmacêuticas quanto de alimentos. A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas em diversas fontes vegetais, constituída por compostos químicos, aminoácidos e substâncias inorgânicas, despertando interesse para os estudos sobre seu potencial biológico (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

Vários estudos relatam as propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais da própolis (WANG et al., 2015; DE LIMA et al., 2016; EBEID et al., 2016; MAZIA et al., 2016). No entanto, estes estudos são realizados nos extratos da própolis, havendo, portanto, carência de estudos que evidenciem sua característica *in natura*.

Fungos filamentosos e leveduras são microrganismos de grande importância ecológica e agrônômica. Estes microrganismos apresentam efeitos econômicos fundamentais para a utilização em processos biotecnológicos, por meio de seus metabólitos, para a produção de bebidas e alimentos, vacinas, enzimas e drogas naturais e sintéticas para a saúde (TORTORA et al., 2012). Além disso, são microrganismos amplamente utilizados no controle biológico e processos de biorremediação e bioprospecção, que podem gerar a descoberta de novas espécies agronomicamente promissoras (HUMBER et al., 2016).

Os fungos presentes no ambiente podem ser isolados, quantificados e identificados a fim de se estabelecer a sua biodiversidade e tipo de relação ambiental. Os métodos para pesquisas que envolvem a classificação e diferenciação incluem as técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares (KIM et al., 2011). As técnicas moleculares possibilitam uma abordagem complementar e abrangente em relação às técnicas convencionais que englobam os métodos morfológicos e bioquímicos, permitindo elucidar características da variabilidade genética e taxonômica das espécies (DAS et al., 2014).

As características morfológicas são de fundamental importância para a identificação dos fungos, relatando aspectos indispensáveis para a realização de uma classificação macro e microscópicas, além de definir sobre sua velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida) (KIM et al., 2011). O mesmo não ocorre

na identificação das leveduras, que deve ser realizada, principalmente, por características fisiológicas e/ou moleculares, visto que, sua morfologia não é diversificada, dificultando a distinção entre os gêneros (MINAMI et al., 2003; STUBIGER et al., 2016).

A utilização do espaçador interno transcrito (ITS) para amplificação e sequenciamento do DNA ribossomal, representa uma ferramenta útil na identificação de espécies de fungos e plantas, tanto patogênicas quanto simbiotes, auxiliando na inferência do potencial biotecnológico destes microrganismos, pois apresenta vasta descrição nos bancos de dados públicos (PORTER; GOLDING, 2011).

O objetivo deste trabalho foi identificar os fungos isolados da própolis proveniente de *Apis mellifera* da Baía do Iguape, Bahia, Brasil. Este estudo é de grande importância, visto que é a primeira abordagem realizada para a própolis da região, discernente à identificação da microbiota fúngica presente neste produto.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de própolis de *Apis mellifera* foram realizadas mensalmente entre os meses de agosto de 2014 à julho de 2015 em três apiários situados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil (12° 45' S; 38° 53' W), somando 36 amostras no total.

Isolados de fungos filamentosos presentes nas amostras coletadas foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Agar) 50%. Estes isolados foram preservados em B.O.D, em duplicata, pelo método de Castellani (1963). Para o cultivo dos isolados de leveduras foi utilizado o meio Ágar DG-18 (Dichloran Glycerol) e conservados em água e glicerol 20%.

Após ativar em meio sólido nas placas de Petri, os isolados fúngicos foram agrupados de acordo com suas características macroscópicas, tais: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda, condições de crescimento e aspectos visíveis do desenvolvimento; e características microscópicas como o comprimento e forma dos conidióforos, textura e tamanho dos conídios.

Para a identificação das leveduras foi utilizado o kit API 20C AUX (BioMérieux). A galeria API 20C AUX engloba 20 cúpulas que contêm substratos desidratados para efetuar 19 testes de assimilação. Após cultivo em meio YEPD durante 48 horas, procedeu-se a preparação dos testes conforme indicado no protocolo do fabricante. Após preenchimento das cúpulas com a suspensão, as galerias foram incubadas a 27°C e os resultados observados após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados foram interpretados de acordo com a turbidez de cada cúpula e a identificação foi obtida a partir de um perfil numérico constituído por sete algarismos, a partir da base de dados (V 4.0) do programa *apiweb*. Para a identificação dos fungos filamentosos foi utilizada a técnica molecular a com extração do DNA.

Extração do DNA

As extrações de DNA foram efetuadas em tubos *ependorf* de 1,5 mL, sendo utilizada a técnica de extração do DNA genômico com nitrogênio líquido. Após crescimento em meio BDA durante 6 dias, foi realizada a extração dos micélios fúngicos. O processo de extração consistiu na utilização de uma solução de lise: Tris-HCL 200 mM; EDTA 25 mM; NaCl 250 mM e SDS 0,5 (p/v); seguido de uma desnaturação de proteínas com fenol/clofórmio/álcool-isoamílico (25:24:1) e precipitação do DNA por lavagem com etanol (100% e 70%) a -20°C, sendo o sedimento de DNA posteriormente dissolvido em água ultrapura autoclavada.

Após adicionados 0,2 mL de TE, efetuou-se uma centrifugação durante 5 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado 1 mL de etanol 100%, a mistura ocorreu, manualmente, por inversão. O material foi centrifugado durante 2 minutos e ressuspenso em 0,4 mL de TE pH 8,0. Foi adicionado 30 µg de RNase e incubado durante 5 minutos a 37 °C. Após limpeza do RNA, a mistura foi incubada durante 30 minutos em temperatura de -80°C, adicionado 10 µL de acetato de sódio 4M e 1 mL de etanol 100%. Foi misturado manualmente por inversão e em seguida centrifugado durante 2 minutos. O precipitado foi lavado com 0,5 mL de etanol 70%. Por fim, foi ressuspenso em 30 µL de TE.

Quantificação de DNA

Para a quantificação do DNA foi realizada uma leitura a 260 nm em espectrofotômetro. Este método baseia-se na quantidade de radiação absorvida pelas bases nucleotídicas constituintes de DNA, segundo a lei de Lambert -Beer:

$$A = c.L\varepsilon$$

Sendo A - absorvância da solução; c - concentração solução; L - percurso ótico atravessado pela radiação (1 cm); ε – absortividade específica ($9,6 \times 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

As leituras das densidades óticas foram efetuadas a dois comprimentos de ondas, 260 nm e 280 nm. Sendo assim, o grau de pureza do DNA foi calculado através da razão entre os valores de absorvância (A_{260}/A_{280}). Após a obtenção das leituras espectrofotométricas foram efetuados os cálculos baseados na equação descrita acima, obtendo - se a concentração final de DNA de 80 ng / μl .

Primers e Digestão com enzimas de restrição

A região de interesse foi amplificada utilizando aparelho termociclador UNO II Biometra® Thermocycler. Os pares de primers usados para amplificação da região ITS foram ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3 ').

Os produtos de PCR (cerca de 0,5 - 1,0 mg) foram digeridos sem outra purificação, com as enzimas de restrição endonucleases de *HhaI*, *HaeIII* e *Hinf I* (Promega, Madison, Wisamostras foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Os fragmentos foram separados em 1,5% e 3% de géis de agarose, respectivamente, com 1 x TAE (Tris-ácido acético-EDTA). A dimensão dos fragmentos foi estimada em pares de bases por comparação com o marcador de tamanhos de 100 bp Ladder (Promega) no programa NEBcutter, versão 2.0, é um programa disponível através de um servidor livre da web <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

Visualização e purificação por Gel de agarose

A visualização e separação dos fragmentos de DNA foram realizadas mediante eletroforese em gel de agarose (0,8%) p/v. Os géis foram preparados com TAE 1X (Tris acetato 40 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM) com greenSafe (NZYTech),

durante 40 minutos a uma intensidade de corrente de 80V. Após a irradiação do gel por ultravioleta visualizou - se o tamanho de intensidade das bandas pretendidas por comparação com o marcador molecular (1KB).

As purificações dos produtos PCR (Polymerase Chain Reaction) foram feitas por meio do Kit comercial PCR Clean - UP System (Promega®). A purificação de DNA consiste na passagem da amostra por uma coluna de cromatografia, na qual, os ácidos nucleicos ficam retidos na membrana de sílica, e através de uma solução de lavagem, foram eliminados os componentes da mistura de PCR. Por fim, o DNA foi eluído numa solução de água livre de nucleases.

As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 55,5°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 2 min; e extensão final a 72°C durante 10 minutos, utilizando 100 ng de DNA genômico, 0,5 mM de cada iniciador, 10 mM desoxinucleótidos, MgCl₂ 1,5 mM, 0,3 µl de Taq polimerase, e tampão Buffer (10X).

Caracterização molecular e análises filogenéticas

As sequencias completas dos nucleotídeos foram realizadas no Laboratório 314 do serviço de sequenciação de DNA, na Universidade de Salamanca (USAL), Salamanca - Espanha. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas no programa BioEdit (*European Bioinformatics Institute, EBI*). A sequência final dos fragmentos foram analisadas e identificadas de acordo com o GenBank à partir das sequências nucleotídicas obtidas pelo programa FASTA (PEARSON; LIPMAN, 1988) disponibilizado na web pelo European Bioinformatics Institute (EBI) e nas bases de dados da EMBL (European Molecular Biology Laboratory). O alinhamento das sequências e a árvore filogenética foram geradas no programa Mega 7.0 (KUMAR et al., 2016), a construção da árvore seguiu o método Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) utilizando a técnica da Máxima Probabilidade Composta (TAMURA et al. 2004).

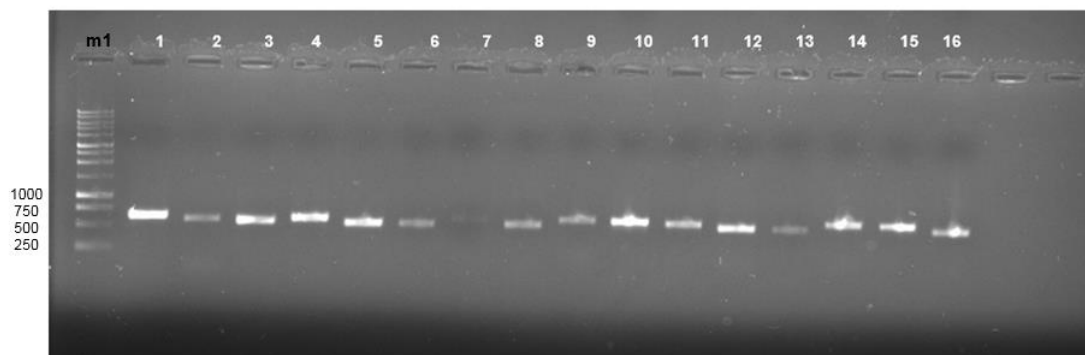
Para a análise descritiva das sequências utilizou-se o programa DnaSP v.5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) com número de haplótipos mitocondriais (h), o índice de diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e diferenças nucleotídicas (k).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 16 espécies de fungos filamentosos e 06 espécies de leveduras. Entre os fungos identificados, observaram-se duas espécies de cada um dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Stagonosporopsis*. Foram também identificados fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Coniothyrium*, *Didymella*, *Flavodon*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Paraphoma*. Relativamente às leveduras foram identificadas três espécies do gênero *Candida* e uma de cada um dos gêneros: *Cryptococcus*, *Kodomaia* e *Trichosporon*.

A figura 1 apresenta o produto amplificado obtido por PCR do DNA das 16 espécies de fungos filamentosos analisados. Podemos constatar que todos os isolados têm 750 e 500 pares de bases.

Figura 1 – Tamanho dos produtos amplificados por PCR do DNA dos fungos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil (m1: corresponde ao marcador molecular de 1 kb Ladder da Promega).



Após o alinhamento foi obtida uma matriz de 751pb, com frequência nucleotídica média de Timina = 31,45%, Adenina = 26,74%, Citosina = 20,34% e Guanina = 21,47%. A diversidade haplotípica (H_d) foi considerada alta, com valor médio de 1,00; a diversidade nucleotídica (π) foi 0,33 e o número médio de diferenças nucleotídicas foi (K) 83,79. Para os testes de neutralidade o D de Tajima (TAJIMA 1989) apresentou valor de -0,63 ($P > 0,10$). O teste de Fu e Li, valor de -0,31, estatisticamente não significativos ($P > 0,10$).

Os principais resultados obtidos com este estudo estão sumarizados na tabela 1 que demonstra a identificação das espécies de fungos filamentosos isolados da própolis e na figura 2 podemos constatar a quantidade de isolados dentro de cada uma destas espécies.

Na tabela 1 apresentam-se também as espécies de fungos filamentosos identificadas de acordo com o GenBank à partir das sequências nucleotídicas obtidas. Foi constatado que a espécie *Stagonosporopsis cucurbitacearum* esteve presente em aproximadamente 25% das amostras analisadas, além de ter sido encontrado em todos os apiários avaliados. Segundo Stewart et al. (2015) *S. cucurbitacearum* (syn. *Didymella bryoniae*), é um patógeno causador do crestamento gomoso em hastes e folhas, causando a podridão negra dos frutos em cucurbitáceas. Trata-se de um fungo de ocorrência mundial que infecta vários tipos de cucurbitáceas, incluindo melancia (*Citrullus lanatus*), pepino (*Cucumis sativus*), mamão (*Carica papaya*) e melão (*Cucumis melo*).

Tabela 1- Resultados obtidos com a sequenciação da região ITS para os fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil, e tamanho em pares de bases (pb) dos produtos de PCR.

ESPÉCIE	GenBank	pb
<i>Aspergillus nomius</i>	DQ323036	493
<i>Aspergillus versicolor</i>	KC460863	508
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KR673902	504
<i>Cladosporium sp.</i>	HQ006134	646
<i>Coniothyrium sidae</i>	KF251149	484
<i>Didymella sp.</i>	DQ092504	475
<i>Flavodon flavus</i>	KF856505	531
<i>Fusarium incarnatum</i>	AB975330	540
<i>Paecilomyces variotii</i>	FJ895878	538
<i>Paraphoma fimeti</i>	KJ701533	548
<i>Penicillium chermesinum</i>	KM405640	525
<i>Penicillium citrinum</i>	JF343217	542
<i>Phoma medicaginis</i>	KF060273	553
<i>Phoma sp.</i>	HQ637319	483
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	KM246252	482
<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	KP128007	488

Para confirmação dos resultados foi realizado o perfil das endonucleases de restrição *HhaI*, *Hae III* e *HinfI* nas sequências de nucleotídeos obtidas dos fungos filamentosos e conferidos de acordo com o banco de dados NEBcutter (VINCZE et al., 2003). Os 16 produtos de PCR obtidos através da amplificação da sequenciação das regiões ITS apresentaram de 475 a 646 pb, sendo clivados com as enzimas *HhaI*, *Hae III* e *HinfI*. Considerando-se os fragmentos com tamanho acima de 100 pb, foi possível observar de 2 a 3 clivagens por enzima de restrição utilizada (tabela 2). A enzima *Hae III* não clivou os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella sp.*, *Flavodon flavus*, *Phoma sp.*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e *Stagonosporopsis valerianellae*.

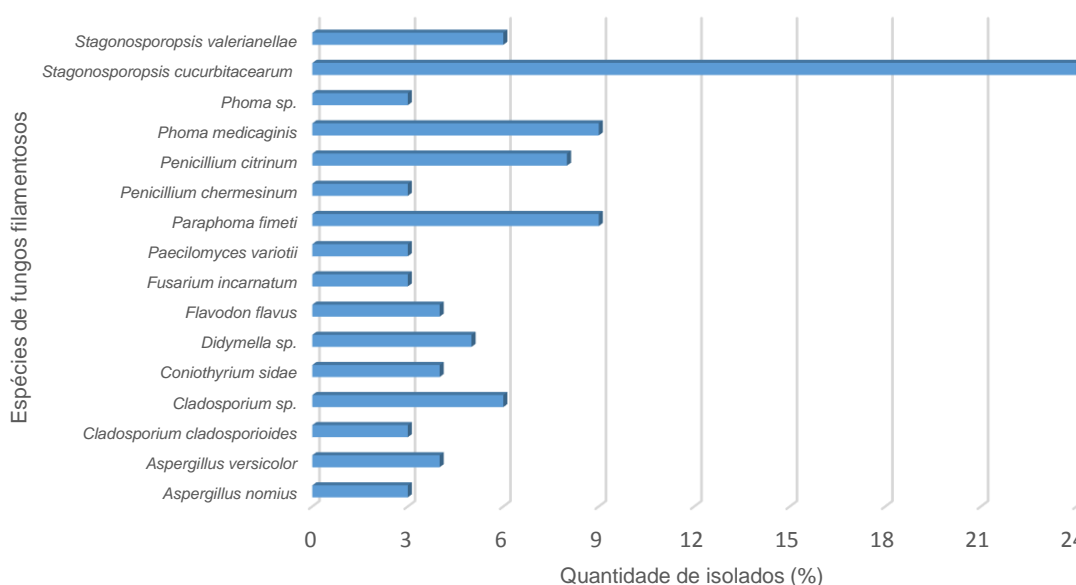
Tabela 2 - Tamanho dos pares de bases (pb) dos produtos de PCR e os fragmentos de restrição obtidos à partir da análise 5.8S-ITS das espécies e fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil.

Espécie	AP (bp)	Fragmentos de Restrição		
		<i>HhaI</i>	<i>Hae III</i>	<i>HinfI</i>
<i>Aspergillus nomius</i>	493	183+183+126	294+199	244+241
<i>Aspergillus versicolor</i>	508	249+177	352+156	273+118+117
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	504	263+241	ND	262+242
<i>Cladosporium sp.</i>	646	293+247+106	398+248	448+353
<i>Coniothyrium sidae</i>	484	241+193	ND	212+147+123
<i>Didymella sp.</i>	475	213+140+104	ND	202+149+124
<i>Flavodon flavus</i>	531	416+115	ND	206+177+148
<i>Fusarium incarnatum</i>	540	263+249	189+161+132	357+183
<i>Paecilomyces variotii</i>	538	295+243	281+162	287+251
<i>Paraphoma fimeti</i>	548	183+172+154	287+262	371+178
<i>Penicillium chermesinum</i>	525	182+193+151	351+175	270+256
<i>Penicillium citrinum</i>	542	320+181	252+203	371+171
<i>Phoma medicaginis</i>	553	183+172+155	310+243	374+179
<i>Phoma sp.</i>	483	241+229	ND	212+149+123
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	482	239+179	ND	210+149+123
<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	488	239+186	ND	210+156+123

As espécies *Phoma medicaginis*, *Paraphoma fimeti* e *Phoma sp.* estiveram presentes nas amostras da própolis em quantidades, também, consideráveis (21%). O gênero *Phoma* (pleosporales) inclui mais de 2000 espécies que estão agrupadas em nove seções *Phoma*, *Heterospora*, *Paraphoma*, *Peyronellaea*,

Phyllostictoides, *Sclerophomella*, *Plenodomus*, *Macrospora* e *Pilosa*, de acordo com suas características morfológicas. No Brasil este patógeno está bastante relacionado às manchas das folhas do cafeeiro. O grupo *Paraphoma* é altamente polifilética dentro da ordem pleosporales e inclui os gêneros *Coniothyrium* (Coniothyriaceae), *Paraphoma*, *Setophoma* (Haeosphaeriaceae), *Pyrenochaeta* e *Pyrenochaetopsis* (Cucurbitariaceae) (DE GRUYTER et al., 2010; DE GRUYTER et al., 2012; CHEN et al., 2015). Os compostos ativos de espécies de *Phoma* apresentam grande potencial para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos (HUSSAIN et al., 2014).

Figura 2 - Quantidade de isolados obtidos dentro de cada espécie de fungo filamentososo isolado da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil.



O fungo *Cladosporium cladosporioides* foi observado em 3,1% dos isolados analisados. Diversos fungos endofíticos apresentam potencial de síntese para metabólitos bioativos que podem ser utilizados como potencial terapêutico na formulação de novos fármacos antimicrobianos (SETO et al., 2005). Khan et al. (2016) relatam a ação antibacteriana de metabólitos extraídos do *C. cladosporioides* endofíticos da *Rauwolfia serpentina* no controle de *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O *Paecilomyces variotii* também ocorreu em 3,1% dos isolados obtidos da própolis. Pertencente ao Filo Ascomycota, membro da família Trichocomaceae, este fungo pode ser encontrado em alimentos, no ar, em madeira e no solo. Madeira et al. (2011) relatam a importância do *P. variotii* para produção de tanase e fitase, que são enzimas muito importantes usadas na produção de alimentos para animais. Estes investigadores analisaram a produção enzimática utilizando o processo de fermentação em estado sólido, inocularam o resíduo tóxico de mamona, um resíduo tóxico e subproduto da produção do biodiesel do Brasil, com uma estirpe de *P. variotii*.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* somaram 18,52% dos isolados encontrados nas amostras da própolis. Algumas espécies destes fungos apresentam importância econômica por serem produtores de diversos metabólitos e enzimas de considerável valor na indústria biotecnológica (HOUBRAKEN et al., 2014), que exercem função biológica benéfica para a indústria farmacêutica e ambiental, todavia algumas espécies destes gêneros são patógenos. De fato, algumas espécies de *Aspergillus* produzem aflatoxinas, causando preocupação aos produtores, processadores e comerciantes, devido às perdas econômicas nos produtos infectados e aos riscos para a saúde pública. *Aspergillus nomius*, foi constatado em 3% das amostras avaliadas, sendo uma espécie produtora de aflatoxinas que é uma substância cancerígena e pode causar problemas de saúde humana. Técnicas adequadas de triagem das plantas, processamento, colheita e secagem dos frutos são necessárias para evitar a contaminação e proliferação dos fungos em campo (CALDERARI et al., 2013).

Nesta investigação a ocorrência do *Penicillium citrinum* foi de 8,2%. Por ser um fungo mesófilo ocorre em todo o mundo. *P. citrinum* produz citrinina, uma micotoxina que apresenta ação nefrotóxica, e tem como principal função a inibição do crescimento de bactérias (HOUBRAKEN et al., 2010).

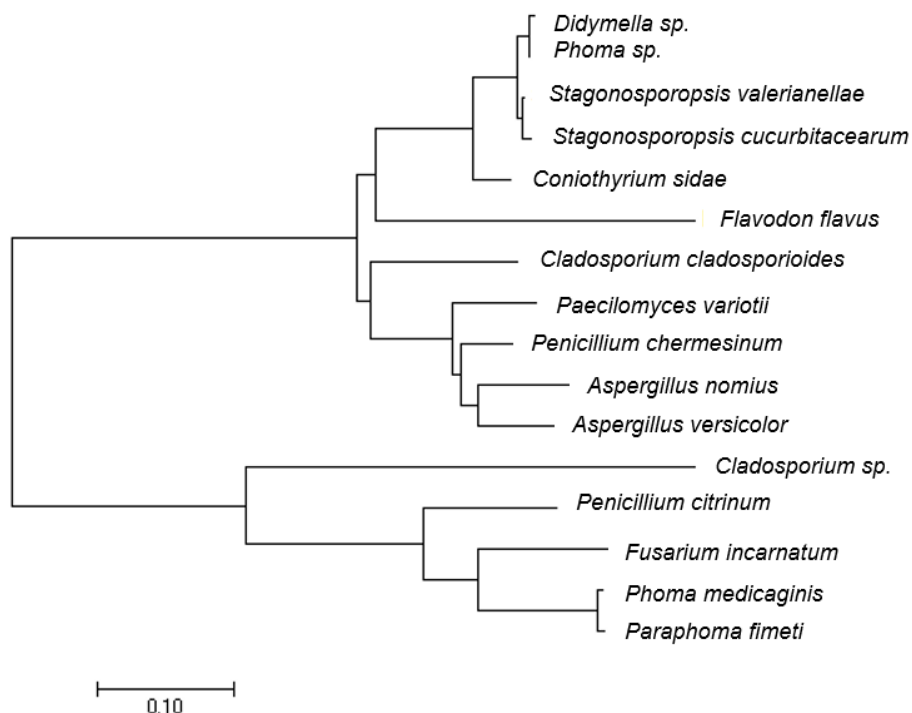
Na própolis avaliada, *Aspergillus versicolor* e *Fusarium incarnatum* estavam presentes em 4,12 % e 3,1% dos isolados, respectivamente. Estudos sobre a tolerância a fenol de estirpes fúngicas de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Graphium* sp., relatam que estas apresentaram elevada taxa de degradação (SANTOS; LINARDI, 2004). Karatay e Donmez (2014) constataram que *A. versicolor* pode tolerar altas concentrações de fenol, apresentando eficiência de

remoção de 41,6% ao fim de 144 horas de incubação, sugerindo que este fungo apresenta potencial para biorremediação. *P. chermesinum* foi também encontrado nas amostras da própolis analisadas (3,1%).

Na figura 4, observam-se as relações evolutivas das taxas, expressas à partir da árvore filogenética Neighbor-Joining gerada à partir dos dados de sequenciação identificados com o auxílio do GenBank. Os fungos *Flavodon flavus* e *Cladosporium sp.* apresentaram seções isoladas dos demais, demonstrando pouca similaridade filogenética entre suas sequências nucleotídicas.

Didymella sp. e *Phoma sp.*, apresentam-se em diferentes posições de agrupamento em relação à *Phoma medicaginis* e *Paraphoma fimeti*, o que sugere haver diferenças filogenéticas e/ou evolutivas entre estas espécies. Em 2009, a família Didymellaceae foi introduzida como tal, incluindo, o gênero *Didymella* e os membros de *Phoma* relacionados à sua forma assexuada. Algumas espécies do gênero *Phoma* não podem ser classificadas como pertencentes à Didymellaceae, devido a diferenças filogenéticas. O gênero *Phoma* apresenta uma grande diversidade de espécies podendo ser encontrado no solo, no ar, nas plantas e nos animais, inclusive em seres humanos (CHEN et al., 2015).

Figura 4 - Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências da região ITS dos fungos filamentosos isolados da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil, construída no programa MEGA 7.0.



A identificação das leveduras isoladas da própolis foi efetuada por meio da análise bioquímica. Devido à rapidez e ao baixo custo dos kits de identificação de leveduras, este método é bastante utilizado em diagnósticos clínicos, industrial e para controle de qualidade (CARVALHO et al., 2010).

Observou-se a ocorrência das seguintes espécies: *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodoma ohmeri* e *Trichosporon asahiu*. *Candida* é uma levedura que pode ser facilmente encontrada no corpo do homem e de animais, colonizando a pele e mucosas dos tratores digestivo e urinário, bucal e genital. Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* tem sido relatada como a mais comum, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PANIZO et al., 2009; HORN et al., 2009). Devido às dificuldades em identificar os fatores de virulência que contribuem para a colonização efetiva e processo infeccioso causado por *Candida* sp., torna-se difícil tratar este tipo de infecção, pois o homem apresenta vias metabólicas muito semelhantes às da espécie *C. albicans*, por exemplo. Por este

motivo, torna-se difícil o direcionamento de atuação dos antifúngicos para que não causem danos, também ao hospedeiro (WEBSTER; WEBER 2007; BARBEDO; SGARB 2010), por este motivo, estudos sobre a identificação das espécies é fundamental para o direcionamento das pesquisas para desenvolvimento do combate adequado aos microrganismos infecciosos.

Há poucos relatos de pesquisas sobre identificação de fungos isolados da própolis. Uma pesquisa realizada em 2013 por DE SOUZA et al., relatou a existência de vinte e dois isolados, que após identificação foram testados para a produção de metabólitos antimicrobianos. Os autores identificaram as espécies: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium purpurogenum*, *Pestalotiopsis palustris*, *Tetracoccusporium paxianum* e *Trichoderma koningii*. Ressaltando, ainda, que a própolis é uma fonte promissora de fungos, que produzem agentes ativos contra bactérias particularmente, causadores de doenças transmitidas por alimentos contaminados.

CONCLUSÃO

O fungo filamentoso *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram os microrganismos de maior ocorrência nas amostras da própolis provenientes da Baía do Iguape, Brasil.

Este estudo elucidou a existência de fungos na própolis, contribuindo para o enriquecimento do banco de dados, pois gera informações sobre a detecção de variabilidade genética entre as espécies, à partir da região ITS, bem como seus padrões de restrição de endonucleases. Subsidiando, ainda, informação, sobre a importância econômica e potencial biotecnológico dos fungos isolados à partir desta matriz natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEDO, L. S.; SGARB, D. B. G. Candidíase. **DST: Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v.22, p.22 - 38, 2010.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: From rainforest to consumer, **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.267 - 272, 2013.

CARVALHO, M.; MEIRINHOS, S.; ESTEVINHO, L. M.; CHOUPINA, A. - Yeast species associated with honey: different identification methods. **Archivos de Zootecnia**, p.103 - 113, 2010.

CASTELLANI, A. A cultura da água de fungos patogênicos. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p.283 - 284, 1963.

CHEN, Q.; JIANG, J. R.; ZHANG, G. Z.; CAI, L.; CROUS, P. W. Resolving the *Phoma* enigma, **Studies in Mycology**, v.82, p.137 - 217, 2015.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, p.80 - 100, 2014.

DE GRUYTER, J. D.; WOUDEBERG, J. H. C; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY G. J. M; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v.102, p.1066 - 1081, 2010.

DE GRUYTER, J. D.; WOUDEBERG, J. H. C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Redisposition of Phoma-like anamorphs in Pleosporales. **Studies in Mycology**, v.75, p.1 - 36, 2012.

DE LIMA, G. G. ; SOUZA R.O. de; BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M. J. Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.1248 - 1257, 2016.

DE SOUZA, G. G.; PFENNING, L. H.; DE MOURA, F.; SALGADO, M.; TAKAHASHI, J. A. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. **Natural Product Research** (Print), v.1, p.1 - 3, 2013.

EBEID, S. A.; EI MONEIM, N. A. A.; EI-BENHAWY, S. A.; HUSSAIN, N. G.; HUSSAIN, M. I. Assessment of the radioprotective effect of propolis in breast cancer patients undergoing radiotherapy. New perspective for an old honey bee product, **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v.9, p.431 - 440, 2016.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia 41 in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.1695 - 1703, 2009.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomia de *Penicillium citrinum* e espécies afins. **Divers fúngicas**, v.44, p.117 - 133, 2010.

HOUBRAKEN, R. P. de V.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species, **Advances in Applied Microbiology**, v.86, p.199 - 249, 2014.

HUSSAIN, H.; KOCK, I.; AHMED, A. H.; AHMED, K. A. R.; ABBAS, G.; GREEN, I. R.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; SALEEM, M.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. J.; KROHN, K. Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, p.699 - 702, 2014.

HUMBER, R. A. Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents, **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.19, p.1019 - 1025, 2016.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. An economical phenol bioremoval method using *Aspergillus versicolor* and agricultural wastes as a carbon source. **Ecological Engineering**, v.73, p.224 - 328, 2014.

KHAN, I. H.; SOHRAB, H.; RONY, S. R.; TAREQ, F. S.; HASAN, C. M.; MAZID, A. Cytotoxic and antibacterial naphthoquinones from an endophytic fungus, *Cladosporium* sp. **Toxicology Reports**, v.3, p.861 - 865, 2016.

KIM, J. Y.; YEO, S. H; BAEK, S. Y; CHOI, H. S. Molecular and morphological identification of fungal species isolated from bealmijang meju. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1270 - 1279, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, p.1870 - 1874, 2016.

MADEIRA, J. V. Jr.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tanase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.102, p.7343 - 7348, 2011.

MAZIA, R. S; PEREIRA, R. R. de A.; FRANCISCO, L. M. B. de; NATALI, M. R. M.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; BRUSCHI, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T.

Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.113 - 121, 2016.

MINAMI, M.; KTA, M.; NAKAYA, T.; YAMAMOTO, T.; KURIYAMA, H.; IMANISHI, J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. **Microbiology and Immunology**, v.47, p.681 - 684, 2003.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP version 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451 - 1452, 2009.

PANIZO, M. M.; REVIKINA, V.; DOLANDE, M.; SELGRAD, S. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical Mycology**, v.47, p.137 - 143, 2009.

PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p. 2444–8, 1988.

PORTER, T. M.; GOLDING, G.B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, v.192, p. 775-782, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406 - 425, 1987.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R.; Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v.39, p.1001 - 1006, 2004.

SETO, Y.; KOGAMI, Y.; SHIMANUKI, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Production of phleochrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.69, p.1515 - 1519, 2005.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with propolis, **Food Hydrocolloids**, v.61, p.20, 2016.

STEWART, J. E.; TURNER, A. N.; BREWER, M. T. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. **Fungal Biology**, v.119, p.370 - 382, 2015.

STUBIGER, G.; WUCZKOWSKI, M.; MANCERA, L.; LOPANDIC, K.; STERFLINGER, K.; BELGACEM, O. Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping, **Journal of Microbiological Methods**, v.130, p.27 - 37, 2016.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585 - 595, 1989.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.101, p.11030 - 11035, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. I. **Microbiologia**, 10ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 331 - 339, 2012.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: um programa para clivar ADN com enzimas de restrição **Nucleic Acids Research**, v.31, p.3688 - 3691, 2003.

WANG, K.; HU, L.; JIN, X.; MA, Q.; MARCUCCI, M. C.; NETTO, A. A. L.; SAWAYA, A. C. H. F.; HUANG, S.; REN, W.; CONLON, M. A.; TOPO, D. L.; HU, F. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B, **Journal of Functional Foods**, v.19, p.464 - 478, 2015.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2007.

ARTIGO 3

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA BAÍA DO IGUAPE, BRASIL¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Brazilian Journal of Microbiology*

Atividade antibacteriana da própolis produzida na Baía do Iguape, Brasil

RESUMO: A procura por produtos naturais com ação antimicrobiana surgiu como uma alternativa viável para o controle de diversos patógenos de importância clínica. Neste contexto, diversas pesquisas com extratos de própolis têm sido realizadas com a finalidade de obter uma caracterização do produto. O presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana do extrato seco da própolis produzida por *Apis mellifera* proveniente da Baía do Iguape, Brasil no controle de cepas de bactéria Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. Para a análise da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica de microdiluição em placa e determinadas as concentrações mínimas inibitória e bactericida (CMI e CMB). Foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo Caldo Mueller Hinton, utilizando como solventes do extrato da própolis a água destilada, o etanol e o dimetilsulfóxido. Para todas as bactérias analisadas o etanol foi o melhor solvente para a própolis, seguido do dimetilsulfóxido. Todas as cepas estudadas foram inibidas por um ou mais tratamentos utilizados, sendo as bactérias Gram-positivas mais sensíveis aos efeitos da própolis do que as bactérias Gram-negativas. Os resultados obtidos para *Staphylococcus aureus* foram satisfatórios e propícios ao desenvolvimento de investigações mais aprofundadas, revelando que a própolis oriunda da Baía do Iguape apresenta expressiva ação antibacteriana.

Palavras-chave: antimicrobiana, bactérias Gram-positivo, bactérias Gram-negativo, microdiluição, Dimetilsulfóxido.

Antibacterial activity of propolis produced in Iguape Bay, Brazil

ABSTRACT: The demand for natural products with antimicrobial action has emerged as a viable alternative for the control of several pathogens of clinical importance. In this context, several researches with propolis extracts have been carried out with the purpose of obtaining a product characterization. The present work evaluated the antibacterial activity of the propolis dry extract produced by *Apis mellifera* from Iguape Bay, Brazil, in the control of Gram-positive bacteria strains: *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* and Gram-negative: *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. Microdilution technique was used to analyze bacterial activity and the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and CMB) were determined. A 96-well microplate containing Mueller Hinton Broth was used, using distilled water, ethanol and dimethylsulfoxide as the solvents of the propolis extract. For all the bacteria analyzed, ethanol was the best solvent for propolis, followed by dimethylsulfoxide. All the studied strains were inhibited by one or more treatments used, with Gram-positive bacteria being more sensitive to propolis effects than Gram-negative bacteria. The results obtained for *Staphylococcus aureus* were satisfactory and propitious to the development of deeper investigations, revealing that the propolis coming from Iguape Bay presents expressive antibacterial action.

Keywords: antimicrobial, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, microdilution, Dimethylsulfoxide.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto opoterápico elaborado pelas abelhas à partir de secreções vegetais que sofrem modificações enzimáticas após as abelhas adicionarem enzimas β -glicosidasas presentes em sua saliva, além de cera e pólen (BRASIL, 2003; UMTONG et al., 2011; FEÁS et al., 2014). Diversos trabalhos têm atribuído à própolis propriedades químicas e biológicas ativas à composição de diversos fármacos, cosméticos e aditivos alimentares, além de atividade antimicrobiana (DE LIMA et al., 2016) antiviral (MAZIA et al., 2016), antioxidante (WANG et al., 2015) e antitumoral (SAMIA et al., 2016).

A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com o local de coleta, a vegetação e a espécie de abelha que a produz (PARK et al., 2002; KAI et al., 2014). O material vegetal usado pelas abelhas na elaboração da própolis se encontra em uma variedade de compostos presentes nos exsudatos das plantas e materiais lipofílicos das folhas e brotos foliares, mucilagens, gomas, resinas e látex (BANKOVA et al., 2000; TYLKOWSKI et al., 2010).

Diante do aumento cada vez maior de microrganismos resistentes aos antimicrobianos semisintéticos e sintéticos, o uso de agentes antimicrobianos naturais como a própolis tem sido estudado. O foco das pesquisas tem sido assegurar a coerência farmacológica e esclarecer a composição e princípios ativos presentes na própolis, buscando melhorar a padronização deste apiterápico (SILVA et al., 2012).

Diversos autores têm relatado o efeito antibacteriano da própolis ressaltando ação mais eficiente contra bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas devido as diferenças químicas estruturais da parede celular bacteriana (TUKMECHI et al., 2010; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Um dos componentes responsável pela ação antimicrobiana da própolis é a galangina, um flavonóide que induz aumento na perda de potássio em *Staphylococcus aureus* devido a danos causados na membrana citoplasmática da bactéria, e mediante enfraquecimento da parede bacteriana com consequente lise osmótica (CUSHINIE; LAMB, 2005).

A remoção de impurezas macro e microscópicas se faz necessária antes da elaboração dos extratos que serão utilizados para testar a atividade antibacteriana

da própolis. A literatura relata também a importância quanto à escolha dos métodos de extração fazendo referência a várias metodologias, utilizando diferentes solventes, processos e temperaturas para aumentar a eficiência dos compostos bioativos e se obter coerência e padronização do produto final (DE LIMA et al., 2016).

O presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana dos extratos secos da própolis de *Apis mellifera* provenientes da Baía do Iguape, Brasil, contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*), utilizando diferentes solventes e concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de própolis de *Apis mellifera* foram realizadas mensalmente entre os meses de agosto de 2014 à julho de 2015 em três apiários situados no entorno da Baía do Iguape, Bahia, Brasil (12° 45' S; 38° 53' W). Uma área que pertence a segunda maior baía costeira do Brasil, com vegetação diversa onde predomina uma cobertura rasteira até arbórea. Foram coletadas 36 amostras de própolis, sendo 12 em cada apiário, e agrupadas de acordo com a temperatura e umidade do local, com o objetivo de obter amostras representativas do local em estudo. As análises antibacterianas foram realizadas à partir de nove *blands*, sendo três extratos por apiário, agrupados de acordo com os meses de coleta.

As amostras obtidas foram examinadas a fim de encontrar e excluir os restos de abelhas, madeira, planta e impurezas visíveis, sendo, em seguida, pesadas para elaboração dos extratos secos. Foi utilizada, também, uma amostra de própolis vermelha de *A. mellifera* obtida no município de Canavieira, Bahia, Brasil, como parâmetro comparativo aos resultados obtidos neste experimento.

Extrato seco da própolis

A produção do extrato hidroalcoólico de própolis seguiu a metodologia de Park et al. (1998) e Cabral et al. (2009). As amostras foram submetidas à extração em etanol 70% em banho ultrassônico. Após a extração, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante, evaporado em capela de exaustão e em seguida submetidas ao

dessecador com sílica para evaporação total, até manter peso constante para obtenção do extrato seco. Posteriormente foram pesadas e armazenadas em tubo *eppendorf* e acondicionadas em *freezer*.

Solventes

Para os testes da atividade antibacteriana, os extratos secos foram ressuspensos em água ultrapura esteril, em etanol 70% e Dimetilsulfoxido 25%.

Microrganismos e condição de cultura

Os microrganismos utilizados nos ensaios foram adquiridos no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil e na Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. Distribuídos entre quatro cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ESA 265; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *E. faecalis* NEPA 2015) e quatro Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *E. coli* ESA 23; *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Enteritidis NEPA 2015), conservadas em Agar Triptona de Soja (TSA) à temperatura de 10°C. As cepas que apresentam registro ATCC, foram designadas como sendo de referência e as cepas com códigos de laboratório (ESA ou NEPA) foram mencionadas como isoladas, por haverem sido isoladas do ambiente. Para ativar as estirpes foram utilizados os caldos BHI (*Brain Heart Infusion*) e nutriente (Caldo Nutritivo), incubando à temperatura de 37°C por 24h. Os inóculos para os ensaios foram preparados diluindo a massa de células em solução de NaCl a 0,85%, ajustada para a escala 0,5 *McFarland*, confirmada pela leitura espectrofotométrica a 580 nm.

Atividade antibacteriana

Para a análise da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica descrita por Morais et al. (2011), utilizando o Caldo Mueller-Hinton em microplacas de 96 poços. Os extratos diluídos nos solventes testados (água ultrapura, em etanol 70% e Dimetilsulfoxido 1:4), foram transferidos para o primeiro poço em uma concentração de 80 mg.mL⁻¹, e diluições sucessivas foram realizadas, obtendo-se as demais concentrações (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg.mL⁻¹). Para os tratamentos onde

foi utilizado o etanol 70%, as microplacas foram mantidas em fluxo laminar por 40 minutos para evaporação do etanol, diminuindo sua interferência como agente antimicrobiano. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. O antibiótico gentamicina a 0,1% foi usado como controle, além dos controles positivos (meio de cultura inoculado e meio de cultura com o solvente testado inoculado) e do controle negativo (meio de cultura sem inóculo). Após esse período, foram adicionados 20 µL de TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazolium) à 0,5% em todos os poços, em seguida, as microplacas foram incubadas à 37°C por 3 horas, em seguida foi realizada a leitura da concentração mínima inibitória (CMI), que é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo. A ausência de coloração nos poços indica a inibição do crescimento microbiano.

Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), foram utilizadas placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller-Hinton para plaqueamento de 20 µL do conteúdo dos poços onde houve inibição do crescimento microbiano. Para tanto, depois de inoculados os 20 µL do conteúdo dos poços onde houve inibição, as placas foram incubadas à 37°C durante 24 horas. Em seguida foi verificada, por meio da contagem das colônias, a presença de, no máximo 10 UFC. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Análise Estatística

Os resultados foram descritos com os valores médios \pm desvio padrão. As diferenças entre cada parâmetro foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Valores de p menor ou igual a 0,05 foram avaliados como estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos em mg.mL^{-1} , conforme dispostos na tabela 1 e nas figuras 1 e 2 para a concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB), sendo dispostos como amostra 1 para os extratos da própolis oriunda da Baía do Iguape e amostra 2 para os extratos da própolis vermelha. Todos os microrganismos avaliados com esta pesquisa foram inibidos

por diferentes doses de extrato de própolis utilizados. A análise estatística dos resultados, permitiu inferir que não houve diferença significativa entre os locais da coleta e nem entre as diferentes épocas (coletas) analisadas para as amostras provenientes da Baía do Iguape ($p=1,000$), porém houve diferença significativa entre os solventes empregados neste estudo e entre os diferentes microrganismos avaliados ($p < 0,001$).

Foi constatado que o etanol foi o melhor solvente para o extrato seco da própolis. Na tabela 1 observa-se que a inibição mais acentuada ocorrerá nas bactérias Gram-positivas, onde a menor CMI foi observada para *S. aureus*, sendo constatado uma CMI= $1,67 \pm 0,72$ mg.mL⁻¹ para a estirpe isolada e $8,33 \pm 2,88$ mg.mL⁻¹ para a cultura de referência. O mesmo comportamento foi observado para *E. faecalis*, onde o extrato da própolis apresentou concentração mínima inibitória de $5,0 \pm 0,0$ mg.mL⁻¹ para a bactéria isolada e $10,0 \pm 0,0$ mg.mL⁻¹ para a cultura de referência. Graikou et al. (2015) evidenciaram forte ação antibacteriana da própolis contra *S. aureus*, utilizando extrato alcoólico, ressaltando que nem sempre as diferenças químicas em amostras de própolis resultam em alterações drásticas em sua atividade antimicrobiana.

Tabela 1 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), expressos em mg.mL⁻¹, obtida no extrato seco de própolis nos solventes Etanol, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Água.

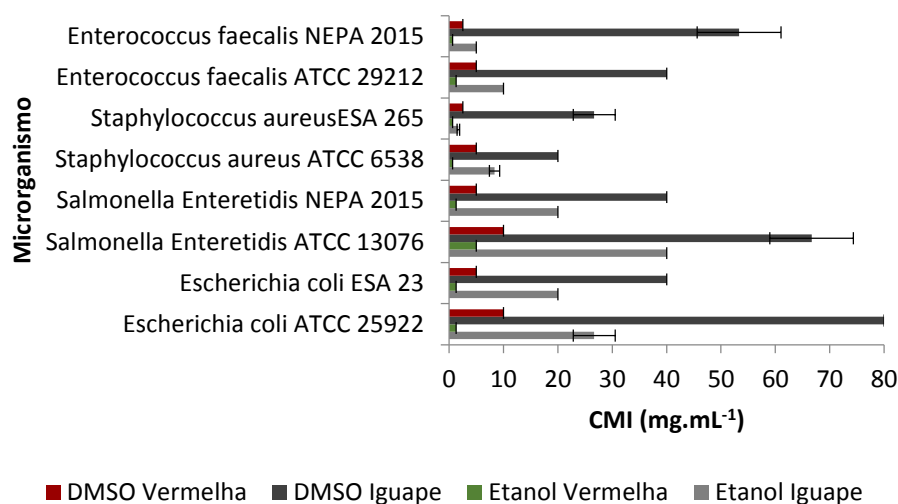
Microrganismo	Amostr a	CMI (média±desvio padrão)			CMB (média±desvio padrão)		
		Etanol	DMSO	Água	Etanol	DMSO	Água
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	26,67±11,54	80,0±0,0	NI	26,67±11,54	NI	NI
	2	1,25±0,0	10,0±0,0	20,0±0,0	5,0±0,0	10,0±0,0	NI
<i>Escherichia coli</i> ESA 23	1	20,0±0,0	40,0±0,0	NI	10,0±0,0	60,0±28,2	NI
	2	1,25±0,0	5,0±0,0	20,0±0,0	5,0 ± 0,0	10,0±0,0	NI
<i>Salmonella</i> Enteretidis ATCC 13076	1	40,0±0,0	66,67±23,1	NI	40,0±0,0	80,0±0,0	NI
	2	5,0±0,0	10,0±0,0	NI	10,0±0,0	20,00±0,0	NI
<i>Salmonella</i> Enteretidis NEPA 2015	1	20,0±0,0	40,0±0,0	NI	10,0±0,0	80,0±0,0	NI
	2	1,25±0,0	5,0±0,0	NI	10,0±0,0	20,00±0,0	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	8,33±2,88	20,0±0,0	NI	10,0±0,0	80,0±0,0	NI
	2	0,625±0,0	5,0±0,0	10,0±0,0	1,25±0,0	5,0±0,0	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ESA 265	1	1,67±0,72	26,67±11,54	NI	5,0±0,0	66,67±23,1	NI
	2	0,625±0,0	2,5±0,0	10,0±0,0	1,25±0,0	5,0±0,0	80,0±0,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	10,0±0,0	40,0±0,0	NI	26,67±11,54	80,0±0,0	NI
	2	1,25±0,0	5,0±0,0	NI	2,5±0,0	5,0±0,0	NI
<i>Enterococcus faecalis</i> NEPA 2015	1	5,0±0,0	53,33±23,1	NI	13,33±5,77	60,0±28,3	NI
	2	0,625±0,0	2,5±0,0	NI	2,5±0,0	5,0±0,0	NI

Amostra 1: extrato da própolis proveniente da Baía do Iguape; Amostra 2: extrato da própolis vermelha; NI = não houve inibição.

Todos os microrganismos analisados apresentaram sensibilidade aos extratos de própolis solubilizados em DMSO, ainda, que, em concentrações superiores aos dissolvidas em etanol. Para os microrganismos testados, apenas na cepa *E. coli* de referência não foi constatado efeito letal nas concentrações investigadas, vale ressaltar que este resultado foi obtido para as amostras da própolis proveniente da Baía do Iguape e não se confirma ao utilizar a própolis vermelha, que apresentou uma concentração bactericida de 10,0 ± 0,0 mg.mL⁻¹ contra à referida cepa. O dimetilsulfóxido é melhor solvente que a água para muitas substâncias como proteínas e esteróides (STURION et al.,1999), além disso elimina as desvantagens que o etanol apresenta em alterar as características sensoriais no produto (DE LIMA et al., 2016).

A figura 1 exibe os resultados obtidos para a CMI, resumindo os principais resultados em relação ao uso do etanol e DMSO como solventes das amostras de própolis analisadas, corroborando com os resultados discutidos anteriormente.

Figura 1 - Concentração mínima inibitória para cada microrganismo analisado, nos solventes Etanol e Dimetilsulfóxido (DMSO), resultados apresentados (média \pm erro-padrão da média) em mg.mL^{-1} .

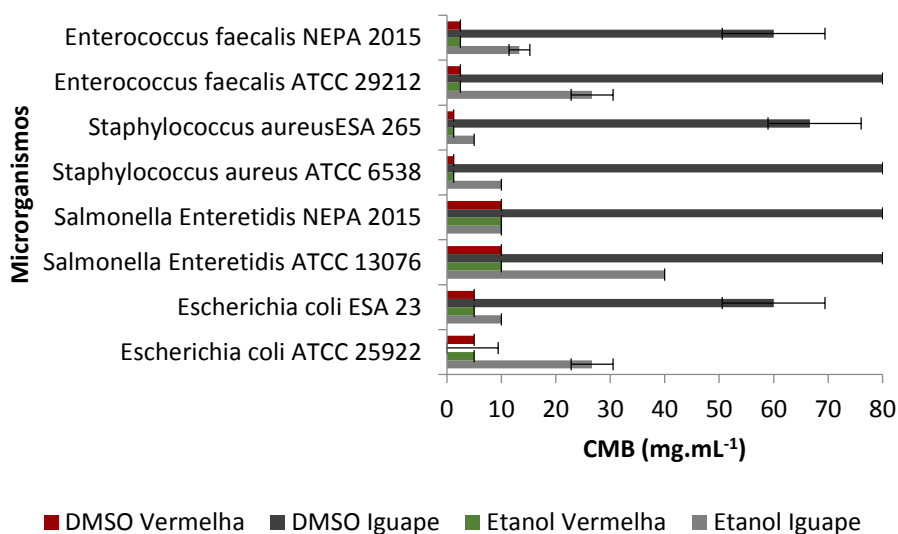


Os extratos solubilizados em água obtidos à partir da própolis vermelha evidenciaram efeito bacteriostático quer para as bactérias Gram-positivas quer para as Gram-negativas, sendo bactericida na concentração de 80 mg.mL^{-1} para a cepa *S. aureus* isolada. Para as amostras provenientes da Baía do Iguape não foram constatados efeitos inibitórios ao se utilizar água como solvente. A maior sensibilidade à própolis vermelha pode ser explicada pelo fato de que as amostras foram provenientes de regiões geográficas diferentes (SFORCIN; BANKOVA, 2011). A atividade antimicrobiana da própolis está intimamente relacionada ao solvente utilizado e ao método de extração empregado, pois seus componentes bioativos dependem da atuação sinérgica dos compostos fenólicos existentes nas amostras. Por esta razão, apesar dos componentes responsáveis pela ação antimicrobiana serem pouco solúveis em água, o ácido caféico apresenta solubilidade em água aquecida (JUG et al., 2014). Para as amostras provenientes da Baía do Iguape não foram constatados efeitos inibitórios ao se utilizar água como solvente. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as amostras foram provenientes de regiões geográficas diferentes (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Na figura 2 apresentam-se os resultados obtidos para a CMB ao serem utilizados os solventes etanol e DMSO, possibilitando uma verificação entre os

solventes que exibiram melhor eficácia tanto para a própolis da Baía do Iguape quanto para a própolis vermelha.

Figura 2 - Concentração mínima bactericida para cada microrganismo analisado nos solventes Etanol e Dimetilsulfóxido (DMSO), resultados apresentados (média \pm erro-padrão da média) em mg.mL^{-1}



Os resultados da pesquisa realizada por Sforcin et al. (2000), analisando os efeitos sazonais sobre a atividade antibacteriana da própolis corroboram aos obtidos no presente estudo. Os autores constataram que extratos etanólicos da própolis inibiram bactérias Gram-positivas em baixas concentrações (40 mg.mL^{-1}), enquanto que as bactérias Gram-negativas foram menos sensíveis, exigindo concentrações de 45 à 80 mg.mL^{-1} .

Os microrganismos avaliados foram mais sensíveis aos extratos da própolis vermelha em relação aos extratos oriundos da Baía do Iguape, confirmando também melhor efeito inibitório para as cepas Gram-positivas e para o solvente etanol. A CMI obtida para *S. aureus* independente das cepas serem de referência ou isoladas ao ser utilizado o etanol como solvente, foi de $0,625 \pm 0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. A própolis vermelha apresentou, também, resultados promissores em relação à CMI para a bactéria Gram-negativa *E. coli* ($1,25 \pm 0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), tanto para as estirpes de referência quanto para a isolada.

Várias pesquisas relatam o potencial antimicrobiano da própolis vermelha brasileira. Estudos com este produto identificaram 12 tipos de compostos químicos

que não foram encontrados em outros tipos de própolis, o que lhe confere um caráter único e fundamental para a utilização terapêutica (FREIRES et al., 2016). Alguns autores ao utilizarem o extrato da própolis vermelha brasileira constataram CMI para *S. aureus* de 3,8-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (OLDONI et al., 2011), além de sua eficácia no controle de outros microrganismos, como *Actinomyces naeslundii* (25-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *Streptococcus sobrinus* (<6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *S. mutans* (50-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (BUENO-SILVA et al., 2013), além de *E. coli* (TRUSHEVA et al., 2006) e *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA et al., 2014).

Os resultados evidenciaram também que independente do solvente utilizado nas amostras provenientes da Baía do Iguape, as cepas de referência evidenciaram maior resistência, necessitando de doses maiores para que ocorresse a inibição do crescimento microbiano. Este resultado difere do estudo realizado por Silva e colaboradores, em 2012, que encontraram concentrações de inibição menores para as culturas de referência, sugerindo o uso da própolis em microrganismos resistentes aos antibióticos. Hur et al. (2012) realizaram pesquisas com isolados clínicos de *Salmonella* sp. e demonstraram haver resistência a combinações de antimicrobianos, relatando, ainda, que os genes de resistência bacteriana atuam em diferentes sítios do cromossomo. No entanto, Barros et al. (2013) afirma que nos isolados microbianos que não são certificados, pode haver a probabilidade de sua presença ser apenas como colonizadores, defendendo que um germe encontrado no ambiente, pode ter subsistido às condições adversas, sendo insuficiente para expressar patogenicidade, em decorrência à técnicas empregadas para coleta, transporte e armazenamento.

Com relação aos resultados obtidos nos controles positivos avaliados, todos os microrganismos analisados foram inibidos com a utilização do etanol 70%. A constatação do etanol como bactericida para estes microrganismos deve-se, ao fato da metodologia utilizada neste estudo, padronizar um crescimento de até 10 UFC para definir a CMB, porém, vale ressaltar que nestes controles ocorreu o crescimento de 3 à 8 UFC, fato que não foi verificado quando se utilizou esse solvente com o extrato da própolis, o que sugere que os componentes da própolis interferem na ação bactericida. Outro fato que nos sugere que os efeitos inibitórios da própolis é que no caso da *E. coli*, o controle positivo do etanol, somente inibiu a cepa isolada, no entanto os valores relacionados à CMI nos tratamentos utilizando

etanol e própolis vermelha foram de $1,25 \pm 0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em ambas as cepas. Assim, mesmo sendo observado certo efeito bactericida com o uso do etanol como solvente, este é potencializado quando associado ao extrato de própolis.

O controle positivo do DMSO foi bactericida para *S. aureus* de referência (ATCC) e bacteriostático para *E. faecalis* e *Salmonella Enteritidis* isolados ambientais e de referência, não inibindo os demais. Para o controle positivo da água não foi observada inibição para os microrganismos analisados.

O controle positivo da gentamicina inibiu as bactérias Gram-negativas (com exceção da *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076) e não inibiu as bactérias Gram-positivas na concentração de 0,1%. Este fato se respalda no protocolo do fabricante deste antibiótico que o define como “um antibiótico bactericida da família dos aminoglicosídeos que age por inibição normal na síntese proteica de microrganismos suscetíveis: *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Klebsiella - Enterobacter - Serratia*, espécies de *Citrobacter* e espécies de *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Shigella*”.

CONCLUSÃO

Este estudo por ser a primeira abordagem da própolis proveniente da Baía do Iguape, Brasil, apresentou resultados satisfatórios em comparação aos dados obtidos com a própolis vermelha, mostrando que esta região apresenta potencial para a produção deste apiterápico. Foi constatado que o etanol foi o melhor solvente, seguido do dimetilsulfóxido, sendo que a utilização da água como solvente deve sofrer ajustes metodológicos para se alcançar resultados promissores.

Todas as cepas analisadas foram inibidas por um ou mais tratamentos utilizados, sendo as bactérias Gram-positivas mais sensíveis aos efeitos da própolis do que as bactérias Gram-negativas. Os resultados obtidos para *Staphylococcus aureus* foram satisfatórios e propícios ao desenvolvimento de investigações mais aprofundadas, revelando que a própolis oriunda da Baía do Iguape apresenta expressiva ação antibacteriana.

Os microrganismos de referência apresentaram maior resistência, sendo necessário concentrações mais elevadas para inibir o crescimento microbiano, o

que nos permite acreditar que há diferenças entre as cepas isoladas de alimentos, mostrando a importância de realizar estudos desta natureza com isolados provenientes de diferentes materiais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOVA V. S.; CASTRO S. L., MARCUCCI M. C. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p.3 -15, 2000.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos: consulta rápida**. 5ª Edição - Porto Alegre. Artmed, p. 26 - 27, 2013.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). **World J Microbiol Biotechnol**, v.28, p.1351 - 1358, 2012.

BRASIL. (ANVISA) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 132, de 29 de maio de 2003. **Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos**. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2003.

Website: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa, Brasil, 2001.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G. V. J.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.4546 - 4550, 2013.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, p.1523-1527, 2009.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal Ethnopharmacol**, v. 101, p. 243 - 248, 2005.

DE LIMA, G. G.; SOUZA R. O. de, BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A., DEVINE, D. M., NUGENT, M. J. Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p. 248 - 1257, 2016.

FEÁS, X.; PACHECO, L.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Use of propolis in the sanitization of lettuce. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p. 43 - 57, 2014.

FREIRES, I. A.; MATIAS DE ALENCAR, S.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINO, I.; Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? **LWT – Food Science and Technology**, v.65, p. 261-267, 2015.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review, **Food Research International**, v.45, p. 819 - 830, 2012.

JUG, M.; KONCIC, M. Z.; KOSALEC, I.; Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures, **LWT - Food Science and Technology**, v.57, p.530 – 537, 2014.

KAI, H.; OBUCHI, M.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; TSUTSUMI, S.; PARK, Y. K.; MATSUNO, K.; YASUKAWA, K.; KUROKAWA, M. In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). **Journal of Functional Foods**, v.8, p.214 - 223, 2014.

MAZIA, R. S; PEREIRA, R. R. de A.; FRANCISCO, L. M. B. de; NATALI, M. R. M.; FILHO, B. P. D.; C. V. NAKAMURA, BRUSCHI, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.113 - 121, 2016.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1096 - 1101, 2011.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v.77, p.208 - 213, 2011.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.18, p.313 - 318, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. e AGUIAR, C. L. Própolis Produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua Origem vegetal. **Ciência Rural** [online], v.32, p.997 - 1003, 2002.

SAMIA A. E.; NADIA A. A. M.; SANAA A. B.; NABILA G. H.; MERVAT I. H. Assessment of the radioprotective effect of propolis in breast cancer patients undergoing radiotherapy. New perspective for an old honey bee product, **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v.9, p.431-440, 2016.

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

SFORCIN, J. L.; FERNANDES, JR. A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.243 - 249, 2000.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis, **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.1790 - 1795, 2012.

SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; GOMES, M. Z.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Study of antibacterial action of hydroalcoholic extract of red propolis on *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.43, p.359 - 366, 2014.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with propolis, **Food Hydrocolloids**, v.61, p.21, 2016.

STURION, D. J.; PINHEIRO, E. R.; PARDO, E.; TANAKA, N. M. Efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos do dimetilsulfóxido em aplicações tópicas em cães. UNOPAR. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.1, p.41 - 47, 1999.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; ROCHA PASIN, F.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v.3, p.249 -254, 2006.

TUKMECHI, A.; OWNAGH, A.; MOHEBBAT, A. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of Iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.86 - 92, 2010.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration, **Journal of Membrane Science**, v.348, p.124-130, 2010.

UMTHONG, S.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p.30-37, 2011.

WANG, K.; HU, L.; JIN X. "Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B," **Journal of Functional Foods**, v.19, p.464-478, 2015.

ARTIGO 4

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS SOBRE FITOPATÓGENOS¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Neotropical Entomology*

Potencial antifúngico de extratos da própolis sobre fitopatógenos

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de extratos de própolis de *Apis mellifera*, sobre fitopatógenos. Foram coletadas três amostras de própolis, sendo duas amostras provenientes da Baía do Iguape, tendo sido coletadas no período seco e no período chuvoso do ano e uma amostra da própolis vermelha, proveniente de Canavieiras-BA. Os fitopatógenos testados foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium digitatum*. Foram utilizados como solventes para a extração dos compostos ativos da própolis: a água destilada estéril, o etanol 70% e dimetilsulfóxido 25%, em banho ultrasonificado e em temperaturas de 50°C e 70°C em banho-maria. Os extratos da própolis foram testados nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg.mL⁻¹, sendo calculado o índice de inibição do crescimento micelial e em seguida realizada análise estatística em esquema fatorial com quatro repetições. Os fungos *C. gloerosporieoides* e *P. digitatum* foram mais sensíveis aos extratos da própolis vermelha, sendo que para *C. gloerosporieoides* o extrato obtido em etanol ultrasonificado na concentração de 60 mg.mL⁻¹ demonstrou maior inibição, e, para o *P. digitatum*, o melhor método de extração foi a obtenção do extrato em etanol à 50°C, numa concentração de 100 mg.mL⁻¹. A própolis proveniente da Baía do Iguape demonstrou maior eficiência para o controle do *F. moniliforme*, quando foi utilizado etanol ultrasonificado em concentração de 100 mg.mL⁻¹.

Palavras chave: *Apis mellifera*; antimicrobiana; *Fusarium moniliforme*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Penicillium digitatum*.

Antifungal potential of propolis extracts on phytopathogens

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the antifungal activity of propolis extracts from *Apis mellifera*, on phytopathogens. Three samples of propolis were collected, two of which were collected in Iguape Bay and collected in the dry period and in the rainy season of the year and a sample of the red propolis from Canavieiras-BA. The tested phytopathogenic parasites were *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium digitatum*. The following compounds were used as extraction solvents: sterile distilled water, 70% ethanol and 25% dimethylsulfoxide in an ultrasonic bath at 50°C and 70°C in a water bath. The propolis extracts were tested at the concentrations of 40, 60, 80 and 100 mg.mL⁻¹, and the inhibition index for mycelial growth was calculated, followed by statistical analysis in a factorial scheme with four replications. The fungi *C. gloerosporieoides* and *P. digitatum* were more sensitive to the red propolis extracts, and for *C. gloerosporieoides* the extract obtained in ultrasonic ethanol at the concentration of 60 mg.mL⁻¹ showed greater inhibition, and, for *P. digitatum*, The best extraction method was to obtain the extract in ethanol at 50°C, in a concentration of 100 mg.mL⁻¹. The propolis from Iguape Bay demonstrated greater efficiency for the control of *F. moniliforme*, when using ultrasonic ethanol at a concentration of 100 mg.mL⁻¹.

Keywords: *Apis mellifera*; Antimicrobial; *Fusarium moniliforme*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Penicillium digitatum*.

INTRODUÇÃO

A própolis produzida pelas abelhas tem a finalidade de proteção das colmeias contra insetos e microrganismos, sendo depositada nas paredes internas da colmeia para vedar orifícios e rachaduras, responsável pela assepsia de alvéolos para a postura da abelha rainha e mumificação de insetos invasores (BANKOVA, 2005; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química e este é possivelmente o maior problema para a sua padronização. A composição química da própolis modifica com a flora da região, época de colheita, com a espécie da abelha e com o método empregado para obtenção dos extratos (QUIROGA et al., 2006; PASCOAL et al., 2014). Estudos com alguns tipos de própolis relataram atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, cicatrizante e antitumoral (FONTANA et al., 2004; SILVA et al., 2006; CASTRO et al., 2007; CABRAL et al., 2009; VICTORINO et al., 2009; MATTIUZ et al., 2015; MENEZES et al., 2016).

A atividade antimicrobiana da própolis é atribuída à ação dos compostos fenólicos, ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina (PASCOAL et al., 2014). Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis (CABRAL et al., 2009). Várias funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, como proteção contra a incidência de raios ultravioleta, ação antioxidante, inibição enzimática e proteção contra microrganismos patogênicos (MACHADO, 2008).

Microrganismos patogênicos causam diversos danos econômicos para a agricultura. Várias espécies de fungos pertencentes aos principais grupos filogenéticos (Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes) provocam importantes doenças de plantas e consideráveis perdas econômicas nas culturas (QUIROGA et al., 2006). Os controles para as doenças causadas por fungos são, geralmente, químicos, causando danos ambientais e à saúde humana, além de desencadear, após um período prolongado, a resistência do patógeno aos efeitos do fungicida (MENEZES et al., 2016).

Pesquisas incidem sobre os efeitos dos extratos da própolis no controle de doenças pós - colheita causadas por fungos patogênicos, pois age inibindo

fortemente o crescimento de micélios, induzindo alterações morfológicas anormais nas hifas, além de efeitos prejudiciais sobre a germinação dos esporos fúngicos, testificando seu uso como antifúngico natural (YANG et al., 2010; MARGHITAS et al., 2013).

Desta forma a própolis é um produto com potencial para ser utilizado no controle de fungos de pós-colheita para a agricultura, não só por suas propriedades químicas, mas também como um impedimento físico para a penetração dos micélios dos fungos, devido à formação de um filme protetor sobre os frutos (DEZMIREAN et al., 2003; MARGHITAS et al., 2013).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de extratos de própolis de *Apis mellifera* sobre fitopatógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas ao longo de 12 meses (agosto de 2013 à julho de 2014), amostras de própolis de *Apis mellifera* que foram adquiridas em apiários, situados no entorno da Baía do Iguape (Bahia) e em Canavieiras (Bahia), sendo distribuídas, neste estudo, em amostras 1 e 2 provenientes da Baía do Iguape, tendo sido coletadas em diferentes períodos do ano e amostra 3 proveniente de Canavieiras-BA. A amostra 1 foi resultado da mistura de amostras compostas coletadas entre os meses maio, junho e julho de 2014 e a amostra 2 foi originada à partir da mistura de amostras individuais entre os meses de dezembro de 2013, janeiro e fevereiro de 2014; a amostra 3 foi adquirida no mês de maio de 2014, trata-se da própolis vermelha, que apresenta propriedades antifúngicas comprovadas na literatura. Todas as amostras foram coletadas de maneira assépticas etiquetadas e encaminhadas ao Núcleo de Estudos dos Insetos (INSECTA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Preparo dos Extratos de Própolis

Foram testados três solventes para a extração, sendo água destilada estéril, etanol na concentração de 70% e dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 25%. Para produção dos extratos seguiu-se a metodologia proposta por Matsushige et al. (1996), sendo que, à cada 2g da própolis triturada e

homogeneizada foram adicionadas 25 mL do solvente desejado e a mistura incubada por 2 horas em temperaturas de 50 e 70°C em banho-maria (Marconi-MA 127) e à temperatura ambiente utilizando-se banho ultrasonificado (Unique USC-1400A). Os extratos foram homogeneizados em intervalos de 30 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada (Eppendorf 5430R) por dez minutos a temperatura de 20°C à 3000 rpm e filtradas em papel *Whatman*.

Análise da atividade antifúngica dos extratos de própolis

O efeito inibitório foi testado nas cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium digitatum* adquiridas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). O *C. gloeosporioides* foi isolado de *Citrus* (planta), o *F. moniliforme* foi isolado de *Ananas* e o *P. digitatum* de *Citrus* (fruto);

Foi utilizado o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (DHINGRA e SINCLAIR, 1996; OZCAN, 1999), para avaliação da inibição do crescimento micelial. Após autoclavagem os meios foram incorporados com os extratos nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg.mL⁻¹ e em seguida foram vertidos em placas de Petri. Posteriormente foi transferido um disco de cultura de 5 mm para o centro das placas. Os discos foram obtidos das margens das colônias com 7 dias, crescidos em BDA, para cada um dos fungos testados.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial com quatro repetições e como controle foi utilizado meio de cultura com o fungo em estudo e meios de cultura contendo somente os solventes analisados sem a adição da própolis com os respectivos fungos avaliados.

As placas foram incubadas a 25 ± 2°C, o crescimento micelial foi avaliado a cada três dias até que o tratamento controle atingisse a borda da placa. Foram realizadas duas medidas perpendiculares do diâmetro de cada colônia com o auxílio de um paquímetro e o percentual da inibição micelial foi calculado de acordo com a fórmula abaixo, sendo subtraído os 5 mm transferidos inicialmente para cada placa:

$I = ((C - T)/C) \times 100$, em que:

I = porcentagem de inibição

C = diâmetro da colônia testemunha (mm)

T = diâmetro da colônia em cada tratamento (mm)

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o proGrama R Development Core Team (2011). Foi aplicado o teste de normalidade dos resíduos Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma interação tripla significativa entre as amostras, a forma de extração e as concentrações utilizadas neste estudo para todos os fitopatógenos analisados, sendo *F. moniliforme* (p -valor: 0,757), *C. gloeosporioides* (p -valor: 5,643) e *P. digitatum* (p -valor: 0,0002), de acordo com o teste de normalidade dos resíduos Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$).

A tabela 1, mostra os resultados obtidos para o *F. moniliforme*, onde, para as amostras obtidas nas concentrações 40 e 60 mg.mL⁻¹ do extrato da própolis utilizando-se a água como solvente, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), independente da temperatura de extração submetida. No entanto, ao ser utilizadas concentrações mais elevadas (80 e 100 mg.mL⁻¹), foi constatado que, a concentração de 80 mg.mL⁻¹ exibiu melhores resultados em relação à utilização de 100 mg.mL⁻¹, revelando que a concentração ideal para este ensaio foi de 80 mg.mL⁻¹. Observa-se que, para a extração realizada em ultrasonificação foi obtido 53,50 % de inibição no crescimento fúngico para a amostra 2, que é proveniente da Baía do Iguape, e para a extração em banho-maria à uma temperatura de 50°C, a amostra 3 (própolis vermelha), exibiu uma inibição do crescimento fúngico de 51,4%.

A própolis inibiu o crescimento micelial do *F. moniliforme*, sendo que, a utilização do DMSO como solvente atingiu um desempenho satisfatório ao se empregar a concentração de 80 mg.mL⁻¹, chegando ao nível de 82,70% no processo de inibição do crescimento (amostra 1) ao ser utilizada uma temperatura de 50°C. Comportamento semelhante ao observado anteriormente com os tratamentos onde foi empregada a água como solvente à 70°C, onde houve um decréscimo acentuado na inibição do crescimento micelial quando ocorreu aumento na concentração da própolis utilizada.

A maior inibição do crescimento do *F. moniliforme* foi alcançada na extração realizada em etanol em ultrasonificação, revelando percentual inibitório de 88,66%. Foi constatado, ainda que os resultados obtidos com extração em etanol sofreram decréscimos ao se aplicar temperaturas de 50 e 70°C.

Tabela 1 - Dados percentuais de inibição do crescimento micelial para *Fusarium moniliforme*, submetidos à extração em água, dimetilsulfóxido e etanol em banho ultrasonificado e banho-maria à 50°C e à 70°C, nas concentrações de 40; 60; 80 e 100 mg.mL⁻¹.

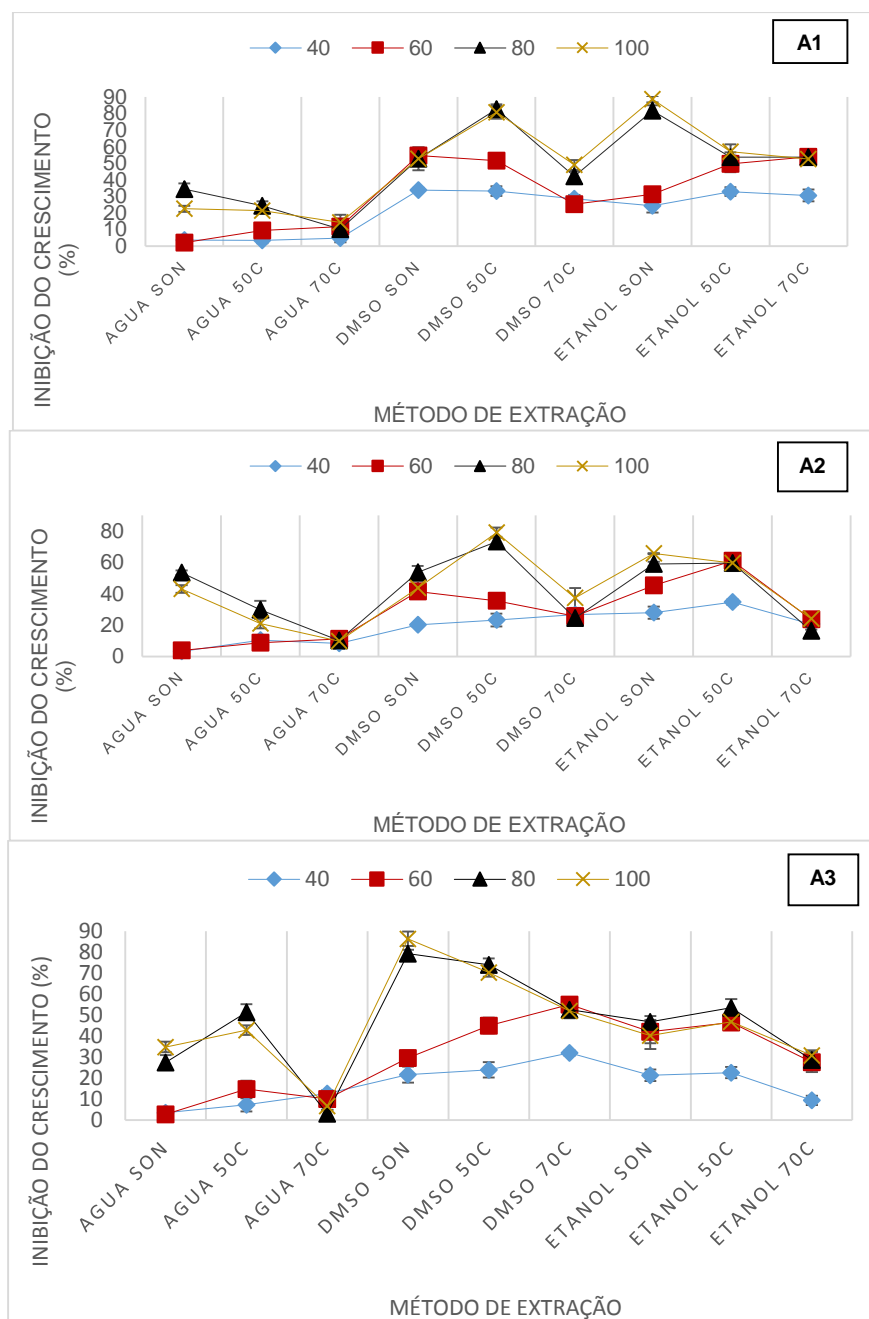
EXTRAÇÃO	AMOSTRA	CONCENTRAÇÕES (mg.mL ⁻¹)			
		40	60	80	100
Água Ultr	1	3,832 a	2,142 a	34,545 a	22,597 a
	2	3,312 a	3,823 a	53,505 b	43,117 a
	3	3,570 a	2,792 a	27,532 a	34,807 b
Água 50C	1	3,572 a	9,610 a	24,415 a	21,560 a
	2	10,39 a	8,832 a	29,872 a	21,040 a
	3	7,275 a	14,807 a	51,430 b	42,857 b
Água 70C	1	4,870 a	11,950 a	10,390 a	14,285 a
	2	8,310 a	11,170 a	10,130 a	9,872 a
	3	12,727 a	10,130 a	3,117 a	6,755 a
DMSO Ultr	1	33,962 a	54,715 a	52,830 a	52,830 a
	2	20,122 b	41,510 b	53,772 a	43,710 b
	3	21,382 b	42,140 b	46,855 a	40,250 b
DMSO 50C	1	33,332 a	51,572 a	82,702 a	80,817 a
	2	23,270 b	35,532 b	73,270 a	78,930 a
	3	22,642 b	46,540 a	53,460 b	46,857 b
DMSO 70C	1	28,617 a	25,472 a	42,140 a	49,057 a
	2	26,727 a	25,787 a	24,532 b	37,420 b
	3	9,435 b	27,675 a	28,615 b	30,820 b
Etanol Ultr	1	24,335 a	31,332 a	81,667 a	88,665 a
	2	21,667 a	29,667 a	79,335 a	86,335 a
	3	28,000 a	45,332 b	58,997 b	65,667 b
Etanol 50C	1	33,002 a	49,670 a	53,667 a	57,000 a
	2	24,002 a	44,997 a	74,000 b	70,335 b
	3	34,667 a	61,000 b	59,667 a	59,665 a
Etanol 70C	1	30,667 a	54,000 a	53,667 a	52,667 a
	2	32,000 a	55,000 a	52,667 a	51,997 a
	3	20,667 b	23,667 b	16,335 b	23,997 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna/extração, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0,05$). Extrações: Água Ultr = água em banho ultrasonificado; Água

50C = água em banho-maria à 50°C; Água 70C = água em banho-maria à 70°C; DMSO Ultr = dimetilsulfóxido em banho ultrasonificado; DMSO 50C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 50°C; DMSO 70C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 70°C; Etanol Ultr = etanol em banho ultrasonificado; Etanol 50C = etanol em banho-maria à 50°C; Etanol 70C = etanol em banho-maria à 70°C.

Na figura 1, pode ser percebido o quanto variou o percentual de inibição do *F. moniliforme* em cada amostra analisada, conforme as concentrações testadas, de acordo com o teste de Scott-Knott. Desta forma foi constatado que tanto para a amostra 1, quanto para a amostra 2, não houve diferença significativa entre as extrações realizadas em etanol e DMSO na concentração de 40 mg.mL⁻¹. Na concentração de 60 mg.mL⁻¹, as extrações obtidas em etanol 70°C e etanol 50°C ou em DMSO ultrasonificado e DMSO 50°C, não diferiram estatisticamente, demonstrando inibição em torno de 50% para a amostra 1, porém, para a amostra 2 este percentual foi sustentado, somente, no tratamento utilizando etanol 70°C; na amostra 3, a melhor forma de extração da própolis foi utilizando o etanol à 50°C. Ao ser utilizada uma concentração de 80 mg.mL⁻¹, todas as amostras apresentaram a extração em etanol ultrasonificado entre as melhores formas de extração, revelando inibição do crescimento micelial de 82, 79 e 59%, respectivamente para as amostras 1, 2 e 3. O teste de Scott-Knott, demonstrou, também que ao utilizarmos a concentração máxima testada (100 mg.mL⁻¹), as extrações obtidas em etanol ultrasonificado e em DMSO 50°C não diferiram estatisticamente nas amostras 1 e 2, enquanto para a amostra 3 o melhor solvente extrator foi o etanol à 50°C.

Figura 1 - Percentual de inibição do crescimento do *Fusarium moniliforme* em cada amostra analisada, conforme as diferentes concentrações testadas, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (médias \pm erro padrão da média).



A1= amostra 1; A2=amostra 2; A3=amostra 3

Doenças causadas por *Fusarium* spp. causam grandes perdas econômicas mundiais em culturas agrícolas de frutas, legumes e cereais. São fungos filamentosos amplamente distribuídos e encontrados no solo, apresentam

capacidade de produzir micotoxinas que contaminam os gêneros agrícolas e afetam a saúde. As toxinas produzidas por *F. moniliforme* são o ácido fusárico, fusarinas, giberelinas, moniliformina e fumonisinas. A utilização de plantas resistentes e uso de fungicidas são alternativas para amenizar perdas e danos causados por este fitopatógeno, no entanto fungicidas apresentam composição química desfavorável e nociva para o ser humano e para o meio ambiente e o nível de tolerância das plantas depende das condições ambientais (MENEZES et al., 2016). A utilização da própolis surge como alternativa viável no controle biológico, tratando de sementes e mudas afetadas por *F. moniliforme*, diminuindo as perdas econômicas e preservando a qualidade ambiental, conforme os relatos científicos têm demonstrado (OZCAN et al., 2004; MEHTA; SHARMA, 2013).

Os mesmos tratamentos foram aplicados a *C. gloeosporioides*. A utilização de água como solvente não exibiu elevados níveis de inibição no crescimento micelial, todavia, foi constatado que ao usar a água aquecida em banho-maria à 50°C obteve-se os três melhores resultados para este solvente, resultados em torno de 19, 22 e 26% de inibição do desenvolvimento fúngico, variando em concentrações de 80 e 100 mg.mL⁻¹ da própolis.

Em DMSO, os maiores níveis de inibição foram alcançados ao se empregar uma concentração de 100 mg.mL⁻¹ da própolis, os quais proporcionaram melhores resultados ao se utilizar o DMSO em ultrasonificação ou em banho-maria em à 50°C, sendo conseguido um índice inibitório de até 80% (amostra 2), em extração à 50°C.

A utilização do etanol como solvente extrator dos compostos bioativos da própolis foi bastante satisfatória ao se avaliar o crescimento do *C. gloeosporioides*, evidenciando até 97,08% de inibição micelial em uma concentração de 60mg.mL⁻¹ para a amostra 3, em etanol ultrasonificado.

Tabela 2 - Dados percentuais de inibição do crescimento micelial para *Colletotrichum gloeosporioides*, submetidos à extração em água, dimetilsulfóxido e etanol em banho ultrasonificado, banho-maria à 50°C e à 70°C, nas concentrações de 40; 60; 80 e 100 mg.mL⁻¹.

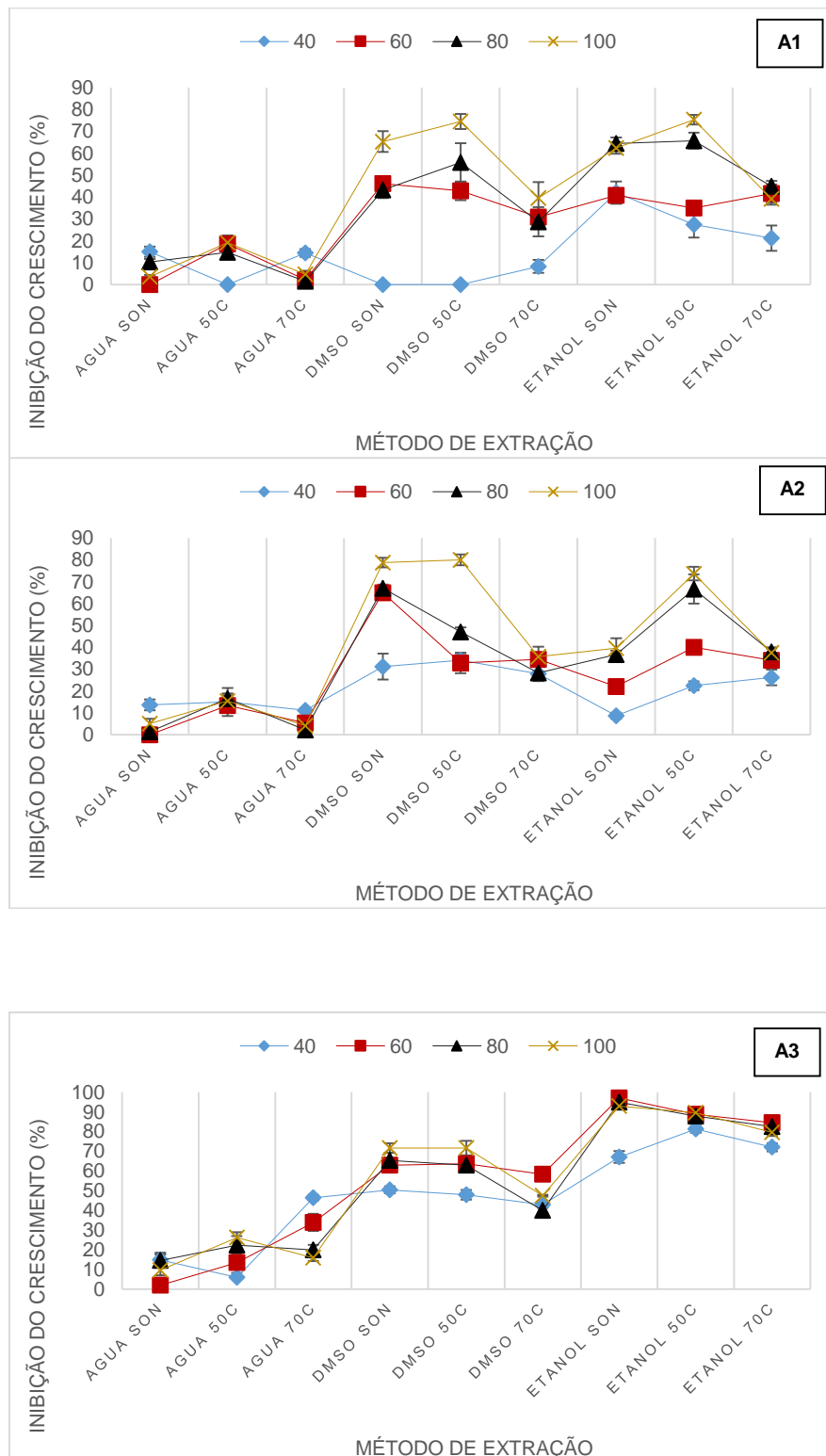
EXTRAÇÃO	AMOSTRA	CONCENTRAÇÕES (mg.mL ⁻¹)			
		40	60	80	100
Água Ultr	1	15,030 a	0 a	10,382 a	3,552 a
	2	13,662 a	0 a	1,502 b	5,190 a
	3	14,752 a	1,915 a	14,482 a	9,565 a
Água 50C	1	0 a	18,580 a	14,752 a	19,125 a
	2	15,027 a	13,387 a	16,667 a	15,572 a
	3	6,010 a	13,387 a	22,402 a	26,230 b
Água 70C	2	11,205 a	2,185 a	1,502 a	4,645 a
		0 a	5,465 a	2,325 a	4,235 a
	3	46,447 b	33,880 a	19,945 b	15,847 b
DMSO Ultr	1	0 a	46,250 a	43,332 a	65,417 a
	2	31,252 b	65,000 b	67,085 b	78,750 b
	3	50,415 c	62,917 b	65,415 b	71,667 a
DMSO 50C	1	0 a	42,917 a	55,832 a	74,582 a
	2	34,167 b	32,915 b	47,085 b	80,000 a
	3	47,917 c	63,750 c	62,917 a	71,665 a
DMSO 70C	1	8,332 a	30,832 a	28,750 a	39,582 a
	2	27,915 b	34,582 a	28,335 b	35,832 a
	3	42,917 c	58,335 b	40,000 b	47,500 b
Etanol Ultr	1	42,085 a	40,835 a	64,582 a	62,500 a
	2	8,750 b	22,082 b	36,667 b	39,585 b
	3	67,082 c	97,082 c	95,000 c	92,915 c
Etanol 50C	1	27,500 a	35,000 a	65,832 a	75,417 a
	2	22,500 a	40,000 a	66,667 a	73,750 a
	3	81,247 b	88,747 b	87,917 b	89,585 b
Etanol 70C	1	21,252 a	41,665 a	45,000 a	39,167 a
	2	26,250 a	34,167 a	37,915 a	37,497 a
	3	72,082 b	84,585 b	82,500 b	79,582 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna/extração, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade. Extrações: Água Ultr = água em banho ultrasonificado; Água 50C = água em banho-maria à 50°C; Água 70C = água em banho-maria à 70°C; DMSO Ultr = dimetilsulfóxido em banho ultrasonificado; DMSO 50C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 50°C; DMSO 70C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 70°C; Etanol Ultr = etanol em

banho ultrasonificado; Etanol 50C = etanol em banho-maria à 50°C; Etanol 70C = etanol em banho-maria à 70°C.

A figura 2 revela, através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), o desdobramento dos métodos de extração da própolis dentro das concentrações utilizadas para cada amostra estudada. Diante dos resultados foi constatado, de acordo com as concentrações avaliadas quais as formas de extração que diferem de maneira significativa, logo, na amostra 1, utilizando a concentração de extrato de própolis com 40 mg.mL^{-1} , não houve diferenças entre etanol 50°C e etanol 70°C, os quais diferiram da extração em etanol ultrasonificado, ao aumentar a concentração para 60 mg.mL^{-1} , o nível de significância é agrupado em DMSO ultrasonificado, DMSO 50°C, etanol ultrasonificado e etanol 70°C, que se revelaram iguais estatisticamente; para a concentração de 80 mg.mL^{-1} não houve diferença entre as extrações em etanol ultrasonificado e à 50°C, enquanto, que, para uma concentração de 100 mg.mL^{-1} a extração realizada em etanol 50°C e DMSO 50°C, não diferiu, mas sofreu decréscimo de inibição em relação à 80 mg.mL^{-1} . Na amostra 2, o dimetilsulfóxido apareceu como o melhor solvente ao ser utilizado banho ultrasonificado e banho-maria à 50°C, em todas as concentrações avaliadas. Observou-se, que para a amostra 3, há um comportamento semelhante ao nível de diferenças estatísticas significativas entre as concentrações utilizadas, revelando, sempre, o etanol como melhor solvente, independente da temperatura de extração analisada.

Figura 2 - Percentual de inibição do crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides* em cada amostra analisada, conforme as diferentes concentrações testadas, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (médias \pm erro padrão da média).



A1= amostra 1; A2=amostra 2; A3=amostra 3

Uma das principais doenças pós-colheita em frutos da região tropical é causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, trata-se da antracnose, que é iniciada durante o desenvolvimento dos frutos, mas os sintomas aparecem após o amadurecimento dos mesmos. Tratamentos como imersão em água quente e uso de fungicidas nocivos são utilizados para combater esta doença, todavia são recursos que causam danos aos frutos e/ou à saúde do consumidor. Assim a própolis surge como um dos produtos naturais com propriedades biológicas eficazes na redução da antracnose e seus danos (ONG; ALI, 2015). Pesquisas apontam vários resultados na utilização da própolis para inibir o crescimento e desenvolvimento do *C. gloeosporioides* (MENESES et al., 2009; MATTIUZ et al., 2015; ALI et al., 2016; PASTANA et al., 2016), todavia a forma de extração, o uso de diferentes solventes e concentrações, bem como a origem da própolis dificulta abordagens corroborativas com os resultados alcançados neste estudo.

Dados sobre a atividade antifúngica dos extratos da própolis sobre o crescimento do *P. digitatum* podem ser analisados de acordo com a tabela 3, no qual ao se utilizar água como solvente, foi obtido maior índice inibitório quando aquecida em banho-maria à 70°C, em concentração de 40 mg.mL⁻¹ do extrato de própolis na amostra 2. De maneira, geral, utilizando a água ultrasonificada como solvente, não houve diferenças significativas entre os níveis inibitórios do crescimento micelial deste fungo. Quando foi utilizado o dimetilsulfóxido, como solvente, observou-se, que, os melhores resultados foram obtidos em aquecimento à 50°C em banho-maria e utilizando uma concentração de própolis de 100 mg.mL⁻¹, para as três amostras analisadas. O etanol aquecido em banho-maria à 50°C despontou melhores níveis de inibição micelial quando utilizado na concentração de 100 mg.mL⁻¹ para a amostra 3, enquanto que, para as amostras 1 e 2 na concentração de 100 mg.mL⁻¹, apresentou maior grau inibitório quando dissolvido no etanol em banho-ultrasonificado (60,8 % cada).

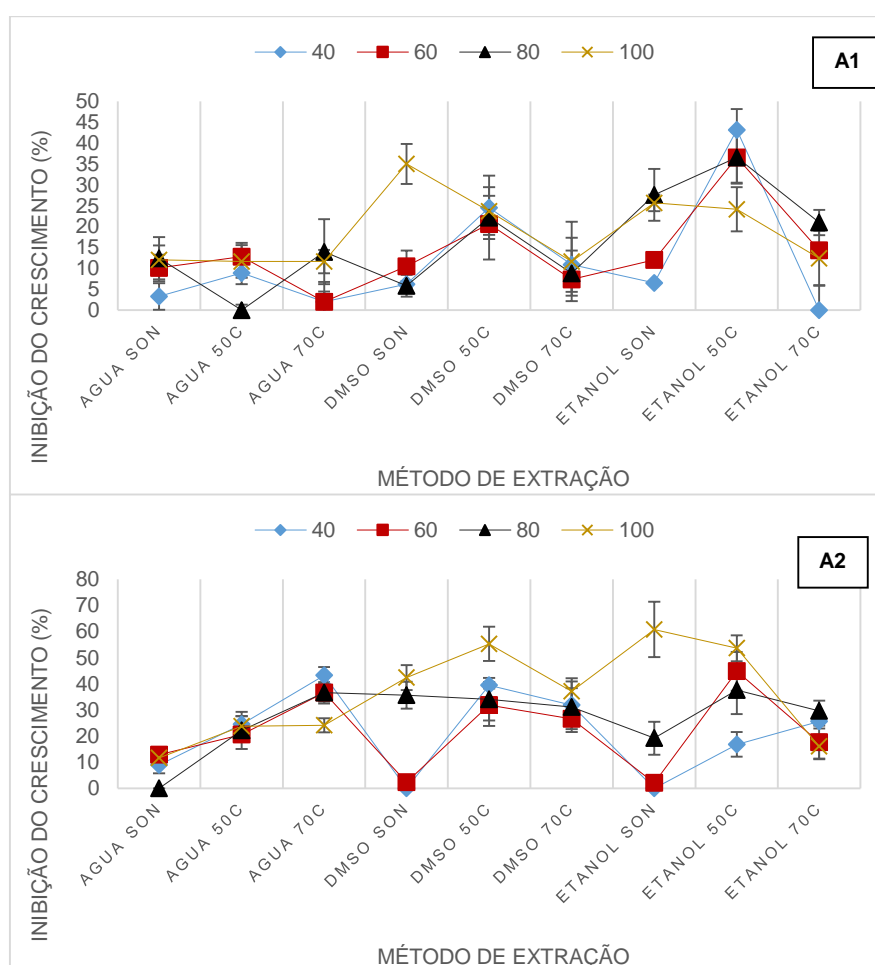
Tabela 3 - Dados percentuais de inibição do crescimento micelial para *Penicillium digitatum*, submetidos à extração em água, dimetilsulfóxido e etanol em banho ultrasonificado, banho-maria à 50°C e à 70°C, nas concentrações de 40; 60; 80 e 100 mg.mL⁻¹.

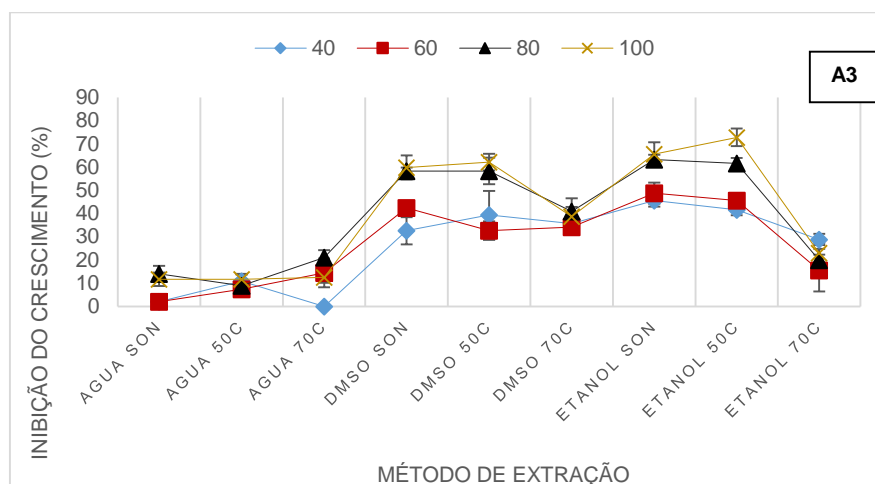
EXTRAÇÃO	AMOSTRA	CONCENTRAÇÕES (mg.mL ⁻¹)			
		40	60	80	100
Água Ultr	1	3,307 a	10,110 a	12,450 a	12,062 a
	2	8,950 a	12,840 a	0 a	11,670 a
	3	2,042 a	2,042 a	14,010 a	11,672 a
Água 50C	1	6,225 a	10,505 a	5,835 a	35,020 a
	2	24,515 b	20,622 a	22,180 b	23,737 a
	3	10,895 a	7,392 a	8,850 a	11,672 b
Água 70C	1	6,517 b	12,062 a	27,627 a	25,680 a
	2	43,190 a	36,575 b	36,577 a	24,127 a
	3	0 b	14,395 a	21,012 a	12,450 a
DMSO Ultr	1	21,967 a	17,422 a	46,210 a	42,422 a
	2	0 b	2,272 b	35,600 a	42,422 a
	3	32,572 a	42,420 c	58,337 b	59,852 b
DMSO 50C	1	3,787 a	31,057 a	22,725 a	49,997 a
	2	39,390 b	31,815 a	34,090 a	55,302 a
	3	39,392 b	32,572 a	58,330 b	62,125 a
DMSO 70C	1	29,542 a	0 a	33,330 a	33,332 a
	2	31,817 a	26,512 b	31,060 a	37,117 a
	3	35,602 a	34,087 b	40,905 a	38,635 a
Etanol Ultr	1	0 a	0 a	31,200 a	60,800 a
	2	0 a	2,000 a	19,200 b	60,800 a
	3	45,600 b	48,800 b	63,200 c	65,600 a
Etanol 50C	1	21,600 a	44,800 a	36,800 a	41,600 a
	2	16,800 a	44,800 a	37,600 a	53,600 a
	3	41,600 b	45,600 a	61,600 b	72,800 b
Etanol 70C	1	22,400 a	2,000 a	35,200 a	34,400 a
	2	25,600 a	17,600 b	29,600 a	16,000 b
	3	28,800 a	15,600 b	20,000 a	23,000 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna/extração, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0,05$). Extrações: Água Ultr = água em banho ultrasonificado; Água 50C = água em banho-maria à 50°C; Água 70C = água em banho-maria à 70°C; DMSO Ultr = dimetilsulfóxido em banho ultrasonificado; DMSO 50C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 50°C; DMSO 70C = dimetilsulfóxido em banho-maria à 70°C; Etanol Ultr = etanol em banho ultrasonificado; Etanol 50C = etanol em banho-maria à 50°C; Etanol 70C = etanol em banho-maria à 70°C.

A figura 3 mostra o percentual de inibição do crescimento do *P. digitatum* em cada amostra analisada, conforme as diferentes concentrações testadas, de acordo com o teste de Scott-Knott 0,05 (médias \pm erro padrão da média). Para todas as amostras, as médias obtidas, globalmente, não diferem entre os extratos dissolvidos em etanol e os extratos em dimetilsulfóxido. No entanto para a amostra 2, o extrato da própolis em concentração de 40 mg.mL⁻¹, dissolvido em água em banho-maria à 70°C não diferiu estatisticamente do resultado alcançado com o solvente DMSO em banho-maria à 50°C. Para a amostra 3, em todas as concentrações os solventes: etanol em banho ultrasonificado, etanol em banho-maria à 50°C e DMSO em banho-maria à 50°C não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram maiores níveis de inibição micelial.

Figura 3 - Percentual de inibição do crescimento do *Penicillium digitatum* em cada amostra analisada, conforme as diferentes concentrações testadas, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (médias \pm erro padrão da média).





A1 = amostra 1; A2 = amostra 2; A3 = amostra 3

Os processos de colheita, manipulação e transporte dos frutos cítricos podem ocasionar fermentos e os torna susceptíveis ao mofo causado por *P. digitatum*, ocasionando perdas econômicas e disseminação dos esporos fúngicos ao ambiente (ERASMUS et al., 2015). Estudos demonstram que a própolis apresenta eficiente atividade antifúngica contra *P. digitatum*, visto que pode inibir a germinação de conídios em concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de própolis extraídas em etanol a 70% (SOYLU et al., 2008), outras pesquisas relatam efeitos antifúngicos dos extratos da própolis sobre o controle e desenvolvimento do *Penicillium italicum* (YANG et al., 2011; PENG et al., 2012), *Penicillium expansum* (SILICI; KEVSER, 2014) e *Penicillium digitatum* (MATNY, 2015), utilizando formas de extração diferentes do que foi analisado neste estudo.

Estudos revelam o sinergismo que existe entre os compostos químicos e as propriedades biológicas da própolis, visto que diferentes amostras oriundas de localizações geográficas distintas e com composição química diferenciadas, apresentam provas inequívocas de atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (BANKOVA, 2005; PASCOAL et al., 2014). Estes estudos revelam que não é apenas o teor de compostos da própolis que influencia no eficiente processo de inibição antimicrobiana, mas existe também um efeito de interação significativa entre os flavonoides, ácidos fenólicos e outros ésteres dos extratos de própolis (MARGHITAS et al., 2013; PASCOAL et al., 2014). Ao estudar a atividade antifúngica da própolis de diferentes áreas geográficas, vários autores descobriram

que todas as amostras apresentavam, em graus variados, efeitos antifúngicos contra muitas espécies como *Candida albicans*, *Candida nonalbicans*, *Trichophyton metagrophytes*, *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis* e *Plasmopara vitícola* (FARRÉ et al., 2004; YANG et al., 2010; MORA et al., 2011).

Devido à quantidade e tipos de substâncias contidos na própolis, o procedimento utilizado para extrair seus compostos é fundamental para alcançar os objetivos aos quais se propõe. São levados em conta desde a região geográfica, que contribui expressivamente com os vegetais que dão origem à resina, o tempo e o solvente utilizados para diluir, bem como a temperatura e a forma de maceração empregada durante o processo (DE LIMA et al., 2016). Na literatura é possível encontrar os mais variados tipos de extração da própolis, utilizando como solventes o etanol em diversas concentrações (MATIUZ et al., 2015; MATEI et al., 2015; SALAS et al., 2016), o dimetilsulfóxido (ORDÓÑEZ et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016) e água (PARK et al., 1998; NAGAI et al., 2003; HU et al., 2005; KHERZI et al., 2006). A escolha do melhor método de extração depende da capacidade de eliminar os componentes indesejáveis e preservar os compostos ativos (DE LIMA et al., 2016).

Mello et al. (2006) sugeriram que a forma de ação antifúngica da própolis ocorre no desencadeamento de alterações na parede celular, que, conseqüentemente, leva ao aumento do volume e ruptura da membrana. Além disso, os fungos apresentam comportamento distinto quanto à sensibilidade dos componentes ativos da própolis, havendo interferência relacionada ao grupo que pertencem e à fase do ciclo de vida em que se encontram (DA SILVA et al., 2008).

É importante salientar que para a confecção de extratos para uso na agricultura, é possível utilizar refugos da própolis, que sobram após sua classificação e direcionamento da produção, diminuindo, significativamente, o custo econômico, revelando efeito sustentável na atividade apícola.

CONCLUSÕES

A própolis tem um grande potencial antifúngico, apresentando resultados diferenciados para cada espécie e região geográfica analisadas, necessitando

estudos detalhados dentro de cada espécie. Sendo um produto que pode ser considerado como alternativa para o controle de fitopatógenos. O solvente, a metodologia de extração e a concentração utilizada são aspectos de grande importância, pois interferem diretamente na propriedade biológica do produto final.

Os fungos *Colletotrihum gloerosporieoides* e *Penicillium digitatum* foram mais sensíveis aos extratos da própolis vermelha, sendo que para *C. gloerosporieoides* o extrato obtido em etanol ultrasonificado demonstrou maior índice de inibição, e, para o *P. digitatum*, o melhor método de extração foi a obtenção do extrato em etanol à 50°C. A própolis proveniente da Baía do Iguape demonstrou maior eficiência para o controle do *F. moniliforme*, quando foi utilizado etanol ultrasonificado.

A própolis proveniente da Baía do Iguape apresentou, de maneira geral, efeito antifúngico na inibição do crescimento micelial de *F. moniliforme*, *C. gloerosporieoides* e *P. digitatum*, tanto quanto a própolis vermelha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; BORDOH, P. K.; SINGH, A.; SIDDIQUI, Y.; DROBY, S. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. **Crop Protection**, v.90, p.132 - 141, 2016.

ARAÚJO, M. J. A. M.; BOSCO, S. de M. G.; SFORCIN, J. M. Pythium insidiosum: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.47, p.863 - 869, 2016.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114 - 117, 2005.

BANKOVA V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.29 - 32, 2005.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, p.1523-1527, 2009.

CASTELLANI, A. A. Maintenance na cultivation of the common pathogenic fungi of man. In sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine**, v.70, p.181 - 184, 1967.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v.30, p. 1512 - 1516, 2007.

DA SILVA, A. F.; CHAVES, J. B. P.; BATISTA, T. A. S.; SOARES, D. J.; PEREIRA, O. L.; MESSAGE, D. Extractos de propóleos: uma alternativa para el control de hongos postcosecha. In: **IV Congreso Latino Americano de Micología**. Mar del Plata. 2008.

DE LIMA, G. G.; SOUZA R. O. de; BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M. J. Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis - Loaded Hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.1248 - 1257, 2016.

DEZMIREAN, D.; MARGHITAS, L. A.; PAMFIL, D. C. Influência do mel e própolis sobre micropropagação de efeito estufa cravo. **Boletim de USAMV**, v.59, p.244 - 250, 2003.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Second Edition. Boca Raton, USA, 1996.

ERASMUS, A.; LENNOX, C. L.; KORSTEN, L.; LESAR, K.; FOURIE, P. H. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus

postharvest green and blue mould: Impact and options. **Postharvest Biology and Technology**, v.107, p.66 - 76, 2015.

FARRÉ, R.; FRASQUET, I.; SÁNCHEZ, A. Propolis and human health. **Ars Pharmaceutica**, v.45, p.21 - 43, 2004.

FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M. M. **Propolis**: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: Humana Press, p.203 – 218, 2004.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1220-1234, 2006.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p. 276-283, 2005.

KHEZRI, M.; ROSTAMI, S.; RISEH, R. S.; ALIZADEH, A. Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in pistachio (*Pistacia vera* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**. v.8, p.606-608, 2006.

MACHADO, H. NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia Reprodução**, v.26, p.37-44, 2008.

MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIS, O. "Important Developments in Romanian Propolis Research." **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v.61, 2013.

MATEI, P. M.; MARTÍN-RAMOS, P.; SÁNCHEZ-BÁSCONES, M.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, S.; CORREA-GUIMARAES, A.; NAVAS-GRACIA, L. M.; RUFINO, C.

A.; RAMOS-SÁNCHEZ, M. C.; MARTÍN-GIL, J. Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *diplodia seriata*. **International Journal of Polymer Science**, 11p., 2015.

MATNY, O. N. Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. **Plant Pathology Journal**, v.14, p.53 -15, 2015.

MATSHUGIGE, K. BASNET, P.; HASE, K.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T. Propolis protects pancreatic β - celes against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, v.3, p.203 - 209, 1996.

MATTIUZ, B. H.; DUCAMP-COLLIN, M. N.; MATTIUZ, C. F. M.; VIGNEAULT, C.; MARQUES, K. M.; SAGOUA, W.; MONTET, D. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. **Scientia Horticulturae**, v.184, p.160 - 168, 2015.

MEHTA, S.; SHARMA, M. Antifungal activity of Eucalyptus globules against some plant pathogenic fungi. **JPR:BioMedRx: An International Journal**, v.1, p. 884-887, 2013.

MELLO, A. M.; GOMES, R. T.; LARA, S. R.; GOMES SILVA, L.; ALVES, J. B.; CORTÉS, M. E.; ABREU, S. L., SANTOS, V. R. The effect of Brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. **Pharmacology**, v.3, p.352-358, 2006.

MENESES, A. E.; DURANGO, L. D.; GARCIA, M. C. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. **Química Nova**, São Paulo, v.32, p.2011-2017, 2009.

MENEZES, H. D.; TONANI, L.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L.; KRESS, M. R. Z. Photodynamic treatment with phenothiazinium

photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.164, p.1-12, 2016.

MORA, M. Q.; OROZCO, A. L.; ZÁRATE, C. S.; TOVAR, C. G.; MIRANDA, L. C.; CARRILLO, J. P.; SÁNCHEZ, T. C. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. **Formatex**, 2011.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p.29-33, 2003.

ONG, M. K. e ALI, A. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v.100, p.113-119, 2015.

ORDÓÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; MORENO, M. I.; ISLA, M. I. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v.166, p.578-84, 2011.

OZCAN, M. Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**, v.50, p. 395-398, 1999.

OZCAN, M.; UNVER, A.; CEYLAN, D. A.; YETISIR, R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. **Nahrung**, v.48, p.188-194, 2004.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.18, p.313-318, 1998.

PASCOAL, A.; FEÁS, X.; DIAS, T.; DIAS, L. G.; ESTEVINHO, L. M. The role of honey and propolis in the treatment of infected wounds. **Chapter 13**, 2014.

PASTANA, R. F.; VIEIRA, G. H. C.; MACHADO, P. P. Uso da própolis no controle “in vitro” do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose em berinjelela. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.3, p.12-15, 2016.

PENG, L.; YANG, S.; CHENG, Y. J.; FENG CHEN, F.; SIYI PAN, S.; FAN, G. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*, **Food Science and Biotechnology**, v.21, p.1533-1539, 2012.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.103-110, 2006.

R Development Core Team (2011), **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>, 2011.

SALAS, A. L.; ALBERTO, M. R.; ZAMPINI, I. C.; CUELLO, A. S.; MALDONADO, L.; RÍOS, J. L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ISLA, M. I. Biological activities of polyphenols-enriched propolis from Argentina arid regions. **Phytomedicine**, v.23, p.27-31, 2016.

SILICI, S.; KEVSER, K. Inhibitory effect of propolis on patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, p.1129-1134, 2014.

SILVA, R. A. RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p.1842-1848, 2006.

SOYLU, E. M.; ERTURK, E.; SAHINLER, N.; SOYLU, S. Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. **Asian Journal of Chemistry**, v.24, p. 4823-4830, 2008.

VICTORINO, F. R.; BRAMANTE, C. M.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; FRANCO, S. L.; HIDALGO, M. M. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, p.795-800, 2009.

YANG, S.; PENG, L.; CHENG, Y.; CHEN, F.; PAN, S. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. **Food Science and Biotechnology**, v.19, p.1303-1308, 2010.

YANG, S. Z.; PENG, L. T.; SU, X. J.; CHEN, F.; CHENG, Y. J.; FAN, G.; PAN, S. Y. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v.127, p.210-215, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de abelhas para a produção de própolis tem demonstrado potencial nas áreas costeiras e de águas interiores, reforçando o potencial da Baía do Iguape para esta atividade, cujos resultados econômicos, sociais e ecológicos têm sido citados com grande importância científica. No entanto, as propriedades biológicas variam conforme a região geográfica, necessitando com isso, de uma caracterização local da própolis que é produzida. Desta forma este estudo, supre, em parte, a necessidade da caracterização biológica da própolis produzida nestas localidades, exigindo esforços da pesquisa, no sentido de diferenciar esse produto e fornecer subsídios importantes na determinação da qualidade microbiológica e na identificação das suas atividades antimicrobianas.

Foi constatado para todos os parâmetros avaliados, que não houve diferença significativa entre as médias das amostras obtidas entre apiários e nem entre as épocas avaliadas, no entanto verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os manejos, revelando que um manejo correto da própolis proporciona maior valor a este produto. A adoção das Boas Práticas de Fabricação, para a coleta e manipulação da própolis, é fundamental para manter as qualidades microbiológicas desse produto.

Foram identificadas dezesseis espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus nomius*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sp.*, *Coniothyrium sidae*, *Didymella sp.*, *Flavodon flavus*, *Fusarium incarnatum*, *Paecilomyces variotii*, *Paraphoma fimeti*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium citrinum*, *Phoma medicaginis*, *Phoma sp.*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum* e *Stagonosporopsis valerianellae*; e seis espécies de leveduras: *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kodomaia ohmeri* e *Trichosporon asahii*.

Os resultados indicaram que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis apresentaram inibição do crescimento frente às amostras da própolis analisadas, sendo que as bactérias Gram-positivas se mostraram mais sensíveis quando comparadas as bactérias Gram-negativas. Demonstrando o efeito antibacteriano da própolis.

Os fungos *Colletotrihum gloerosporieoides* e *Penicillium digitatum*, foram mais sensíveis aos extratos da própolis vermelha, sendo que para *C. gloerosporieoides* o extrato obtido em etanol ultrasonificado na concentração de 60 mg.mL⁻¹ demonstrou maior índice de inibição, e, para o *P. digitatum*, o melhor método de extração foi a obtenção do extrato em etanol à 50°C, numa concentração de 100 mg.mL⁻¹. A própolis proveniente da Baía do Iguape demonstrou maior eficiência para o controle do *F. moniliforme*, quando foi utilizado etanol ultrasonificado em concentração de 100 mg.mL⁻¹.

Muitos apicultores da região da Baía do Iguape, ainda vivem apenas com a comercialização de mel e pólen, porém a própolis pode aumentar significativamente a renda familiar, pelo valor atribuído ao produto, além de trabalhar a necessidade de preservação das áreas de vegetação natural e agroecossistemas. Neste sentido, os resultados aferidos com este trabalho apresentaram um grande apelo em pesquisa e desenvolvimento, pois proporcionou uma otimização das colônias para a produção da própolis, auxiliando no controle da qualidade microbiológica, aumentando a renda dos apicultores e gerando informações científicas inovadoras sobre a caracterização biológica da própolis da região da Baía do Iguape.

ANEXO

Figura 1 - Local onde foi implantado o experimento, Baía do Iguape, pertencente a Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

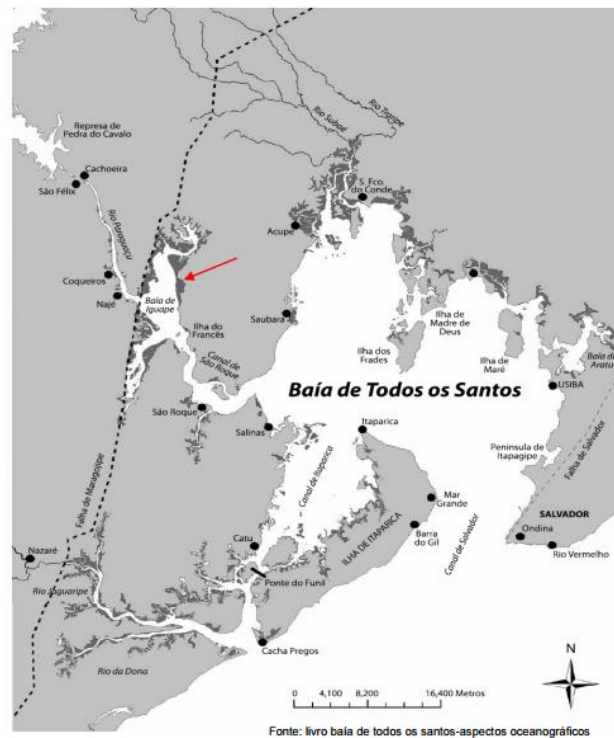


Figura 2 - Manejo e limpeza das caixas de *Apis mellifera* L. nos apiários da Baía do Iguape - Ba, para a produção da própolis.



Figura 3 - Dispositivo em madeira (coletor tira-e-põe) para coleta da própolis instalado nas caixas de *Apis mellifera* L. em apiários na Baía do Iguape-Ba.



Figura 4 - Dispositivo em madeira (coletor tira-e-põe) contendo a própolis proveniente da Baía do Iguape-BA.



Figura 4 - Extrato seco da própolis de *Apis mellifera* L. coletada na Baía do Iguape-Ba.

