

## AVALIAÇÃO DA VIDA ÚTIL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS MANTIDO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO

Edgar Toshiyuki Kawakita<sup>1\*</sup>, Edison Antônio de Souza<sup>2</sup>, Danielle Midori Uehara<sup>1</sup>, Ricardo de Oliveira Orsi<sup>2</sup>

**RESUMO** - A maioria da população consome própolis na forma de extrato hidroalcoólico, adquirido em estabelecimentos comerciais ou diretamente do produtor. Entretanto, não se tem conhecimento sobre o tempo ideal de armazenamento do produto, bem como a melhor temperatura para se preservar a qualidade do extrato. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi levantar informações sobre a vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis, em função da temperatura e tempo de armazenamento, por meio de testes físico-químicos estabelecidos na legislação em vigor (teor de extrato seco, atividade oxidante, compostos fenólicos, pH, solubilidade ao acetato de chumbo, solubilidade ao hidróxido de sódio e teor de cera) assim como avaliar a atividade antibacteriana do extrato contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A própolis foi produzida em colméias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em colméias modelo Langstroth, por meio do coletor de própolis inteligente (CPI), na região da cidade de Botucatu no estado de São Paulo. O extrato hidroalcoólico de própolis (EAP) foi preparado na proporção de 30% e analisado em 12 períodos (zero, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias). Os resultados dos dados físico-químicos e microbiológicos foram avaliados por ANOVA não-paramétrica, seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas e a correlação entre as variáveis pelo teste não paramétrico de Spearman. De acordo com os resultados, o EAP apresentou modificações em sua composição físico-química com a variação de temperatura, e, com isso, a qualidade e a quantidade de compostos foram alteradas. Em relação à atividade antibacteriana, a variação de temperatura não interferiu na qualidade microbiológica, demonstrando haver eficiência bactericida, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: apicultura, atividade antibacteriana, qualidade

### Shelf-life evaluation of hydroalcoholic propolis extract kept under different storage temperatures

**ABSTRACT**- Most people consume propolis in the hydroalcoholic form purchased in local stores or directly from the producer. However, the ideal length for product storage, as well as the best temperature to preserve the quality of the extract are not known. Therefore, the objective of this study was to collect information about the shelf-life of hydroalcoholic propolis extract, according to the temperature and length of storage by means of physical-chemical tests determined by the Brazilian regulations (dry extract content, oxidant activity, phenolic compounds, pH, solubility in lead acetate, solubility in sodium hydroxide, and wax content) and evaluation of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Propolis was produced in hives of *Apis mellifera* Africanized honey bees housed in Langstroth hives, and collected by the intelligent propolis collector (CPI) in the region of Botucatu, state of São Paulo. The hydroalcoholic propolis extract (HPE) was prepared at a 30% ratio and analyzed on day zero, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, and 330. The results of physicochemical and microbiological data were evaluated by ANOVA non-parametric test, followed by Dunn test for multiple comparisons, and the correlation between variables was determined by nonparametric Spearman test. According to the results, HPE showed changes in physical and chemical composition with temperature variation. Thus, the quality and quantity of compounds were changed. Regarding antibacterial activity, temperature variation did not interfere with microbiological quality, demonstrating bactericidal efficiency against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: beekeeping, antibacterial activity, quality

<sup>1</sup>Grupo Carrefour Brasil – Unidade São Paulo – Segurança alimentar <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho Campus Botucatu; \*Autor para contato- Email: edgarteo@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A apicultura é a ciência que estuda a criação racional das abelhas melíferas e utilização de seus produtos em benefício do homem, além de exercer importantes funções na área social (geração de empregos) e ecológica (preservação ambiental).

As abelhas fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade, fornecendo seus produtos para a alimentação humana como, por exemplo, o mel (Dustmann 1993). Desde a introdução da abelha *Apis mellifera*, em 1839, a apicultura nacional tem apresentado crescente desenvolvimento, favorecido pela extensão do território brasileiro, floradas diversificadas e clima propício que possibilitam elevada produção e o manejo durante todo o ano (Couto; Couto 2002).

Dentre os produtos das abelhas, a própolis tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, no sentido de elucidar suas propriedades terapêuticas e farmacológicas. Além disso, sua comercialização tem intensificado nos últimos anos, principalmente, pela indústria farmacêutica (Lustosa et al. 2008).

Sua importância para o homem pode ser confirmada pela origem grega de seu nome: “pró = em defesa” e “polis = cidade”, demonstrando a sua utilização desde a antiguidade. As abelhas utilizam-na para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares, insetos e eventuais invasores que morrem no interior da colmeia, com a finalidade de evitar sua decomposição (Kosonocka 1990).

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudados (Burdock 1998, Schelleret al. 1999). É encontrado em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro. É um material elástico que pode distender-se em até 200% antes de romper-se, apresentando 1/11 da rigidez da cera. Este material lipofílico apresenta aroma forte e característico, em consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos. Possui fortes propriedades adesivas, representando um conjunto complexo de substâncias (55% de resinas e bálsamos; 30% de ceras; 10% de óleos voláteis e cerca de 5% de pólen) e impurezas mecânicas (Thomson 1990).

Bankova et al. (1992), com a utilização de recursos como cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS), identificaram 180 constituintes presentes na própolis, sendo sua composição química praticamente idêntica, quando as amostras foram obtidas durante as quatro estações sazonais (Boudourova-Krasteva et al. 1997, Bankova et al. 1998). O maior grupo de compostos isolados é o dos flavonóides, encontrando-se também aldeídos aromáticos, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas, aminoácidos, entre outros.

Analisando as possíveis fontes vegetais da própolis produzida em Botucatu, SP, Bankova et al. (1999) relataram que a própolis origina-se, em sua maior parte, de *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como “Vassourinha”, bem como de *Araucaria angustifolia* (“Pinheiro do Paraná”) e *Eucalyptus citriodora* (“Eucalipto”).

Geralmente a própolis é coletada pelo apicultor mediante raspagem das partes móveis da colmeia, podendo apresentar sujeiras como lascas de madeira, terra e outros materiais. Visando a melhoria da qualidade da própolis, outras técnicas foram desenvolvidas para estimular sua produção, como uso de telas coletoras acima da melgueira, coletor de própolis “inteligente” ou coletores adaptados sob a tampa. Entretanto, a produção de própolis pode variar conforme a técnica de coleta utilizada pelo apicultor e, juntamente com uma estimulação excessiva das abelhas, pode gerar um produto de baixa qualidade (Breyer 1996, Brighenti; Guimarães 2000, Cunha; Evangelista 2000, Salamanca 2000, Moura 2001, Thimann; Manrique 2002).

As técnicas de exploração da própolis seguem quase sempre o mesmo princípio, que é o estímulo à produção através da abertura de frestas nas colmeias. As aberturas alteram o equilíbrio térmico no interior do ninho, comprometem o fluxo das informações químicas e expõem as abelhas adultas, crias e alimento estocado a condições indesejadas. Desta forma, as abelhas produzem própolis para normalizar as condições desejadas de temperatura, comunicação e defesa (Lima 2005).

A produção de própolis no Brasil é estimada em torno de 100 toneladas anuais, sendo grande parte destinada à exportação, tanto na forma bruta como em produtos manufaturados (Machado et al. 2012). Breyer (1996) sugere que a própolis brasileira é uma das melhores em qualidade se comparada aos demais países produtores, alcançando elevados preços no comércio exterior e representando uma importante fonte de renda para o apicultor.

A própolis está sendo utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia na forma de alimentos funcionais (Park et al. 1998). O homem tem utilizado a própolis para fins medicinais, por esta apresentar propriedades biológicas como antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV, anticariogênica, dentre outras (Castro 2001, Boyanova et al. 2005, Hu-Fuliang et al. 2005, Orsi et al. 2005, Orsi et al. 2006, Barbosa et al. 2009, Cueto et al. 2011, Siqueira et al. 2014).

Com relação à qualidade do extrato alcoólico de própolis, utilizam-se as normas presentes no “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis”, presentes na normativa nº: 03, de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este regulamento sugere a análise do extrato seco (mínimo de 11% m/v), compostos fenólicos (mínimo de 0,25% m/m), flavonóides (mínimo de 0,5% m/m), atividade antioxidante (máximo de 22s), entre outros (Brasil 2001).

Vitali (2002) define vida útil de um alimento como sendo o tempo em que ele pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz e embalagem sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas, alterações que são consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente.

Com relação ao extrato alcoólico de própolis, não se tem conhecimento sobre o tempo ideal de armazenamento, bem como a melhor temperatura para se preservar a qualidade do

extrato, ficando o consumidor exposto ao consumo de um produto que pode não apresentar mais as características e atividades desejadas.

Diante do exposto, os objetivos do presente estudo são realizar o levantamento de informações sobre a vida útil do extrato alcoólico de própolis, em função da temperatura e tempo de armazenamento, por meio de testes físico-químicos (peso seco, teor de extrato seco, atividade oxidante, teor de cera, compostos fenólicos, pH, solubilidade ao acetato de chumbo, solubilidade ao hidróxido de sódio e teor de cera) e avaliação da atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Produção de própolis*

A própolis foi produzida em colmeias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em colmeias modelo Langstroth, através da técnica do coletor de própolis inteligente (CPI), que consiste na colocação de sarrafos móveis nas laterais de uma melgueira (Lima 2005). As amostras de própolis foram produzidas no apiário da fazenda experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 49' de latitude Sul e 48° 24' de longitude Oeste e altitude média de 623 metros, e após a coleta, a própolis foi armazenada em freezer para o preparo dos extratos alcoólicos e início dos experimentos.

### *Preparo do Extrato Alcoólico de Própolis (EAP)*

A amostra de própolis foi triturada e a solução hidroalcoólica de própolis preparada na diluição de 30% (30g de própolis, completando o volume para 100mL com álcool etílico 70%). A solução permaneceu ao abrigo da luz, sob agitação frequente, durante sete dias. Decorrido este período, foi realizada a filtração com filtros de papel absorvente (Orsi et al. 2000).

### *Armazenamento do EAP*

Após o preparo do EAP, este foi dividido em 48 alíquotas de 50mL cada e colocados em frascos de vidro âmbar.

As alíquotas foram mantidas em duas temperaturas (ambiente e 12°C) e analisadas em 12 períodos (zero, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias). Foram mantidas duas alíquotas para cada temperatura de armazenamento.

Para as análises, as alíquotas foram coletadas de forma aleatória, sendo um frasco por temperatura de armazenamento.

### *Análises físico-químicas*

#### Peso Seco (mg/mL)

Para a determinação do peso seco, 2mL de cada EAP foram colocados em béquer previamente pesado (P1), e mantido em estufa a 50°C até completa evaporação da fase volátil (álcool utilizado como solvente para o preparo do extrato, água e outros compostos voláteis). Em seguida, o béquer foi novamente pesado (P2) e o peso seco determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Peso Seco (mg/mL)} = \frac{P2 - P1}{2}$$

#### Extrato Seco (%)

O Extrato Seco (%) representa o teor de sólidos contidos no EAP, e foi determinado segundo metodologia descrita em Mello e Petrovick (2000), com modificações. Para isto, 20mL do EAP foram pesados e mantidos sob refrigeração durante 24h. Decorrido este período de tempo, o EAP foi filtrado e 5mL deste filtrado retirados com auxílio de pipeta e colocados em béquer, previamente pesado (P1). Esta amostra foi seca em estufa a 105°C, durante 2h. Após este período, o béquer foi colocado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado novamente (P2). A porcentagem de extrato seco foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Extrato Seco (\%)} = \frac{P1 - P2}{P1} \times 100$$

#### -Compostos Fenólicos (%)

Foi determinado segundo metodologia da AOAC (1992), com modificações. Para a determinação da porcentagem de compostos fenólicos, foram pesados 2,5mL dos EAP (P1). Em seguida foi adicionado 7mL de solução etílica 70% e 0,5mL de acetato de chumbo a 10%. A solução foi misturada e deixada em repouso por 24h, em temperatura ambiente. Após este período de tempo, a mistura foi filtrada em papel filtro previamente pesado (P2), e mantido a temperatura ambiente por 12h. Em seguida, o papel filtro foi colocado em estufa a 50°C por uma hora e novamente pesado (P3).

A porcentagem de compostos fenólicos foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Fenólicos (\%)} = \frac{P3 - P2}{P1} \times 100$$

#### - pH

Para a determinação do pH do EAP, foi utilizado um phmêtro digital (TecnoponmPA 210). Para isto, 5mL do EAP foram colocados em béquer e levados em contato com o leitor do aparelho. O pH foi registrado após estabilização. Para padronização do phmêtro foram realizadas leituras dos tampões com pH 4,0 e 7,0, conforme estabelecido na Farmacopéia Brasileira (1988).

#### - Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada segundo metodologia da Farmacopéia Brasileira (1977). Para a determinação da atividade antioxidante, 2 mL do EAP foram colocados em um béquer, adicionando-se, em seguida, 48 mL de água destilada. Desta solução, 0,5 mL da solução foi retirada e colocada em um tubo de ensaio de 15 mL, acrescentando-se 0,5 mL de água destilada e 1mL de ácido sulfúrico 20%. A mistura foi

resfriada em banho de gelo a 18-20°C e, em seguida, adicionados 5 mL de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) 0,1N, observando-se o tempo para o desaparecimento da cor vermelha formada.

Atividade antioxidante = tempo decorrido para a mudança de cor

- Solubilidade ao Acetato de Chumbo

A determinação da solubilidade ao acetato de chumbo tem por objetivo verificar a homogeneidade das partículas do EAP em meio a um sal. Para isto, 1mL do EAP foi colocado em tubo de ensaio contendo 10mL de acetato de chumbo a 10%. A solução foi agitada e mantida em repouso por um período de 3min. Foi considerado como positivo o aparecimento de precipitados amarelos homogêneos no fundo do tubo (AOAC 1992).

- Solubilidade ao Hidróxido de Sódio

A determinação da solubilidade ao hidróxido de sódio tem por objetivo verificar a homogeneidade das partículas do EAP em meio a uma base. Para isto, 1mL do EAP foi colocado em tubo de ensaio contendo 10mL de hidróxido de sódio a 50%. A solução foi agitada e mantida em repouso por um período de 3min. Foi considerado como positivo o aparecimento de precipitados brancos homogêneos em suspensão no tubo (AOAC 1992).

- Teor de Cera (%)

A determinação do teor de cera foi realizada de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1992). Para isto, foram pesados 10g da amostra, a qual foi mantida a temperatura de 4°C, por 8h. Após este período de tempo, foram retirados 5g desta amostra (P1), colocados em béquer e filtrados em papel filtro previamente seco em estufa (2h a 105°C) (P2). Em seguida, o béquer e o papel filtro foram lavados com 5mL de álcool etílico refrigerado, por três vezes. Depois de filtrado, o papel filtro foi seco em temperatura ambiente por 12h, sendo então colocado em estufa a 50°C por 15min. Após, o papel filtro foi retirado da estufa, seco em dessecador e pesado (P3).

A determinação do teor de cera do EAP foi dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Cera (\%)} = \frac{P_3 - P_2}{P_1} \times 100$$

*Análises Microbiológicas*

Para a avaliação da atividade biológica dos EAP foram utilizados dois micro-organismos: bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 35218). A sensibilidade dos micro-organismos aos extratos alcoólicos de própolis foi determinada segundo a técnica da diluição em caldo para determinação da concentração inibitória bactericida (CIB) e semeadura em meio sólido para a concentração inibitória mínima (CIM).

As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio de cultura infusão de cérebro e coração (BHI), com posterior incubação por 24h a 37°C. Decorrido este tempo, a

concentração de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), seguida de diluição para obtenção da concentração final do inóculo em  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Tubos contendo 2,5mL de BHI receberam diluições seriadas de EAP e, em seguida, 20 $\mu$ L da suspensão da linhagem bacteriana foi adicionada ( $1,0 \times 10^6$  UFC/mL em cada tubo).

Os tubos foram incubados a 37°C por 24h. Após este período, foi realizada a semeadura das suspensões em placa de Petri contendo meio Agar Müller Hinton, sendo os resultados registrados após 24h de incubação a 37°C. Foi considerado como CIM a concentração onde não ocorreu crescimento microbiano.

#### *Análise Estatística*

Os resultados dos dados físico-químicos e microbiológicos referentes ao período de tempo estudado para a mesma temperatura de armazenamento foram avaliados por análises de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Para se comparar as temperaturas de armazenamento, no mesmo período, foi utilizado Teste “t” de Student. Foram consideradas como estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$  (Zar 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Físico-Química*

Com relação ao peso seco das amostras de EAPs, pode-se observar que não houve diferença estatística entre as diferentes temperaturas de armazenamento, bem como ao longo do tempo estudado (Tabela 1).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis, presente na normativa nº.:03, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2001), não estabelece um parâmetro de qualidade para essa variável. Entretanto, o peso seco do EAP é um importante parâmetro para se avaliar a eficácia do processo de preparo do extrato alcoólico, por representar a quantidade (gramas) de compostos químicos presentes no produto.

**Tabela 1.** Média e desvio-padrão do peso seco (mg/m) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e geladeira (4°C)

	Peso seco (mg/mL)							
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
*A	170,0 $\pm$ 8,7	170,0 $\pm$ 5,0	171,7 $\pm$ 10,4	175,0 $\pm$ 8,7	168,3 $\pm$ 10,4	172,7 $\pm$ 6,4	176,7 $\pm$ 2,0	175,0 $\pm$ 5,0
*G	176,7 $\pm$ 5,8	180,0 $\pm$ 8,7	185,0 $\pm$ 3,2	183,3 $\pm$ 7,0	175,0 $\pm$ 5,0	182,0 $\pm$ 5,2	183,3 $\pm$ 7,6	178,3 $\pm$ 7,6

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (aprox 25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).

O teor de extrato seco mede a porcentagem de sólidos dissolvidos no EAP. Pode-se observar que não houve diferença significativa para este parâmetro ao longo do período de

tempo estudado, tanto os EAPs mantidos em geladeira quanto em temperatura ambiente (Tabela 2).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis, o valor mínimo permitido para o Extrato Seco é de 11% (Brasil 2001). Desta forma, ambas amostras estudadas apresentaram teor de extrato seco dentro dos limites estabelecidos na legislação em vigor, sendo este valor mantido ao longo dos oito meses de estudo.

De acordo com Sato (2003), os valores de extrato seco podem variar de 1,36% até 95,29%. Park et al. (2000) relata que o para a região sudeste os valores de extrato seco encontram-se na faixa de 54,0% a 65,0% e, segundo Gonsales et al. (2005), os valores da própolis paulista variam de 8,05% a 16,87%, sugerindo que o método de produção da própolis pode interferir na qualidade final do produto. Entretanto, Souza et al. (2009) não encontraram diferenças entre os teores de extrato seco da própolis produzida pelos métodos de coletor de própolis inteligente (CPI), tela plástica e raspagem, bem como influência da sazonalidade. Sendo assim, este fato sugere que as variações de extrato seco podem estar relacionadas com a fonte vegetal de coleta da resina pelas abelhas ou pelo método de preparo do extrato alcoólico.

**Tabela 2.** Extrato seco (%) do extrato hidroalcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento e ao longo do tempo

	Extrato seco (%)							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
<b>A*</b>	12,8±0,3	12,3±0,2	11,8±0,5	12,2±0,1	12,2±3,0	12,6±0,2	12,2±0,2	12,2±0,1
<b>G*</b>	12,5±0,3	12,3±0,4	12,1±0,1	12,3±0,1	12,1±0,1	12,6±0,1	12,3±0,2	12,4±0,1

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).

A temperatura de armazenamento e o período de tempo estudado não interferiram com a porcentagem de compostos fenólicos presente nos EAPs (Tabela 3).

Neste trabalho verificou-se que a porcentagem inicial de compostos fenólicos foi de 0,52±0,01% e 0,53±0,01% para temperatura ambiente e geladeira, respectivamente, estando de acordo com a legislação brasileira, onde o mínimo de compostos fenólicos exigido é de 0,50% (Brasil 2001).

Bonhevi; Cool (1994), encontraram valores de compostos fenólicos em torno de 10,1% para própolis brasileira. Massuda (2003) obteve porcentagem de compostos fenólicos, em extratos alcoólicos de própolis, variando de 5,09% a 5,48%, Sato (2003) observou variação entre 0,01% e 9,30% e, Maldonado (2000); encontrou valores de compostos fenólicos, para a própolis argentina, variando entre 0,42% a 36,04%.

Essa elevada variabilidade de compostos fenólicos na própolis deve-se provavelmente a diferentes fontes de exsudado vegetal, bem como a localização do apiário (Moura 2001).

**Tabela 3.** Média e desvio-padrão dos compostos Fenólicos (%) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento, ao longo do tempo

	Compostos fenólicos (%)							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
*A	0,52±0,01	0,51±0,02	0,52±0,01	0,52±0,01	0,53±0,01	0,52±0,01	0,50±0,01	0,50±0,02
*G	0,53±0,01	0,50±0,01	0,52±0,02	0,54±0,02	0,54±0,01	0,53±0,01	0,54±0,02	0,53±0,02

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (aprox 25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).

Com relação ao pH dos EAPs, pode-se observar que não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento, ao longo do tempo estudado (Tabela 4).

Por outro lado, verifica-se que o valor de pH para o EAP mantido em temperatura ambiente, apresentou variação significativa a partir do sexto mês. Para o extrato mantido em geladeira, ocorreu alteração significativa após 60 dias (Tabela 4). Estes dados sugerem que o pH pode ser influenciado pela temperatura de armazenamento do EAP.

De acordo com Sato (2003) o pH do extrato alcoólico de própolis tende a ser ligeiramente ácido, variando de 3,0 a 5,7 e, segundo as observações de Gonsales et al. (2005), a maior porcentagem de pH encontra-se ao redor de 5,0.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis, presente na normativa nº. 03, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2001), não estabelece um parâmetro de qualidade para essa variável.

**Tabela 4.** Valor de pH para o extrato hidroalcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento, ao longo do tempo

	pH							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
*A	5,18±0,02 <sup>aA</sup>	5,17±0,06 <sup>aA</sup>	5,26±0,05 <sup>aA</sup>	5,29±0,01 <sup>abA</sup>	5,30±0,02 <sup>abA</sup>	5,33±0,02 <sup>abA</sup>	5,48±0,08 <sup>bA</sup>	5,44±0,13 <sup>bA</sup>
*G	5,19±0,02 <sup>aA</sup>	5,13±0,06 <sup>aA</sup>	5,32±0,04 <sup>bA</sup>	5,31±0,04 <sup>bA</sup>	5,34±0,01 <sup>bA</sup>	5,39±0,08 <sup>cA</sup>	5,47±0,04 <sup>cA</sup>	5,62±0,02 <sup>dA</sup>

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).  
<sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05). <sup>A,B</sup>Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05).

Com relação à propriedade antioxidante dos EAP, verificou-se que a temperatura de armazenamento e o tempo analisado, não interferiram com este parâmetro (Tabela 5).

A legislação brasileira estabelece para atividade antioxidante, o tempo máximo é de 22s (Brasil 2001). Sendo assim, os EAPs encontrados enquadram-se dentro do estabelecido.

Gonsales et al. (2005) encontraram valores de atividade antioxidante para extratos alcoólicos de própolis, de diferentes Estados brasileiros, variando entre 5,1s a 250s. Na própolis argentina, Maldonado (2000) relatou valores entre 1,6s a 120s e, Sousa et al. (2007)

relataram para amostras de própolis do Estado de São Paulo (região de Franca) e Minas Gerais (região de Passo), valores de  $52,75 \pm 1,07$  segundos para a própolis paulista e entre 9,58 a 54,75 segundos para a mineira.

O índice de oxidação superior a 22s, pode estar relacionado com o teor de umidade relativa do ar, que poderia favorecer a oxidação natural do produto durante sua produção (Bastos 2001). Entretanto, os resultados de Manrique (2001) demonstraram que a propriedade antioxidante da própolis não foi influenciada pela umidade do ar. Desta forma, a própolis produzida e utilizada para preparo do extrato, pode ser considerada de boa qualidade, mantendo sua viabilidade.

**Tabela 5.** Atividade oxidante (segundos) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento, ao longo tempo

	Atividade antioxidante							
	0 seg	30 seg	60 seg	90 seg	120 seg	150 seg	180 seg	210 seg
*A	6,6 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1
*G	6,3 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).

A solubilidade ao acetato de chumbo tem por objetivo verificar a homogeneidade das partículas do EAP em meio a um sal. Desta forma, todas as amostras de EAP apresentaram-se como positivas, estando de acordo com a legislação (Brasil 2001), não sofrendo influência da temperatura de armazenamento e do tempo.

A solubilidade ao acetato de chumbo tem por objetivo verificar a homogeneidade das partículas do EAP em meio a uma base. Desta forma, todas as amostras de EAP apresentaram-se como positivas, estando de acordo com a legislação (Brasil 2001), não sofrendo influência da temperatura de armazenamento e do tempo.

Quanto ao teor de cera (%) presente nos EAPs, pode-se verificar que este parâmetro não foi influenciado pela temperatura e tempo de armazenamento (Tabela 6).

Segundo Negri et al. (1998), o termo cera representa uma mistura de compostos apolares de cadeia longa. Embora a cera seja um componente natural da própolis, sua presença acima dos limites estabelecidos pela legislação pode ocasionar depreciação do produto e conseqüente perda de comercialização.

Massuda (2003) encontrou para extrato aquoso de própolis valores de cera variando de 0,0 a 0,09% e para extrato alcoólico valores entre 0,72 a 2,19%, concluindo que os extratos aquosos apresentam menor porcentagem de cera. Sato (2003) obteve para o EAP valores de cera variando de 0,19 a 11,14%.

**Tabela 6.** Médias estimadas e desvio-padrão do teor de cera (%) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento, ao longo do ano

	Teor de cera							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
*A	1,02±0,05	1,00±0,02	0,98±0,03	0,96±0,02	0,97±0,01	0,99±0,01	0,97±0,02	1,00±0,03
*G	1,02±0,02	0,99±0,02	1,00±0,01	0,98±0,01	0,97±0,02	0,99±0,01	0,98±0,02	0,99±0,01

\*A = amostras armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e G = amostras armazenadas em geladeira (4°C).

#### Atividade Antimicrobiana

Os testes microbiológicos demonstraram que os EAPs apresentaram atividade biológica, promovendo inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, independente da temperatura de armazenamento. Verificou-se ainda que não houve diferença estatística ao longo do tempo estudado para ambas temperaturas (Tabela 1).

Meresta e Meresta (1985) examinaram a sensibilidade de *Staphylococcus sp* para o EAP, observando alta sensibilidade. Park et al. (2000) também observaram atividade biológica da própolis contra *Staphylococcus aureus* utilizando a metodologia de difusão em meio ágar. Da mesma forma, Kujumgiev et al. (1999), Marcucci et al. (2001), Lu et al. (2005), Scazzocchio et al. (2006) e Seidel et al. (2008) constataram a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* à própolis.

Com relação à *Escherichia coli* também não foram observadas alterações significativas na atividade antibacteriana do EAP, independente da temperatura de armazenamento e tempo estudado (Tabela 2).

Fernandes Jr et al. (2006) relatam concentração inibitória mínima para *Escherichia coli* de 7,0%, 8,2% e 8,5% v/v respectivamente, para as amostras de Urubici (SC), Mossoró (RN) e Botucatu (SP). Da mesma forma, outros autores evidenciaram o efeito do EAP sobre *Escherichia coli* (Katircioglu; Mercan 2006, Mohammadzadeh et al. 2007, Fangio et al. 2007).

Inúmeros pesquisadores têm estudado a propriedade antimicrobiana da própolis, evidenciando sua eficiente ação contra bactérias Gram-positivas e limitada atividade contra bactérias Gram-negativas (Grange; Davey 1990, Fernandes et al. 1997, Sforcin et al. 2000). Neste trabalho, verificou-se menor susceptibilidade da *Escherichia coli* ao EAP, estando os resultados condizentes com a literatura.

Para verificar um possível efeito do etanol 70% - veículo utilizado como solvente no preparo dos extratos, foram realizados experimentos com ambas as linhagens bacterianas estudadas. Pode-se verificar que o etanol 70% inibiu o crescimento tanto de *Staphylococcus aureus* quanto de *Escherichia coli*. Entretanto, esta inibição foi significativamente menor que a observada com os EAPs, sugerindo que a atividade antibacteriana apresentada pelos extratos de própolis é devida aos componentes do apiterápico (Tabelas 7 e 8).

**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento e etanol 70% contra *Staphylococcus aureus*, ao longo do ano

	Concentração inibitória mínima							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
*EAP – A	13,7±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,7±0,6 <sup>aA</sup>	14,7±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>
*EAP – B	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,7±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,7±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>	14,3±0,6 <sup>aA</sup>
Etanol 70%	17,3±0,6 <sup>aB</sup>	17,7±0,6 <sup>aB</sup>	18,3±0,6 <sup>aB</sup>	17,7±0,6 <sup>aB</sup>	17,7±0,6 <sup>aB</sup>	18,0±0,0 <sup>aB</sup>	17,7±0,6 <sup>aB</sup>	18,3±0,6 <sup>aB</sup>

\*EAPA = amostras armazenadas a temperatura ambiente (aprox 25°C) e EAPB = amostras armazenadas a temperatura 12°C. <sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05). <sup>A,B</sup>Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05).

**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis submetido a duas temperaturas de armazenamento (ambiente A e B) e etanol 70% contra *Escherichia coli*, ao longo do ano

	Concentração inibitória mínima							
	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias
EAP – A	5,7±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,7±0,6 <sup>aA</sup>	5,7±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>
EAP – B	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,7±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,7±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>	5,3±0,6 <sup>aA</sup>
Etanol 70%	8,3±0,6 <sup>aB</sup>	8,7±0,6 <sup>aB</sup>	8,3±0,6 <sup>aB</sup>	8,7±0,6 <sup>aB</sup>	8,7±0,6 <sup>aB</sup>	8,0±0,0 <sup>aB</sup>	8,7±0,6 <sup>aB</sup>	8,3±0,6 <sup>aB</sup>

\*EAPA = amostras armazenadas a temperatura ambiente (aprox 25°C) e EAPB = amostras armazenadas a temperatura 12°C. <sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05). <sup>A,B</sup>Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias (P<0,05).

## CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que a EAP (extrato alcoólico da própolis) apresenta modificações em sua composição físico-química variando a sua temperatura, e com isso, a qualidade e a quantidade de compostos são alteradas, levando a modificações físico-químicas. Na atividade antibacteriana, a variação de temperatura não interferiu na sua qualidade microbiológica e a eficiência bactericida, apresentando atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não sofrendo influência da temperatura de armazenamento, mantendo sua atividade antibacteriana durante o tempo analisado.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. Transinf [Internet]. 1992 [acesso em 2015 jul 10] Disponível em: [www.conapis.com.br/legislacao.htm](http://www.conapis.com.br/legislacao.htm).
- Bankova V, Boudourova-krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*. 1998; 29:361-7.
- Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch*. 1999;54(c):401-5.

- Bankova V, Dyulgerov A, Popov S, Evstatieva L, Kuleva L, Pureb O, Zamjansan Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*. 1992;23:79-85.
- Barbosa, MH, Zuffi FB, Maruxo, HB, Jorge, LLR. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm*. 2009;22(3):318-22.
- Boudourova-Krasteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Z Naturforsch*. 1997;52(c):676-9.
- Boyanova L, Gergova G, Nikoloy R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I, Krastev Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol*. 2005;54:481-3.
- Brasil. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa n.º 3, de 19 de janeiro de 2001. *Diário Oficial [da] União*. 2001 jan 23, Seção 1. p.18-23.
- Breyer HFE. Própolis produção com *Apis mellifera*. In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura, 1996 nov 26-30, Teresina, BR. Teresina: CBA, 1996.
- Brighenti DM, Guimarães CR. Desenvolvimento de coletor de própolis de alta qualidade. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 2000 nov 14-17, Florianópolis, BR. Florianópolis: CBA, 2000.
- Burdock GA. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chem Toxicol*. 1998;36:347-63.
- Castro SL. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *ARBS*. 2001;2:49-83.
- Couto RHN, Couto LA. Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal: FUNEP. 2002:191.
- Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R, Kubiça TF, Lovato LT. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Cienc Rural*. 2011;41(10):1800-06.
- Cunha PM, Evangelista A. Análise comparativa da produção de três diferentes métodos de coleta de própolis em colmeias de *Apis mellifera*. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 2000 nov 14-17, Florianópolis, BR. Florianópolis: CBA, 2000.
- Dustmann JH. Honey, quality and its control. *Am. Bee J*. 1993;133:648-51.
- Farmacopéia Brasileira. 3. ed. Ed. Organização Andrei, São Paulo. 1977:662.
- Farmacopéia Brasileira. 4. ed., Ed. Atheneu, São Paulo. 1988;2.5-2.9-2.10-2.19.
- Hu-Fuliang, Hepburn HR, Li Ying H, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:276-283.
- Lima MG. Efeito de variáveis ambientais, rainhas selecionadas e sistemas coletores na Apoidea. [Tese]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2005.
- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Rev Bras Farmaco*. 2008;18(3):447-454.

- Machado BAS, Cruz LS, Nunes SB, Guez MAU, Padilha FF. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. *Revista Geintec*. 2012;2(3):221-35.
- Mello JCP, Petrovick PR. Quality control of *Baccharistrimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farma Bonaerense*. 2000;19:211-215.
- Moura LPP. Longevidade, produção de própolis e áreas de desenvolvimento de colméias de *Apis mellifera* africanizada, submetida a quatro técnicas de coleta, em quatro períodos do ano. [Tese] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2001.
- Orsi RO, Fernandes Júnior A, Sforcin JM, Rall VLM, Barbosa L, Funari SRC. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom and Animals Toxins*. 2005;11(2):109-116.
- Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi AS, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom Anim. Toxins*. 2000;6:205-19.
- Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Fernandes Jr A, Bankova V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella*. *Thypi Braz J Microbiol*. 2006;37:108-12.
- Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL, Abreu JAS. Atividade antimicrobiana da própolis em microorganismo oral. *Cur Microbiol*. 1998;34:24-28.
- Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem doce*, 2000;58: 2-7.
- Salamanca G. El sistema de control y puntos críticos de la extracción y beneficio de propóleos. In: Congreso Internacional de Propóleos, 2000, Buenos Aires, AG. Buenos Aires: Proapi, 2000.
- Scheller S, Dworniczak S, Klimmek KW, Rajca M, Tomczyk A, Shani J. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z Naturforsch*. 1999;54:9-53.
- Siqueira AL, Dantas CG, Gomes MZ, Padilha FF, Albuquerque Jr RLC, Cardoso JC. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. *Rev Odontol UNESP*. 2014;43(6):359-66.
- Thimann RY, Manrique A. Recolección de propoleo en colônias de abejas africanizadas durante la temporada de lluvias en el apiário de la Unellez, Guanare, Venezuela. *Zootec Trop*. 2002; 20(4): 493-500. Thomson W. Propolis. *Med J Aust*. 1990;153:654.
- Toledo VAA. Estudo comparativo de parametros biológicos e de produção de cera e geléia real em colonias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, carnicas, italianas e seus híbridos. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1997.
- Vitali AA, Quast DG. Vida-de-prateleira de alimentos. IN: Moura SCSR, Germer SPM (coordenadores). Manual do curso reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados. Campinas: Frutotec. Governo do Estado de São Paulo. 2002;36-45.
- Zar JH. *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 1996;718.