



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## **ESTUDO SOBRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS OBTIDOS COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**

**ANA LUISA BUTELLI FIANCO**

FARMACÊUTICA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. GILSANE LINO VON POSER

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Março 2014**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, Ricardo, Salete, Ana Clara e Ricardinho.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## ESTUDO SOBRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS OBTIDOS COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

**CANDIDATA: ANA LUISA BUTELLI FIANCO**

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

DRA. GILSANE LINO VON POSER - CO-ORIENTADORA

### BANCA EXAMINADORA

DRA. FLÁVIA VALLADÃO THIESEN - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - PUCRS

DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

**PUCRS**

Campos Central  
Av. Itália, 9251 - Prédio 30 - Sala 100 - CEP: 91210-900  
Telefone: (51) 3333-4039 - Fax: (51) 3320-3625  
E-mail: [engenheiro@pg.materiais@pucrs.br](mailto:engenheiro@pg.materiais@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/feng](http://www.pucrs.br/feng)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho:

À toda minha família pelo apoio, presença e por sempre acreditarem na minha capacidade. Em especial os meus pais, Ricardo e Salete, pela insistência e encorajamento nas decisões difíceis ao longo da vida e por estarem sempre sorrindo. Aos meus irmãos, meus melhores amigos, os quais tornam minha vida muito mais divertida. Agradeço aos meus avós, pela força, carinho e afeto.

Agradeço às minhas amigas, por todos os momentos, conselhos, abraços e risadas.

Ao meu namorado Bernardo, pela maneira simples como vê o mundo e o bom humor invejável, além de todo o apoio e amor.

À todos as pessoas que fazem parte do Laboratório de Operações Unitárias, pela ajuda diária e pela amizade que será pelo resto da vida; em especial à Aline Machado Lucas, Caroline Finkler e Manuel Falcão, indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Muito obrigada ao meu orientador Eduardo Cassel, pela tranquilidade e objetividade nos ensinamentos, bem como à minha co-orientadora Gilsane Lino von Poser, por toda sua preocupação, grande apoio e ensinamentos.

Ao professor Alexandre Fuentefria, pela possibilidade de realização dos testes antifúngicos no Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À CAPES, pela oportunidade e bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	2
AGRADECIMENTOS .....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE QUADROS .....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS .....	14
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1. Própolis .....	15
3.1.1. Composição química da própolis.....	16
3.1.2. Própolis verde .....	17
3.1.3. Própolis vermelha .....	18
3.2. Métodos de extração.....	19
3.2.1. Maceração.....	19
3.2.2. Extração supercrítica.....	20
3.3. Propriedades biológicas da própolis.....	21
3.3.1. Atividade antifúngica .....	21
3.3.1.1. Infecções causadas por candida .....	23
3.3.2. Atividade antioxidante .....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
4.1. Amostras e preparo.....	27
4.2. Extração supercrítica .....	28
4.3. Análise cromatográfica .....	31
4.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	31
4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	31
4.3.2.1. Padrões .....	31
4.4. Atividade antifúngica .....	32
4.4.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	32
4.4.1.1. Micro-organismos utilizados.....	32

4.4.1.2. Preparo do inóculo antifúngico .....	33
4.4.1.3. Preparo das amostras.....	33
4.5. Ação antioxidante.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. Rendimento.....	35
5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
5.3. Análise por CLAE .....	38
5.3.1. Padrões .....	38
5.3.2. Própolis verde .....	39
5.3.3. Própolis vermelha .....	41
5.4. Atividade antioxidante .....	45
5.5. Atividade antifúngica .....	46
6. CONCLUSÕES .....	48
7. REFERÊNCIAS .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Própolis verde bruta. ....	17
Figura 3.2. Principais compostos presentes na própolis verde.....	18
Figura 3.3. Própolis vermelha bruta.....	18
Figura 3.4. Estrutura química dos principais componentes presentes na própolis vermelha.....	19
Figura 3.5. Diagrama de fases pressão x temperatura do CO <sub>2</sub> . ....	21
Figura 3.6. Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante .....	26
Figura 4.1. Unidade piloto de extração por fluido supercrítico.....	28
Figura 4.2. Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica... ..	29
Figura 4.3. Esquema utilizado no método de extração supercrítica inicial a partir da própolis bruta.....	29
Figura 4.4. Esquema utilizado no segundo método de extração supercrítica a partir dos EEP impregnados em papéis filtro. ....	30
Figura 5.1. Rendimento <i>versus</i> tempo da extração supercrítica dos extratos etanólicos da própolis verde e vermelha. ....	37
Figura 5.2. Perfis cromatográficos dos extratos supercríticos da própolis verde e vermelha nas condições 90, 120, 150 e 300 bar a partir da própolis bruta e a partir dos EEP impregnados nas condições 90, 150 e 300 bar.. ..	38
Figura 5.3. Cromatogramas (CLAE) dos padrões de ácido cumárico, canferol e da amostra enriquecida com benzofenonas.....	39
Figura 5.4. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir dos EEP da própolis verde. ....	40
Figura 5.5. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta nas condições 90, 120, 150 e 300 bar.....	41
Figura 5.6. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos dos EEP da própolis vermelha.....	43
Figura 5.7. Benzofenonas preniladas presentes nos extratos supercríticos dos EEP da própolis vermelha nas condições 150 e 300 bar. ....	43

Figura 5.8. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta nas condições 90, 120, 150 e 300 bar. ....44



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1. Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos supercríticos de EPP de própolis verde e vermelha obtidos à 40°C .....45
- Tabela 5.2. Concentração Inibitória Mínima e Fungicida Mínima dos extratos supercríticos do extrato supercrítico obtido a partir da própolis vermelha a 120 bar e 40°C. ....47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Espécies encontradas com maior frequência e suas associações clínicas. ....	24
---	----

## RESUMO

FIANCO, Ana Luisa B. **Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico**. Porto Alegre, 2014. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas através da coleta de metabólitos secundários da flora e sua composição química é complexa e variada, conferindo a este produto diversas atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e antioxidante. O extrato da própolis pode ser obtido por extração supercrítica, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente, sendo esta uma tecnologia limpa, atóxica e que não deixa resíduo. Este trabalho tem como objetivo extrair e avaliar quimicamente e biologicamente extratos de própolis verde e vermelha produzidos pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*. Foram realizadas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico a partir da própolis bruta e de seus extratos etanólicos, os quais foram impregnados em papéis filtro. As pressões utilizadas para fracionamento da própolis bruta foram 90, 120, 150, 200, 250 e 300 bar, e da própolis impregnada em papéis filtro, 90, 150 e 300 bar. Para comparação dos perfis cromatográficos nas diferentes pressões, análises químicas através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas. A composição química dos extratos a partir dos extratos etanólicos de própolis (EEP) impregnados e da própolis bruta permaneceu similar, porém o rendimento dos extratos supercríticos a partir dos EEP impregnados em papéis filtro apresentou valores muito mais elevados. Os extratos supercríticos obtidos apresentaram atividade antifúngica e excelente atividade antioxidante.

Palavras-Chaves: própolis, extrato supercrítico, fracionamento, análise química, atividades biológicas.

## ABSTRACT

FIANCO, Ana Luisa B. **Study on the antifungal and antioxidant activity of propolis extracts obtained with supercritical CO<sub>2</sub>**. Porto Alegre, 2014. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

Propolis is a resinous substance produced by bees through the collection of plant secondary metabolites and its chemical composition is complex and varied, giving this product several biological activities such as antibacterial, antifungal and antioxidant. The propolis extract can be obtained by supercritical fluid extraction using CO<sub>2</sub> as solvent, which is a clean and non-toxic technology, leaving no residue. This work aims to extract chemically and biologically extracts of green and red propolis produced by bees of the species *Apis mellifera*. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction from the raw propolis and its ethanolic extracts, which were impregnated in filter papers, were performed. The pressures used for fractionation of raw propolis were 90, 120, 150, 200, 250 and 300 bar and, for the propolis impregnated in filter papers, 90, 150 and 300 bar. For comparison of the chromatographic profiles at different pressures, chemical analysis using Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were done. The chemical composition of the extracts from impregnated propolis ethanolic extracts (PEE) and raw propolis remained similar, but the yield of supercritical extracts from impregnated PEE in filter papers showed much higher values. Supercritical extracts showed antifungal activity and excellent antioxidant activity.

Key-words: propolis, supercritical extract, fractionating, antimicrobial activity, antioxidant activity.

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm se tornado, nos últimos anos, um avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas (Oldoni, 2007). Dentre eles, destaca-se a própolis, a qual é uma substância resinosa obtida pelas abelhas através da coleta de metabólitos secundários de plantas e sua composição química é complexa e variada, sendo responsável por diversas atividades biológicas (Barth *et al.*, 1999; Bogdanov, 2012).

Neste sentido, o uso de produtos naturais no combate a infecções é uma alternativa bastante trabalhada (Richardon & Lass-Flörl, 2008), pois se observa ao longo das últimas décadas que estudos reportaram aumento na incidência de infecções invasivas causadas por espécies emergentes do gênero *Candida* em hospitais, tornando-se uma das principais causas de morte por infecções hospitalares (Beck-Sague *et al.*, 1993; Berrouane *et al.*, 1999; Lalwani *et al.*, 2014; Mathur *et al.* 2014;). Devido às mudanças nos padrões de doenças infecciosas e ao aparecimento de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados, há uma grande necessidade de encontrar novas abordagens para o tratamento destas infecções (Taylor *et al.*, 2002), sendo estudada nesta dissertação o uso de extratos de própolis e suas frações como alternativa.

Neste trabalho foi realizada a extração e fracionamento com CO<sub>2</sub> supercrítico da própolis verde e vermelha bruta e de seus extratos etanólicos. Entre as variáveis importantes neste estudo encontram-se o rendimento e composição química assim como atividade antifúngica e antioxidante dos extratos. A partir dos resultados obtidos, foi feita uma comparação entre a atividade biológica e composição química das amostras e suas frações.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo extrair, utilizando como solvente CO<sub>2</sub> supercrítico, e avaliar quimicamente e biologicamente extratos de própolis verde e vermelha produzidas pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Fracionamento da própolis verde e vermelha com dióxido de carbono supercrítico;
- Análise e comparação dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos supercríticos de própolis;
- Determinação da atividade antioxidante dos extratos por captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).
- Determinação da atividade antifúngica frente às espécies de *Candida*: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* - concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pesquisa de produtos naturais como agentes terapêuticos é realizada há muitos anos e até hoje oferece uma grande variedade de estruturas químicas, as quais são utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica (Borris, 1996; Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Entre todos os novos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) ou outras entidades equivalentes de outros países, 28% delas são de origem direta de produtos naturais e 39% são derivadas destes (Newman *et al.*, 2002).

Enquanto muitas moléculas oriundas de produtos naturais possuem atividades terapêuticas, há um enorme número que ainda não foi detalhadamente estudada (Mukherjee *et al.*, 2001). Dentre os diversos tipos de produtos naturais, a própolis vem se tornando importante devido as suas múltiplas propriedades terapêuticas, despertando interesse na apicultura e em seus derivados comerciais (Aldemann, 2005).

#### 3.1. Própolis

A própolis (grego; *pro*, em defesa + *polis*, cidade) é uma substância resinosa produzida pelas abelhas através da coleta de metabólitos secundários da flora da região e sua composição química é complexa e variada (Marcucci, 1996; Burdock, 1998, Drago *et al.*, 2007; Búfalo *et al.*, 2009). É composta principalmente por resinas de plantas e exsudatos. Os metabólitos são misturados com cera, pólen e secreções salivares das abelhas, originando uma mistura rica e heterogênea. Sua composição química depende da flora de sua origem geográfica e da época do ano (Burdock, 1998; Bogdanov, 2012).

As abelhas utilizam a própolis como proteção mecânica e biológica. Estas aplicam finas camadas de própolis nas paredes internas da colmeia para vedar orifícios e rachaduras, fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colmeia contra intempéries e para impedir a putrefação de insetos invasores, já que este produto contém atividade antimicrobiana (Bankova *et al.*, 2000).

### 3.1.1. Composição Química da Própolis

É conhecido que a composição química da própolis é muito variável, sendo composta por aproximadamente 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos (Park & Ikegaki, 1998; Bogdanov, 2012).

Devido a grande complexidade química, a própolis é considerada uma das misturas mais complexas já encontradas em fontes naturais. Sua composição química é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (Kumazawa *et al.*, 2004).

Bankova *et al.* (1998) estudaram as variações sazonais da composição química da própolis brasileira e europeia, encontrando diferentes teores de diterpenos no verão e outono e ausência destes compostos nas outras estações. Os principais constituintes encontrados em diferentes épocas foram os compostos fenólicos, especialmente os derivados do ácido cinâmico (de 1,2 a 10,8%), e os diterpenos (0,3 a 11,3%).

Os compostos fenólicos, representados pelos flavonoides agliconas e ácidos fenólicos e seus ésteres, conferem efeitos terapêuticos à própolis (Bedascarrasbure *et al.*, 2004; Silici & Kutluca, 2005; Uzel *et al.*, 2005; Umthong *et al.*, 2009). A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, pode atribuir à própolis propriedades antibacterianas (Bianchini & Bedendo, 1998; Bosio *et al.*, 2000; Sawaya *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006; Kalougeropoulos *et al.*, 2009;), antifúngica (Ota *et al.*, 2001), antisséptica (Simões *et al.*, 2008), antiviral (Huleihel &



Isanu, 2002), antioxidante (Moreira *et al.*, 2008), antitumoral (Díaz-Carballo *et al.*, 2008) e anti-inflamatória (Ramos & Miranda, 2007).

Em estudo realizado por Park *et al.* (2002), a própolis brasileira foi subdividida em 12 grupos em função de suas características físico-químicas e regiões geográficas onde são produzidas e foram observadas similaridades entre os perfis químicos de amostras de própolis originárias do sul, sudeste e nordeste do Brasil e exsudatos de *Hyptis divaricata* e o broto de *Baccharis dracunculifolia*, desvendando suas prováveis origens botânicas.

### 3.1.2. Própolis Verde

Mais popular e estudada, a própolis verde (Figura 3.1) é produzida no Brasil, principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, e possui fragmentos da planta *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo). Sua principal fonte vegetal lhe confere cor esverdeada (Bastos, 2001; Park *et al.*, 2002). Os componentes típicos da própolis verde são os compostos prenilados e derivados do ácido cinâmico (estando entre eles a artepelina C, ácido p-cumárico e drupanina), flavonoides, ácido benzoico, ácidos alifáticos e ésteres, além de possuir alcanos e terpenoides (Marcucci & Bankova, 1999; Park *et al.*, 2002; Bogdanov, 2012). A Figura 3.2 apresenta os compostos derivados do ácido cinâmico mais abundantes na própolis verde. A artepelina C é o composto mais popular e importante relatado em estudos, pois confere a este tipo de própolis diversas atividades biológicas (Hata *et al.*, 2012).



Figura 3.1. Própolis verde bruta. Fonte: O autor

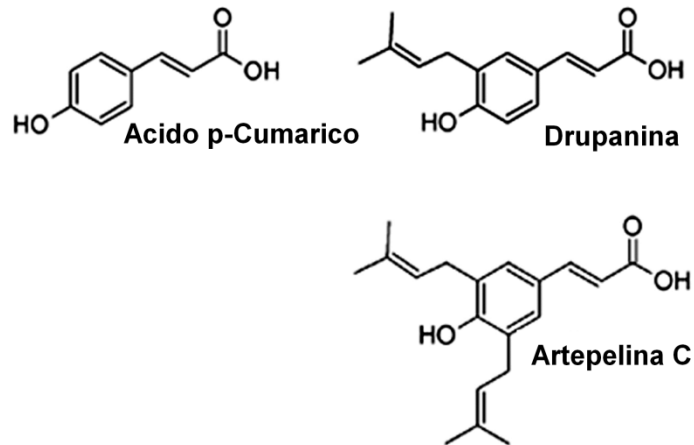


Figura 3.2. Principais compostos presentes na própolis verde. Fonte: Chang *et al.*, 2008.

### 3.1.3. Própolis Vermelha

Há pouco tempo descoberta, a própolis vermelha (Figura 3.3) foi encontrada em colmeias ao longo do litoral e dos rios do Nordeste do Brasil (Daugsch *et al.*, 2007). De acordo com Park *et al.* (2002), a origem botânica deste tipo de própolis ainda não foi completamente elucidada. Daugsch *et al.* (2007) encontraram semelhanças entre a composição química dos exsudatos resinosos da planta *Dalbergia ecastophyllum* e o extrato etanólico da própolis (EEP) vermelha.

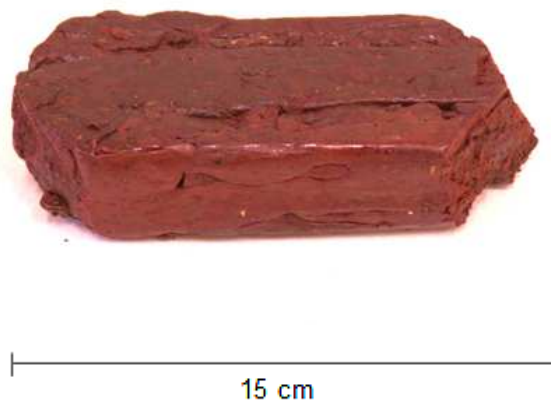


Figura 3.3. Própolis vermelha bruta. Fonte: O autor

Há muitos estudos que exploram a própolis vermelha. Trusheva *et al.* (2006) identificaram 14 compostos presentes neste tipo de própolis, seis destes nunca mencionados como componentes da própolis, entre eles fenóis, triterpenoides,

isoflavonas e benzofenonas preniladas. As benzofenonas (Figura 3.4) estão entre os compostos mais importantes presentes na própolis vermelha. Fasolo *et al.* (2013) isolaram benzofenonas presentes em extratos da própolis vermelha e a fração isolada apresentou atividade antifúngica frente a espécies do gênero *Candida*. Oldoni (2007) analisou a composição química de EEP vermelha e identificou quatro isoflavonas, também nunca antes identificadas neste tipo de própolis.

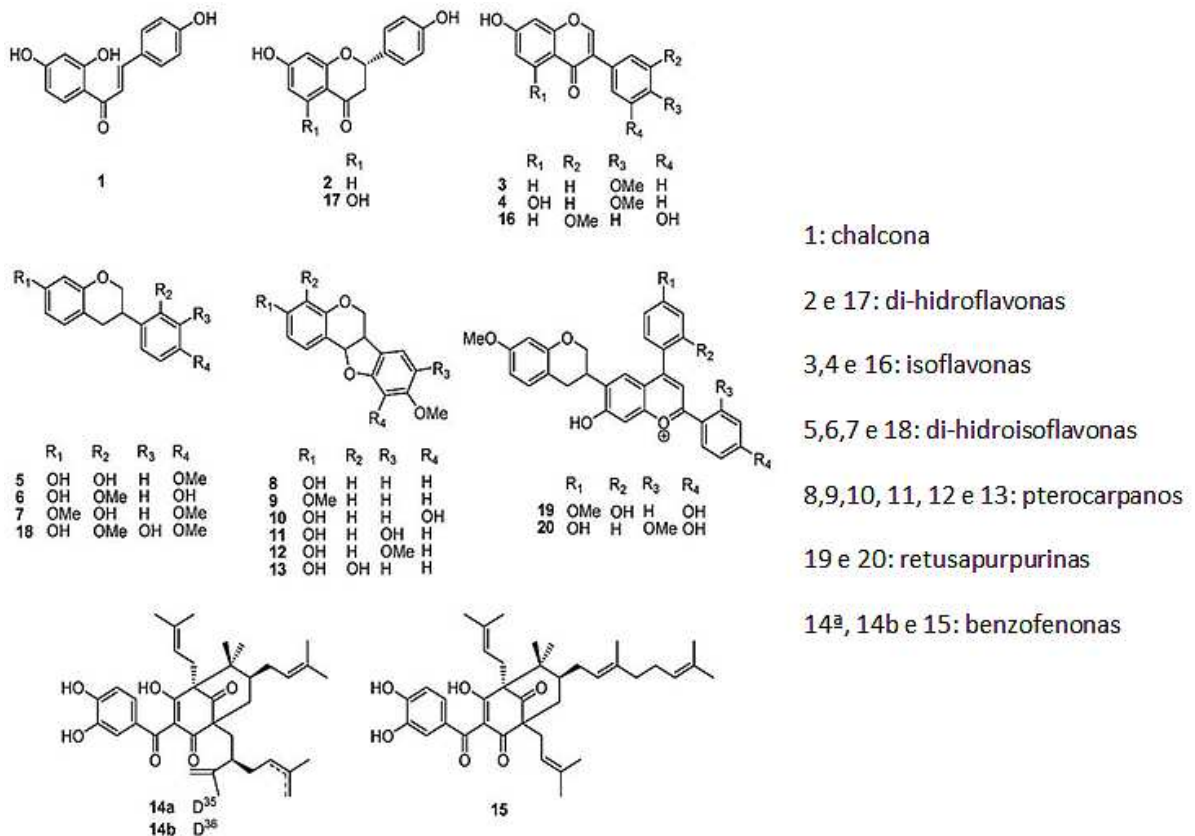


Figura 3.4. Estrutura química dos principais componentes presentes na própolis vermelha. Fonte: Piccinelli *et al.*, 2011.

## 3.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

### 3.2.1. Maceração

É o processo na qual a extração dos compostos presentes na matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do

líquido extrator. Os líquidos extratores comumente utilizados são o etanol e as soluções hidroetanólicas (Simões *et al.*, 2003).

O EEP é o predominante em estudos de própolis e nas indústrias farmacêutica e alimentícia. A maneira mais comum é extrair a fração solúvel em etanol, denominada bálsamo, removendo a parte insolúvel ou fração de cera (Catchpole *et al.*, 2004). Embora o EEP seja o mais empregado, a extração com outros solventes vem sendo muito utilizada e já identificou mais de 200 constituintes (Marcucci, 1995).

### 3.2.2. Extração Supercrítica

A utilização de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fluido supercrítico para extração de produtos naturais é muito vantajosa e vem se destacando frente aos métodos tradicionais de extração, pois além de utilizar um solvente atóxico e não deixar resíduos do mesmo no produto final pode ser operado a baixas temperaturas, evitando a degradação de possíveis compostos termolábeis presentes no extrato final. Além disso, a extração com  $\text{CO}_2$  é um método não poluente e muito versátil, uma vez que os parâmetros de extração podem ser facilmente modificados pela adição de outros solventes, polares ou apolares, e também pela mudança nas condições de extração, como pressão e temperatura (Maul, 1999). Um fluido supercrítico é muito sensível a pequenas variações de pressão, temperatura e densidade (Cassel, 1998). Modificando-se tais parâmetros, podem-se estabelecer as condições adequadas para a obtenção dos compostos desejados, como por exemplo, os flavonoides. Por serem polares, são quase que insolúveis em  $\text{CO}_2$ , mas quando adicionado um co-solvente como o etanol, há separação de compostos polares e compostos de alta massa molecular (Maul, 1999; Catchpole *et al.*, 2004).

A extração supercrítica pode ser definida como a solubilização de determinados compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente nas condições supercríticas. No processo de extração, o  $\text{CO}_2$  é comprimido e liquefeito; aquecido e pressurizado a uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, aproximadamente  $31^\circ\text{C}$  e 73 bar, respectivamente (Figura 3.5). Após atingir o seu

estado supercrítico, condição onde possui uma viscosidade análoga a de um gás e uma capacidade de dissolução elevada como a de um líquido, o solvente percola o leito onde a amostra está depositada, dissolvendo os componentes presentes na matéria-prima. Os compostos dissolvidos precipitarão quando o solvente retornar para o estado gasoso (Cassel *et al.*, 2008).

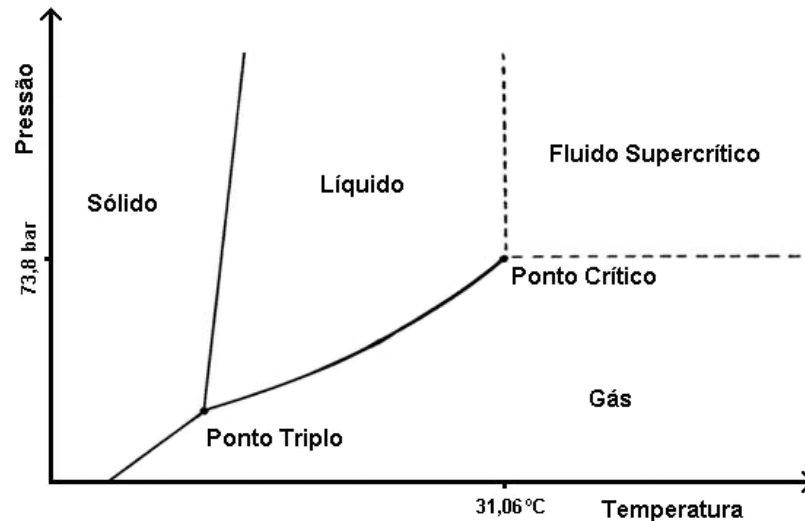


Figura 3.5. Diagrama de fases pressão x temperatura do CO<sub>2</sub>. Fonte: adaptado de Carrilho *et al.*, 2001.

Os compostos obtidos por esta técnica de extração, utilizando CO<sub>2</sub>, são reconhecidos como seguros (*Generally Recognised as Safe – GRAS*) para uso na produção de alimentos e medicamentos (Gerald & May, 2002).

### 3.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

Devido à complexidade e grande variedade de compostos, a própolis possui uma série de ações biológicas, já citadas anteriormente. As atividades antifúngica e antioxidante serão abordadas neste trabalho.

#### 3.3.1. Atividade antifúngica

A própolis é o produto das abelhas com importante atividade antifúngica, o que foi observado quando testado em 40 cepas de leveduras de *Candida albicans*,

*Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Trichosporon spp*, em estudo realizado na Turquia (Koç *et al.*, 2011). Katircioglu & Yucel (2002) também observaram atividade contra *C. albicans* de extratos de própolis coletado no mesmo país.

Há uma série de estudos relacionando própolis com atividade antifúngica. Kujumgiev *et al.* (1999) testaram a atividade de EEP de diferentes regiões geográficas contra *C. albicans* e todas as amostras apresentaram atividade antifúngica similar, mesmo originárias de diferentes países.

A atividade antifúngica dos EEP de amostras de própolis coletadas em São Paulo foi verificada em 80 cepas de levedura de *Candida*, estando entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, resultando maior sensibilidade a *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Ota *et al.*, 2011).

Em estudo realizado no México, Quintero-Mora *et al.* (2008) verificaram atividade antifúngica dos extratos etanólicos e de amostras comerciais de própolis provenientes de diferentes regiões mexicanas, observando maior atividade biológica no EEP proveniente da região de Cuautitlán Izcalli, o qual inibiu 94,4% dos isolados clínicos a uma concentração de 0,8 mg/mL.

O aumento na prevalência de micoses, o aparecimento de cepas fúngicas resistentes aos agentes antimicóticos empregados na atualidade e os efeitos secundários que estes últimos provocam nos pacientes são, sem dúvida, alguns indicadores da necessidade de encontrar novos compostos que cumpram com os requisitos de um antifúngico ideal, ou seja, ter um amplo espectro de atividade, ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível em formulações oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ser custo-efetivo e estável à resistência microbiana (Quintero-Mora *et al.*, 2008). Há grande procura por novos agentes antifúngicos atóxicos e eficientes para aperfeiçoar o controle de fungos patógenos (Koç *et al.*, 2011).

### 3.3.1.1. Infecções causadas por *Candida*

Infecções sistêmicas causadas por fungos constituem um grande problema de saúde em muitas partes do mundo, tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos (Khan & Gyanchandani, 1998). O gênero *Candida* vem sendo o maior causador de micoses oportunistas do mundo e há uma grande deficiência no tratamento deste patógeno (Pfaller & Diekema, 2004, Pappas *et al.*, 2004; Spellber *et al.*, 2006).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (Colombo & Guimarães, 2003). Infecções por este fungo envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Estas infecções se tornaram comuns em pacientes de UTI (Pfaller, 1989; Kawfmann *et al.*, 2011; Osawa *et al.*, 2013).

A taxa de mortalidade devido a infecções por espécies de *Candida* está entre 19% a 24%, provocando aumento significativo dos custos hospitalares totais, devido ao maior tempo de internação dos pacientes e à intervenção necessária (Morgan *et al.*, 2005).

O gênero *Candida* é constituído por mais de 100 diferentes espécies, porém apenas algumas são patógenas para o ser humano (Tabela 3.1). As principais espécies de interesse clínico são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* e *C. lusitaniae* (Colombo & Guimarães, 2003; Li *et al.*, 2011).

A introdução de triazóis, como o fluconazol, nos anos 90 proporcionou uma nova opção para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos (Trick *et al.*, 2002). Consequentemente, médicos começaram a utilizar fluconazol para diversas indicações clínicas, embora estudos sobre este fármaco ainda não estivessem aprofundados (Grasela *et al.*, 2000). Pfaller *et al.* (1999) observaram que certas espécies de *Candida* (*C. krusei* e *C. glabrata*) possuem uma tendência para a

diminuição da susceptibilidade ao fluconazol. O desenvolvimento do mecanismo de resistência de certas espécies de leveduras é associado com exposições repetidas ou contínuas de baixas doses do medicamento.

Quadro 3.1. Espécies encontradas com maior frequência e suas associações clínicas. (Adaptado de Rex *et al.*, 1998)

<b>Espécies</b>	<b>Frequência</b>	<b>Virulência</b>	<b>Associação Clínica</b>
<i>C. albicans</i>	42%-65%	Alta	Mais comum
<i>C. tropicalis</i>	11%-25%	Alta	Câncer
<i>C. glabrata</i>	7%-15%	Baixa	Câncer
<i>C. parapsilosis</i>	7%-18%	Variável	Dipositivos de plástico, hiperalimentação
<i>C. krusei</i>	1%-4%	Baixa	Câncer
<i>C. lusitaniae</i>	1%-2%	Baixa	Câncer

### 3.3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de um composto é determinada por alguns fatores como a reatividade com o agente doador de elétrons, o potencial em quelar metais de transição, a reatividade frente outros compostos antioxidantes e o destino do derivado do radical antioxidante (Rice-Evans, 1997).

Os fenilpropanois, flavonoides e ácidos fenólicos são estruturas importantes que contribuem para esta atividade, e suas estruturas químicas determinam sua ação antioxidante. Geralmente, quanto maior o número de hidroxilas presentes em suas estruturas químicas, maior a atividade como agente doador de hidrogênio e elétrons (Cao *et al.*, 1997).

Os flavonoides podem afetar a atividade de vários sistemas, estando entre eles a capacidade de a inibição da ativação de enzimas envolvidas na conversão de



ácidos graxos poliinsaturados para ativar mediadores, como a fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipoxigenase e combatendo radicais livres (Nagai *et al.*, 2003).

A própolis brasileira possui em sua composição química principalmente derivados de ácidos fenólicos, sendo capaz de eliminar os radicais livres protegendo a membrana celular contra a peroxidação lipídica, tornando-a um potente agente antioxidante (Marcucci *et al.*, 1998).

Há diversos estudos relacionando atividade antioxidante com o teor de compostos fenólicos. Park *et al.* (2000) confirmaram elevada atividade antioxidante em EEP de várias regiões do Brasil através do método de oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoléico, afirmando que já esperavam tamanha atividade devido à presença dos compostos fenólicos nos EEP.

Cabral *et al.* (2009) avaliaram extratos com polaridades crescentes obtidos em amostras de própolis vermelha oriundas do Estado de Alagoas. Os EEP e suas frações apresentaram forte atividade antioxidante e antibacteriana, estando esta relacionada com o conteúdo de polifenóis.

Existem diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante, alguns baseados na captura de determinados radicais, outros baseados no poder de redução dos metais e na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos. O método de determinação da atividade antioxidante a ser utilizado neste estudo é a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil – DPPH (Rufino *et al.*, 2007).

O DPPH caracteriza-se como um radical livre estável por virtude da localização de um elétron livre sobre toda a molécula. Esta localização do elétron gera uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de  $\lambda = 520$  nm. Quando adicionado substrato (antioxidante ou uma espécie radicalar) à solução de DPPH, há doação de um átomo de hidrogênio, estabilizando a molécula de DPPH e gerando um decréscimo na absorbância (Figura 3.6), caracterizado pela mudança da coloração violeta para amarela (Halliwell & Gutteridge, 2007).

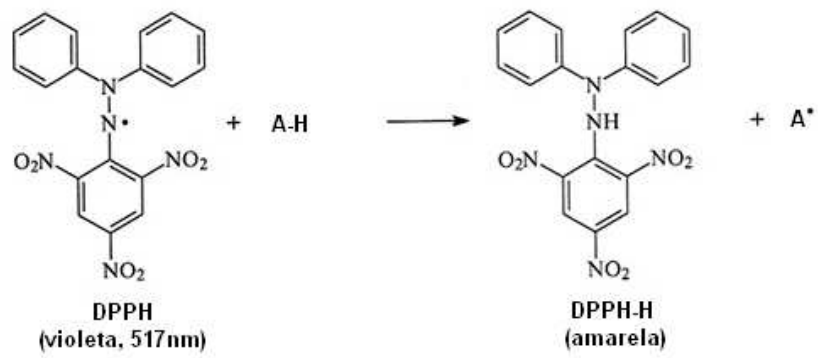


Figura 3.6. Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante (AH). Fonte: Adaptado de Halliwell & Gutteridge, 2007.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostras e preparo

As amostras de própolis foram adquiridas da empresa Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (Mamboi – MG) em Novembro de 2011. As amostras de própolis vermelha apresentam coloração marrom avermelhada e parecem ser menos quebradiças do que as de própolis verde. Visualmente, a própolis verde possui coloração esverdeada e ambas as amostras possuem aroma característico.

Foram realizados dois procedimentos de extração supercrítica. Inicialmente, as extrações em meio supercrítico foram realizadas a partir de ambas as amostras de própolis na forma bruta. Estas foram congeladas (para facilitar a trituração), trituradas e pesadas. Após, a extração foi realizada em pressões sucessivas de 90 a 300 bar.

Posteriormente, um novo procedimento de extração foi realizado: a extração supercrítica a partir dos EEP impregnados em papéis filtro. Nesta nova extração as amostras brutas foram processadas de maneira idêntica à extração supercrítica anterior, porém passaram por uma etapa prévia de maceração. A maceração foi realizada através da diluição 1:1 (m/m) com etanol 70% (v/v) em aproximadamente 50 gramas de amostra, e o sistema foi armazenado em ambiente fechado à temperatura de 25 °C por um período de duas semanas (Fianco *et al.*, 2013). Esse procedimento foi repetido três vezes, visando esgotar o material. Posteriormente, os EEP foram reunidos, filtrados e impregnados em papéis filtro qualitativos.

## 4.2. Extração Supercrítica

A extração com CO<sub>2</sub> supercrítico foi realizada em uma unidade piloto de extração supercrítica (Cassel *et al.*, 2011) que fica localizada no Laboratório de Operações Unitárias, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. (Figura 4.1).



Figura 4.1. Unidade piloto de extração por fluido supercrítico. Fonte: Scopel, 2013.

O processo de extração (Figura 4.2) consiste na pressurização do dióxido de carbono até suas condições de pressão e temperatura acima de seu ponto crítico, através de uma bomba de alta pressão. O CO<sub>2</sub> líquido armazenado no cilindro (C1) é encaminhado para um trocador de calor (HE1), o qual impede a mudança de estado do solvente. Ainda líquido, o CO<sub>2</sub> é pressurizado em uma bomba de alta pressão (P1- Maximator® – G35) e aquecido em um trocador de calor (HE2), entrando na região supercrítica. A partir daí, o CO<sub>2</sub> em condições supercríticas percola o leito (EV1) onde está presente o material vegetal. Este então é parcialmente solubilizado e seus compostos são conduzidos até uma zona de baixa pressão (VS1 e VS2), na qual ocorre a expansão do fluido através de uma válvula (MV1-Hoke®-icromite® 1600), precipitando os compostos de interesse.

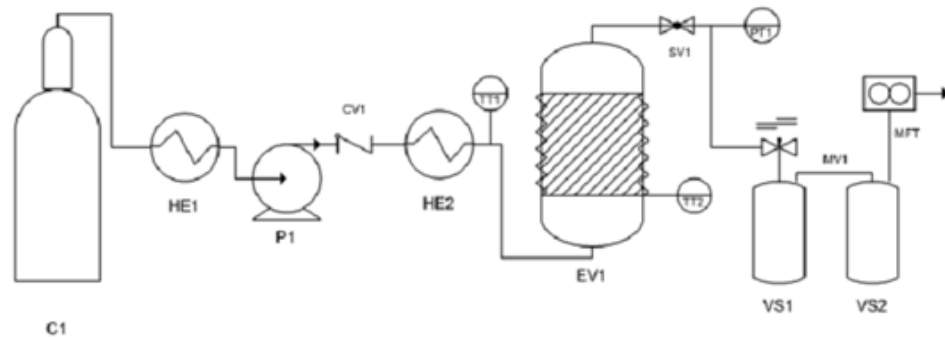


Figura 4.2. Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica. Fonte: Scopel, 2013.

Na extração supercrítica a partir da própolis bruta, os fragmentos obtidos no preparo das amostras (descrito no item 4.1) foram colocados no vaso extrator e submetidos às pressões 90, 120, 150, 200, 250 e 300 bar, sucessivamente, à temperatura de 40°C, sendo recolhidos seis extratos da própolis vermelha e seis extratos da própolis verde, totalizando doze extratos supercríticos (Figura 4.3). Após a extração, foi realizada a retirada de ceras com acetona. O rendimento global foi calculado através da razão entre a massa total extraída e a massa inicial da amostra bruta e, como as extrações nas pressões 90, 120, 150, 200, 250 e 300 bar foram realizadas a partir da mesma amostra, obteve-se dois valores totais de rendimento: um para a própolis vermelha e um para a própolis verde.

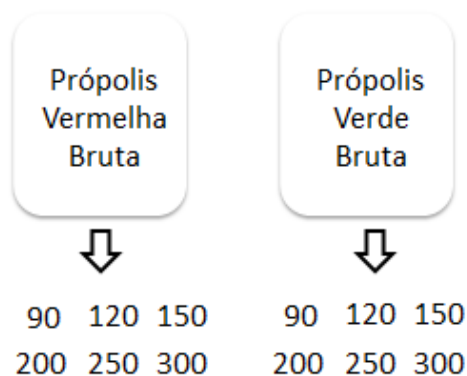


Figura 4.3. Esquema utilizado no método de extração supercrítica inicial a partir da própolis bruta.

No segundo procedimento de extração, os EEP da própolis verde e vermelha impregnados em papéis filtro foram submetidos às pressões 90, 150 e 300 bar, a 40°C obtendo-se em um total, 6 extratos, como pode ser observado na Figura 4.4. Para cada pressão, os papéis filtro impregnados foram trocados por outros que

ainda não haviam sido utilizados. Estes novos papéis impregnados foram sujeitos a uma diferente pressão e completamente esgotados. Após a extração à pressão específica, a tubulação foi lavada, removendo os compostos extraídos na pressão anterior.

As curvas de rendimento do extrato versus tempo foram construídas determinando, a cada 5 minutos, a massa de extrato obtida. O processo foi finalizado com o esgotamento da amostra na sua respectiva pressão, isto é, em três intervalos seguidos não se observou variação na massa de extrato. As extrações tiveram uma duração média de aproximadamente duas horas para cada condição de pressão. Foram obtidos ao total valores de rendimento para as seis condições estudadas devido a troca dos papéis de filtro a cada nova pressão.

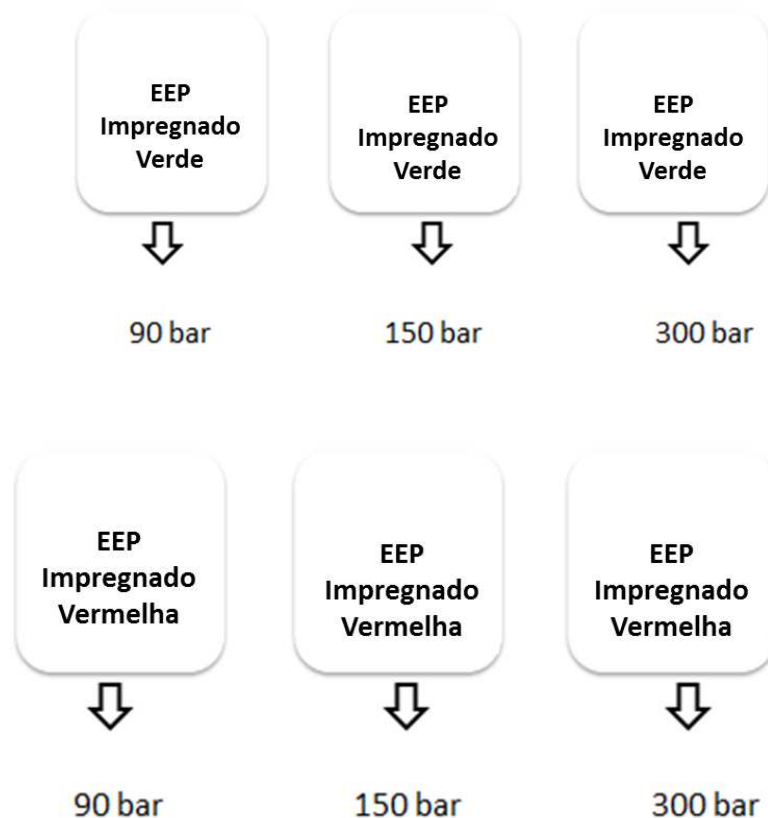


Figura 4.4. Esquema utilizado no segundo método de extração supercrítica a partir dos EEP impregnados em papéis filtro.

### 4.3. Analise cromatográfica

#### 4.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após a etapa de extração, uma comparação cromatográfica por CCD foi realizada a fim de observar, através dos tempos de retenção, a existência de alguma diferença nas composições químicas dos extratos supercríticos.

Com um capilar, alíquotas dos extratos foram aplicadas em forma de bandas a uma placa de sílica gel GF<sub>254</sub> e foram empregados como fase móvel diclorometano a 100%. Após a migração dos solventes, as placas cromatográficas foram armazenadas por 24 horas até a total volatilização da fase móvel. Posteriormente, uma solução de vanilina sulfúrica foi utilizada como revelador (Fianco *et al.*, 2013).

#### 4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE (Agilent, modelo 1200 Series com detector UV) foram feitas de acordo com o método descrito por Chang (2008). Foi empregada uma quantidade de aproximadamente 30 mg dos extratos supercríticos de própolis. Em seguida, foram filtrados em um filtro Millipore (0,22 $\mu$ , Whatman) e um volume de 20  $\mu$ L de cada amostra foi injetado no aparelho. A fase móvel utilizada foi metanol e água/ácido fórmico (0,5%), iniciando com metanol a 20% e, após 40 minutos, o elevando a 100%, com fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi um C18 (4,6 x 250 mm x 5  $\mu$ m) e o comprimento de onda utilizado no detector foi de 345 nm. A corrida foi de 60 minutos.

##### 4.3.2.1. Padrões

Os padrões utilizados neste estudo foram ácido cumárico (Sigma-Aldrich), canferol (Sigma-Aldrich) e uma fração de própolis vermelha enriquecida em benzofenonas (fornecida pelo Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). A fração de benzofenonas

utilizada como padrão foi obtida através do estudo de Fasolo *et al.* (2013), o qual identificou os compostos como sendo xantoquimol, gutiferona E e oblongifolina A. 20 µL de uma concentração de 1,25 mg por mL de metanol foi injetada para cada padrão e analisada utilizando o mesmo método analítico descrito no item anterior. Após a corrida, os tempos de retenção foram determinados e comparados com os dos compostos presentes nos extratos supercríticos obtidos.

#### 4.4. Atividade antifúngica

Um ensaio preliminar para avaliação da atividade antifúngica da própolis verde e vermelha foi realizado. As amostras utilizadas neste ensaio foram as frações extraídas por fluido supercrítico a 120 bar a 40 °C obtidas a partir da própolis bruta (conforme descrito no item 4.2 ).

##### 4.4.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para verificação da suscetibilidade dos micro-organismos isolados aos extratos de própolis obtidos, a metodologia utilizada foi o teste de microdiluição em caldo, seguindo o método proposto e padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), também segundo o protocolo M-27–A3 (CLSI, 2008) para quantificação.

##### 4.4.1.1. Micro-organismos utilizados

Os micro-organismos utilizados foram quatro espécies de *Candida* consideradas emergentes: *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Para cada espécie, três cepas foram testadas: *Candida krusei* CK02, CK03 e CK04, *Candida glabrata* RL02, RL03 e CG03, *Candida parapsilosis* RL01, RL13 e CP04 e *Candida tropicalis* RL16, RL17 e CT09.



#### 4.4.1.2. *Preparo do inóculo antifúngico*

Tomando-se como referencial o método de microdiluição, segundo as recomendações do documento M27-A3 da CLSI (2008), as leveduras foram cultivadas em placas de Petri estéreis com ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol à 32°C por 24 horas. As leveduras então foram suspensas em solução estéril de salina a 0,9% (m/v) e ajustadas até atingirem a escala número 0,5 de McFarland, que corresponde à  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, foi realizada a diluição 1:50 em solução salina estéril e, a partir desta, foi diluído 1:20 em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 para obter-se o inóculo com concentração de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC por mililitro, o qual foi utilizado no experimento.

#### 4.4.1.3. *Preparo das amostras*

As amostras foram diluídas em DMSO 2% (v/v), chegando à concentração final de 1 mg/mL. As concentrações utilizadas para este ensaio foram obtidas através de diluições seriadas nas microplacas estéreis a partir de 200 µL caldo Sabouraud, adicionando-se após 100 µL das suspensões dos inóculos das quatro cepas fúngicas, obtendo-se valores de 250 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,6 µg/mL, 7,8 µg/mL, 3,9 µg/mL, 1,9 µg/mL e 0,8 µg/mL.

Como controle positivo, foram adicionados 100 µL caldo RPMI e 100 µL de inóculo (preparado como descrito anteriormente) de cada variedade de fungo. Como controle negativo, 200 µL de caldo RPMI. Os testes foram realizados em triplicata.

Em seguida, as microplacas foram tampadas e incubadas a 35 ° C por 48 horas em estufa bacteriológica. Após o tempo de incubação necessário, a leitura macroscópica da placa foi realizada através de análise visual, verificando a formação ou não de aglomerados de células no fundo das cavidades da placa. A CIM foi determinada através da menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento e o crescimento visível das cepas; e a CFM, através da menor concentração do extrato capaz de matar as leveduras.

#### 4.5. Ação antioxidante

O método de determinação da atividade antioxidante utilizado neste estudo foi a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) e modificado por Rufino *et al.* (2007).

Uma solução etanólica de DPPH foi preparada a uma concentração de 0,06 M. Protegidas da luz e em ambiente escuro, alíquotas da solução foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a  $\lambda = 515$  nm. Como branco, utilizou-se o etanol. Como controle positivo, o flavonóide quercetina foi utilizado.

Separadamente, 0,05 g das amostras de própolis verde e vermelha foram diluídas em 1 mL de etanol. A partir desta diluição, mais duas diluições foram realizadas, obtendo-se concentrações de 50% e 25% (m/v).

As diluições foram feitas em uma solução de álcool etílico absoluto P.A (Merck) e de radical livre DPPH. Através de um espectrofotômetro modelo SP-220 (Bioespectro em comprimento de onda de  $\lambda = 515$  nm), as leituras das absorvâncias foram realizadas para cada concentração até a total estabilização do sistema, para a posterior construção da curva de absorvância *versus* tempo, a qual permite a verificação da existência de ação oxidante das amostras (Brand-Williams *et al.*, 1995). A partir destes dados foi possível determinar o IC<sub>50</sub>, expresso em grama de extrato por grama de DPPH, que corresponde à concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A definição das condições operacionais do processo de extração supercrítica foi difícil de ser obtida devido à falta de dados na literatura. Porém, foi observado que a maioria dos trabalhos encontrados realizava a extração supercrítica a partir do EEP (Calado *et al.*, 2008; Paviani *et al.*, 2010; Paviani *et al.*, 2012). De acordo com Catchpole *et al.*, (2004), a própolis não é muito solúvel em CO<sub>2</sub> supercrítico, porém se torna muito mais solúvel em CO<sub>2</sub> + etanol.

A impregnação dos extratos em papel filtro foi realizada devido à grande dificuldade de extração a partir da própolis bruta, a qual provocou entupimento da tubulação do equipamento, por seu alto teor de resinas. O novo método utilizado consistiu em realizar as extrações a partir dos EEP, de ambas as própolis, impregnados em papéis filtro, eliminando previamente as ceras e resinas.

### 5.1. Rendimento

A extração supercrítica realizada a partir da própolis bruta apresentou baixos rendimentos devido à quantidade elevada de ceras e resinas. As resinas dificultam o processo de extração devido a suas propriedades aderentes e de difícil remoção levando ao acúmulo de amostra na tubulação do equipamento. O rendimento total obtido dos extratos a partir da própolis vermelha e verde bruta foram, respectivamente, 7,20% e 4,56%. Os baixos valores de rendimentos também podem ser explicados pelo difícil acesso do CO<sub>2</sub> supercrítico pela matéria bruta, com passagem apenas na área mais superficial das amostras, não permeando seu interior. Com os extratos impregnados em papéis filtro a área a ser permeada se torna muito maior, pois a remoção de ceras aumenta o acesso ao interior do extrato,

facilitando a passagem do CO<sub>2</sub> e a solubilização e transporte dos compostos de interesse e, conseqüentemente, aumentando o rendimento.

Paviani *et al.* (2012) realizaram extração supercrítica a partir da própolis verde bruta e de seu extrato etanólico seco, utilizando etanol como co-solvente em concentrações crescentes. Observaram que os rendimentos da extração a partir da própolis bruta sem adição de co-solvente apresentaram valores muito menores (3 a 7%). Quando se empregava solvente supercrítico com concentrações crescentes de etanol, o rendimento aumentava significativamente, chegando a valores de rendimento de até 51%.

Os extratos supercríticos a partir dos EEP impregnados em papéis filtro apresentaram rendimentos crescentes em relação ao aumento da pressão. Quando se eleva a pressão do processo, o poder solvente do CO<sub>2</sub> aumenta, pois há aumento de sua densidade. Conseqüentemente, há um aumento da capacidade de solubilizar compostos de elevadas massas molares, justificando a maior massa obtida nas pressões mais altas (Brunner, 1994).

Nas curvas de rendimento apresentadas no gráfico da Figura 5.1, pode-se observar aumento significativo nos rendimentos da própolis verde e vermelha de 90 a 300 bar, isto é, de 6,22% à 44,25% para a própolis vermelha e de 5,95% à 21,80% para a própolis verde.

A partir dos dados experimentais das curvas de rendimento *versus* tempo é possível realizar a modelagem das mesmas usando modelos de transferência de massa (Vargas *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2013). Este procedimento é de grande relevância quando da realização do *scale-up* do processo de extração supercrítica.

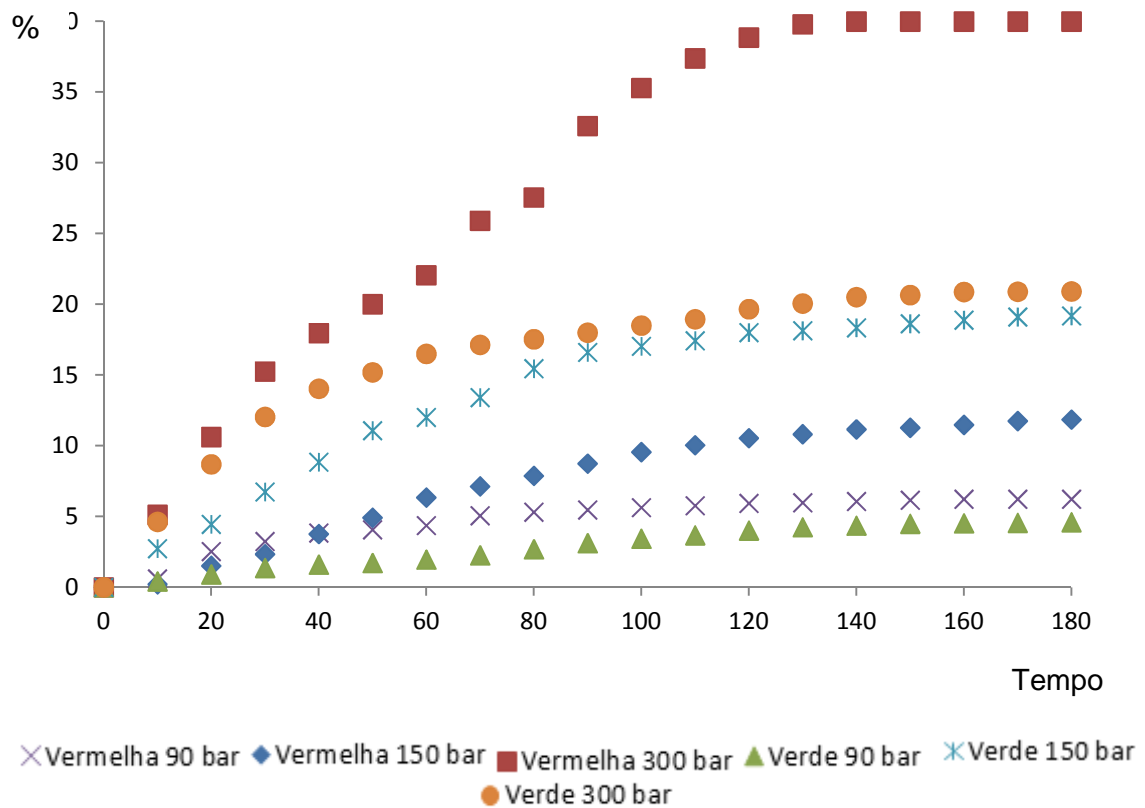


Figura 5.1. Rendimento versus tempo da extração supercrítica dos extratos etanólicos da própolis verde e vermelha.

## 5.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos supercríticos obtidos a partir do EEP e a partir da própolis bruta apresentaram perfis cromatográficos muito semelhantes, possuindo tempos de retenção e coloração muito similares (Figura 5.3). A similaridade na composição química também foi observada entre as diferentes pressões de cada tipo de extrato.

A partir dos resultados obtidos pela CCD, onde não se observou diferenças significativas, definiu-se pela realização de análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O emprego desta metodologia analítica teve como objetivo avaliar as diferenças de concentrações de compostos presentes nos extratos obtidos a diferentes pressões, assim como avaliar a possibilidade de identificar os compostos a partir do uso de padrões.

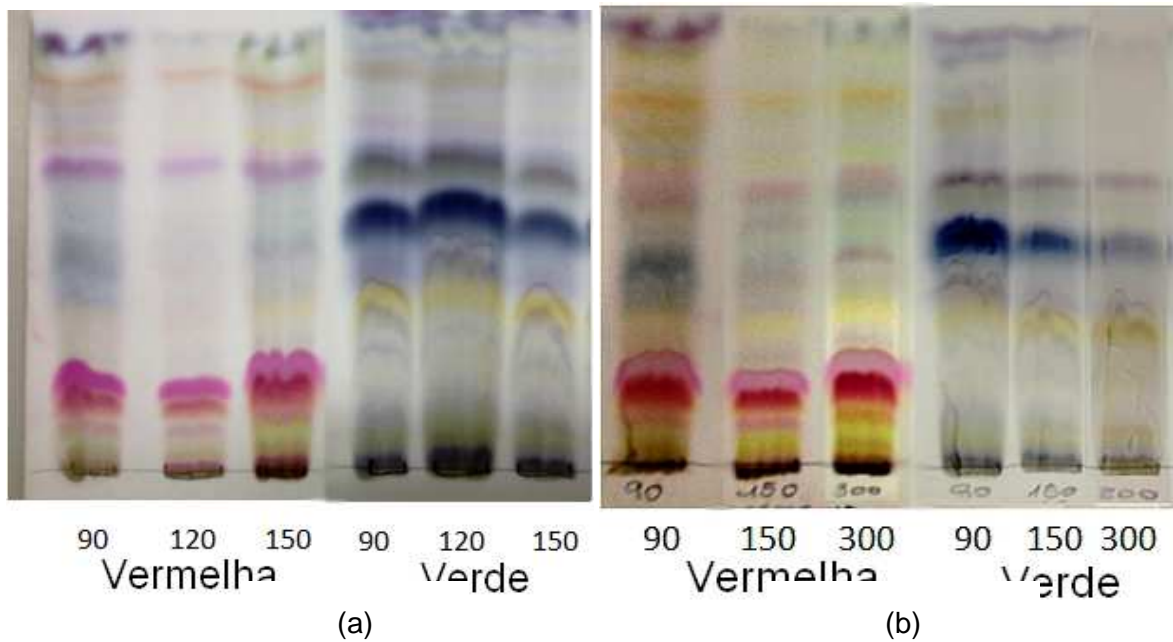


Figura 5.2. Perfis cromatográficos dos extratos supercríticos da própolis verde e vermelha nas condições 90, 120, 150 e 300 bar a partir da (a) própolis bruta e a partir dos (b) EEP impregnados nas condições 90, 150 e 300 bar. Fase móvel utilizada: diclorometano a 100%.

### 5.3. Análise por CLAE

#### 5.3.1. Padrões

Os tempos de retenção dos padrões injetados no CLAE foram de aproximadamente 8 min para ácido cumárico e 23 min para o canferol (Figura 5.3). A amostra enriquecida em benzofenonas apresentou picos abundantes na região de aproximadamente 43 min. Estes padrões são muito relatados como compostos importantes presentes na própolis verde e vermelha, respectivamente. (Trusheva, 2006; Hata *et al.*, 2012).

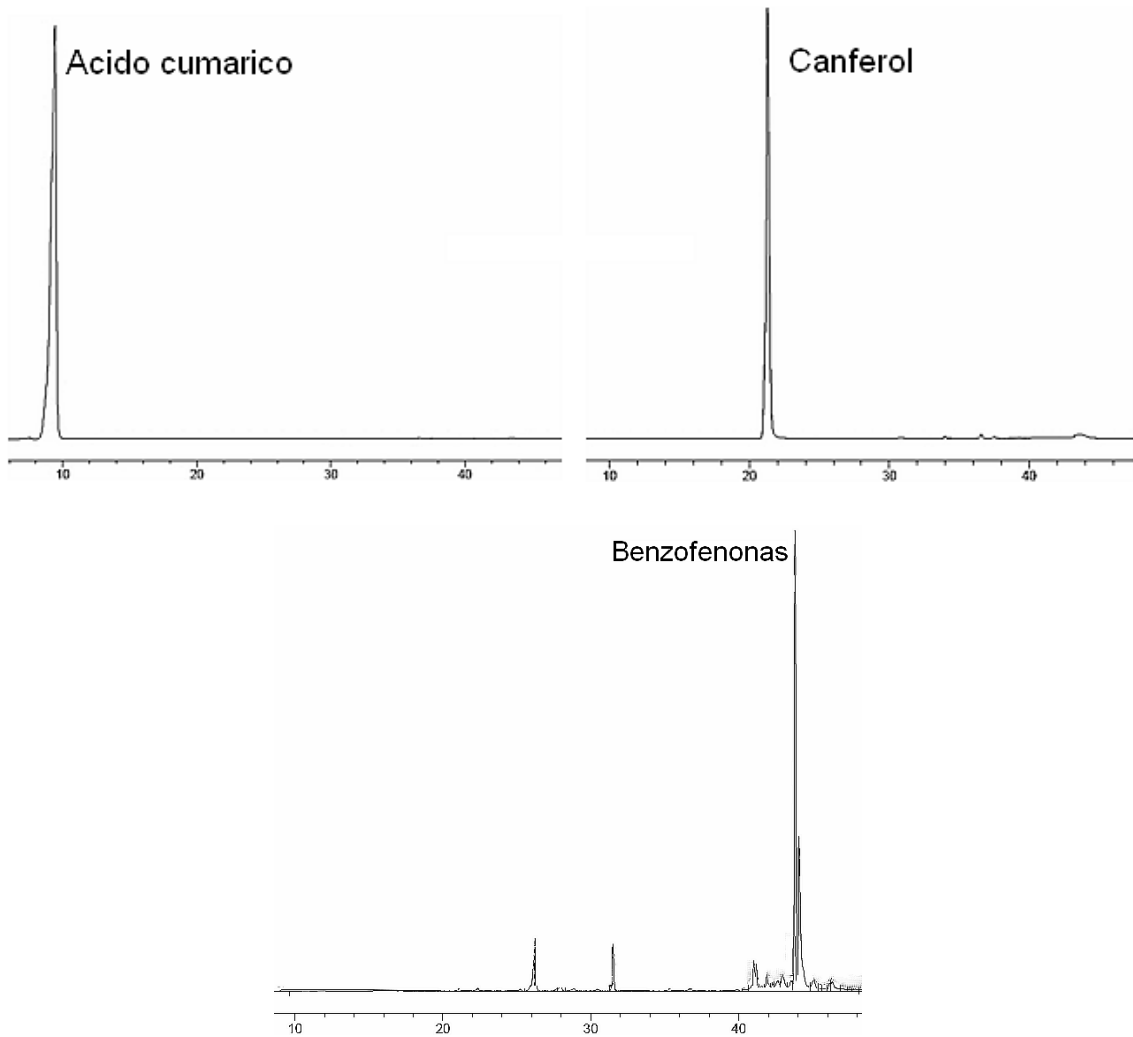


Figura 5.3. Cromatogramas (CLAE) dos padrões de ácido cumárico, canferol e da amostra enriquecida com benzofenonas.

### 5.3.2. Própolis Verde

Os perfis cromatográficos dos três extratos de EEP de própolis verde mostraram-se bastante semelhantes (Figura 5.4), apresentando compostos majoritários que são praticamente comuns a quase todas elas, como por exemplo, os compostos presentes entre os tempos de retenção aproximados de 20 a 40 minutos. Nas condições de análise, não se observa presença significativa de compostos com tempos de retenção inferiores a 19 minutos.

Na Figura 5.4 é possível observar que a fração obtida à 90 bar, diferentemente das outras frações obtidas, apresentou um pico com grande

intensidade no tempo de retenção próximo a 20 min. Utilizando o estudo de Chang *et al.* (2008) como comparação, infere-se que este pode ser um composto derivado do ácido cinâmico, o qual pode ser obtido em concentrações maiores na condição 90 bar, pois os autores analisaram extratos etanólicos de própolis verde por HPLC-APCI-MS e CH-MS identificando, principalmente pelo método de HPLC-APCI-MS, compostos derivados do ácido cinâmico, flavonoides, ácido benzoicos, aromáticos não hidroxilados e ácidos e ésteres alifáticos. Chang e colaboradores determinaram que a artepelina C, por ser um composto mais apolar, está localizada na região final do cromatograma, com tempo de retenção próximo a 39 minutos, logo é possível inferir que este composto esteja também presente nos extratos obtidos, pois se observa na Figura 5.4 a presença de picos majoritários entre 33 e 38 minutos e, através disso, pode-se dizer que são que apresentam mesmo perfil químico que a artepelina C .

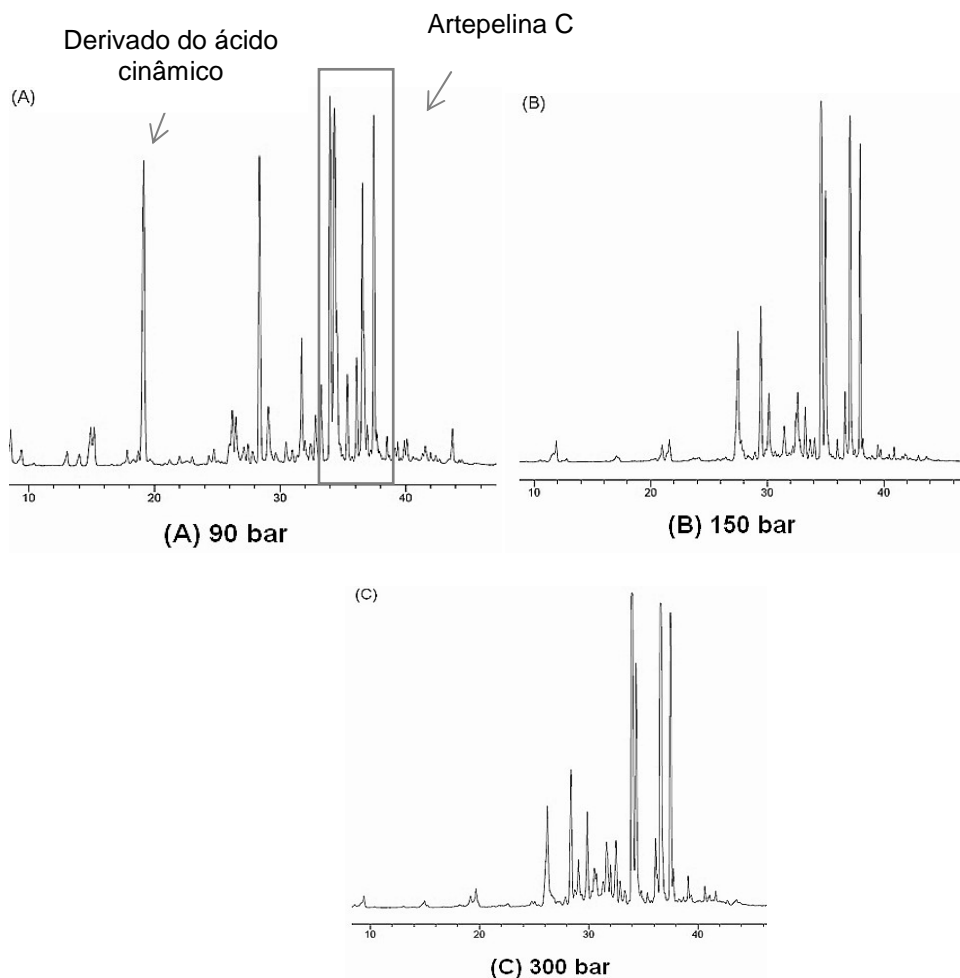


Figura 5.4. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir dos EEP da própolis verde.



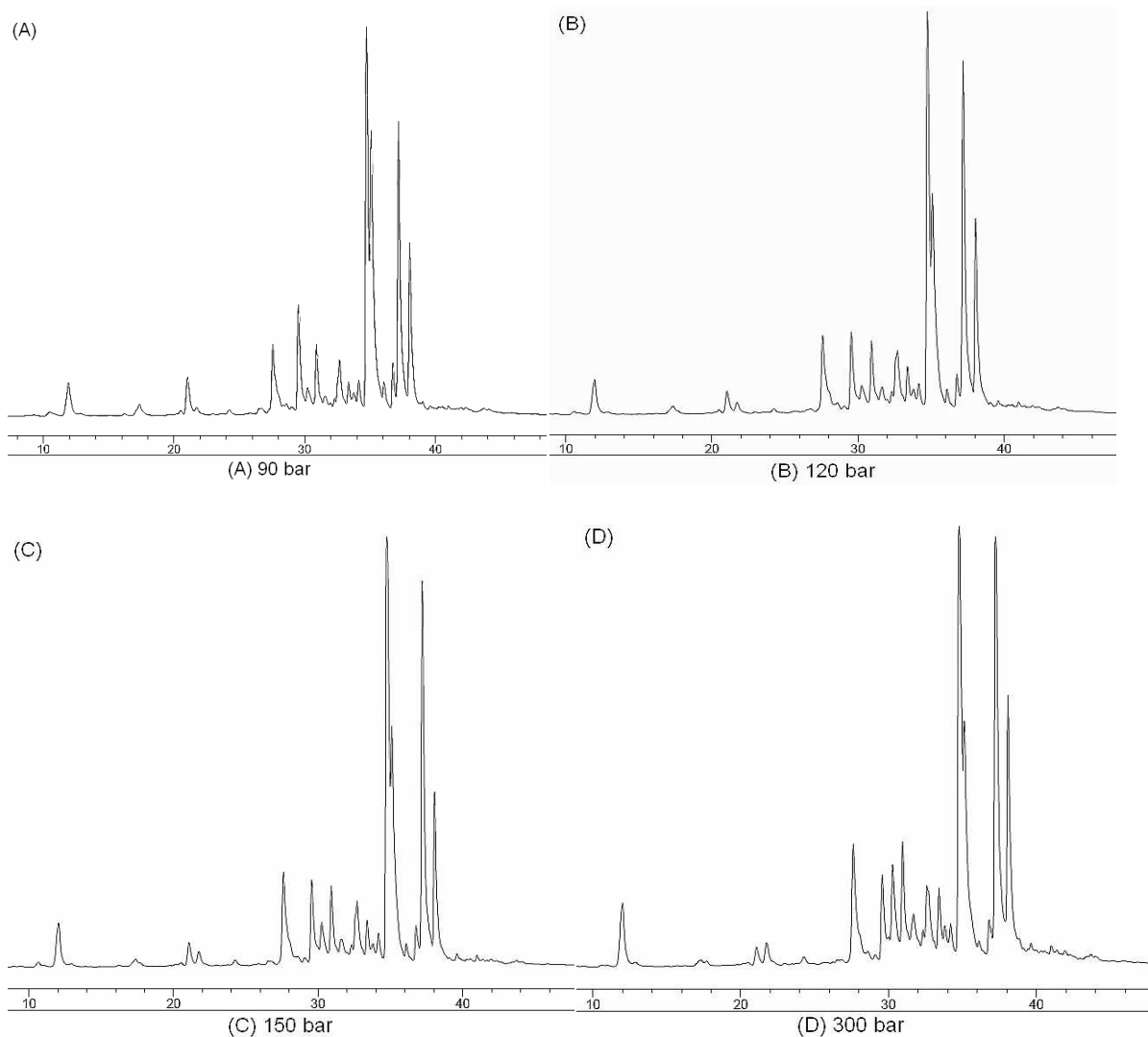


Figura 5.5. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta verde nas condições 90, 120, 150 e 300 bar.

### 5.3.3. Própolis Vermelha

Os resultados das análises cromatográficas dos extratos supercríticos de EEP de própolis vermelha são apresentados na Figura 5.6, onde observa-se a presença de alguns picos majoritários idênticos para os extratos obtidos em diferentes condições de pressão, porém em concentrações diferentes. Na condição 90 bar há presença de um composto em aproximadamente 35 min, o qual apresentou abundância de 23,7% e, nas condições 150 bar e 300 bar, sua abundância é de 5,5% e 2,1%, respectivamente. Através disso, observa-se que modificando parâmetros de processo como a pressão há alteração na composição dos extratos.

Também pode ser observada na Figura 5.6, nas condições de pressão 150 e 300 bar, a presença de um pico duplo majoritário abundante em 43 min, ausente na condição 90 bar. Este pico possui tempo de retenção semelhante ao pico presente nos cromatogramas da amostra enriquecida com benzofenonas (Fasolo *et al.*, 2013), o que infere a presença destes compostos nos extratos supercríticos da própolis vermelha, nas condições de pressões maiores.

Segundo Fasolo e colaboradores, o xantoquimol e a gutiferona E possuem estruturas químicas idênticas por serem isômeros, havendo diferença apenas na posição de uma ligação dupla (Figura 5.7). Esta semelhança impossibilita a separação e identificação destes compostos por CLAE, estando eles presentes em um só pico, como pode ser visto na Figura 5.6. O pico menor, ao lado direito, foi identificado no estudo de Fasolo como a oblongifolina A.

A Figura 5.6 e 5.8 apresentam os cromatogramas dos extratos de própolis vermelha obtidos a partir do EEP e da matéria prima bruta, respectivamente. Através de uma análise destas figuras pode-se observar que a variação na concentração de benzofenonas é diretamente proporcional com a variável pressão, isto é, com o aumento da pressão aumenta a concentração de benzofenonas nos extratos supercríticos.

As benzofenonas já foram relatadas como compostos presentes na própolis vermelha e marrom (Tomas-Barberan *et al.*, 1993; Trusheva *et al.*, 2006). Estas possuem uma gama de atividades biológicas, destacando-se a ação antioxidante e antimicrobiana. São considerados os compostos mais abundantes na própolis vermelha e os responsáveis pela maior atividade antioxidante.

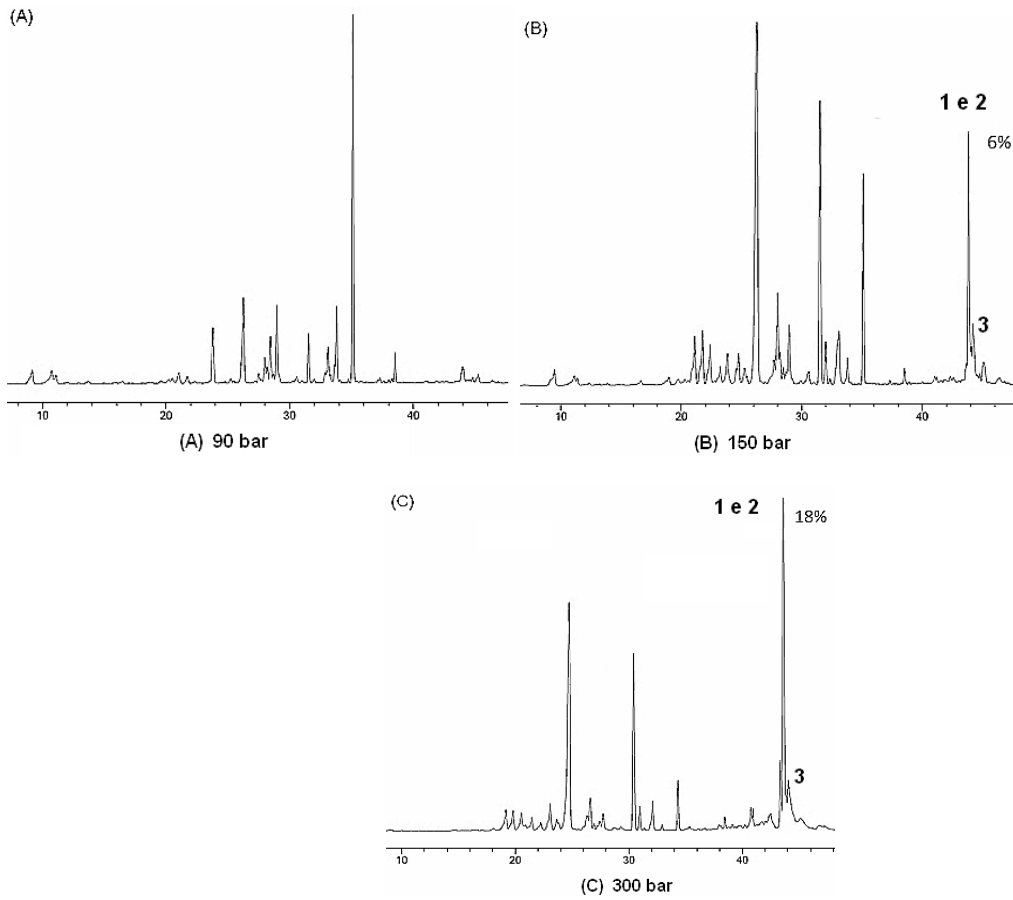


Figura 5.6. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos dos EEP da própolis vermelha. (1,2) xantochimol e gutiferona E; (3): oblongifolina A.

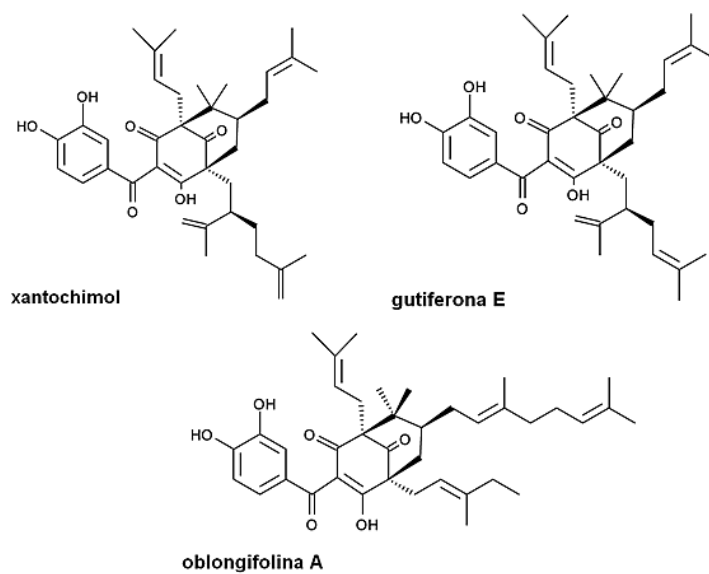


Figura 5.7. Benzofenonas preniladas presentes nos extratos supercríticos dos EEP da própolis vermelha nas condições 150 e 300 bar.

Os cromatogramas dos extratos supercríticos da partir da amostra bruta foram muito semelhantes, assim como os da própolis verde, não havendo diferenças na composição química nas diferentes condições utilizadas. Observa-se também presença das benzofenonas no tempo de retenção de 43-44 min (Figura 5.8).

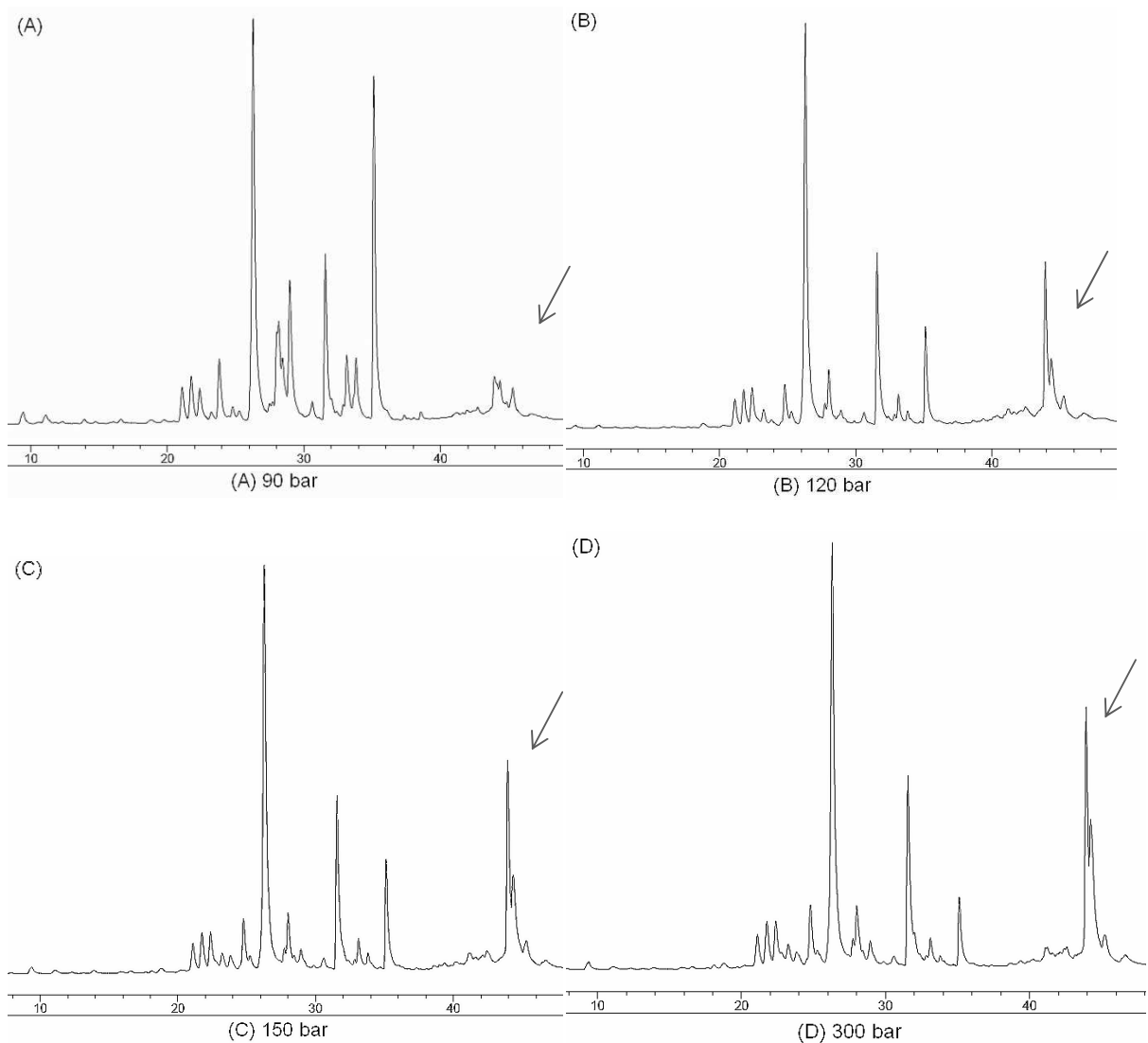


Figura 5.8. Cromatogramas (CLAE) dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta vermelha nas condições 90, 120, 150 e 300 bar.

#### 5.4. Atividade Antioxidante

Os resultados das análises da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir dos EEP de própolis são expressos em  $IC_{50}$ . O  $IC_{50}$  representa a quantidade necessária do extrato da planta para reduzir em 50% a concentração de DPPH. Quanto menor o  $IC_{50}$  menos extrato será necessário para que ocorra esta redução, ou seja, quanto mais baixo os valores de  $IC_{50}$ , maior será a atividade sequestradora de radicais livres e, conseqüentemente, maior a atividade antioxidante.

As frações supercríticas obtidas a partir dos EEP de ambas as própolis apresentaram excelente atividade antioxidante com valores de  $IC_{50}$  inferiores ao da quercetina (0,10 g extrato/g<sub>DPPH</sub>), flavonoide conhecido por sua elevada atividade antioxidante e utilizado como controle positivo neste estudo. A fração supercrítica 90 bar foi a que apresentou maior potencial antioxidante, sendo necessário apenas 0,05g de seu extrato para reduzir em 50% 1,0 g de DDPH. Os resultados obtidos para o  $IC_{50}$ , expressos em gextrato/g<sub>DPPH</sub>, são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.1. Valores de  $IC_{50}$  dos extratos supercríticos de EPP de própolis verde e vermelha obtidos à 40°C

<b>P(bar)</b>	<b>Própolis Verde</b> (gextrato/g <sub>DPPH</sub> )	<b>Própolis Vermelha</b> (gextrato/g <sub>DPPH</sub> )
<b>90</b>	0,05	0,08
<b>150</b>	0,09	0,09
<b>300</b>	0,09	0,10

A ação antioxidante das própolis verde e vermelha está relacionada ao teor de compostos fenólicos presente nas amostras. Trusheva *et al.*, (2006) observaram boas atividades antioxidantes em frações de própolis vermelha contendo as benzofenonas preniladas xantoquimol e gutiferona E (figura 5.7). Estas benzofenonas são consideradas as mais importantes antioxidantes e os compostos mais abundantes na própolis vermelha.

## 5.5. Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada preliminarmente, com objetivo inicial de se observar apenas presença ou não desta ação. Os extratos supercríticos selecionados para esta análise foram os obtidos nas seguintes condições: P = 120 bar, T = 40°C e matéria prima = própolis bruta. Esta seleção foi fruto da condição que em que se obteve a maior massa de extrato.

Devido à semelhança entre as composições químicas dos extratos supercríticos das própolis verde e vermelha obtidos a partir da própolis bruta a 120 bar, 40°C e as composições químicas dos extratos obtidos a partir dos EEP impregnados se definiu não estender os ensaios de atividade antifúngica aos demais extratos. Somado a este fato, a não elucidação completa da composição química dos extratos supercríticos foi outro fator que influenciou nesta decisão, visto que não seria possível identificar um composto ou um grupo de compostos responsáveis pela atividade antifúngica dos mesmos.

O extrato da própolis verde analisado não apresentou atividade contra as cepas testadas do gênero *Candida* e o da própolis vermelha apresentou atividade antifúngica, como pode ser observado na Tabela 5.2. Quando apenas o crescimento do fungo é inibido, mas não há desaparecimento/morte deles, pode-se dizer que a amostra possui uma atividade fungistática. Quando há morte do fungo, possui propriedade fungicida.

Todas as cepas testadas mostraram ser sensíveis aos extratos da própolis vermelha. Dentre espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* testadas, a que demonstrou ser mais sensível foi a *C. glabrata*, destacando-se a cepa RL03, a qual possui uma CIM de 31,2 µg/mL. As espécies mais resistentes foram as cepas de *C. tropicalis*, com valores de CIM variando de 250-500 µg/mL, porém, além de inibição do crescimento destas, houve também atividade fungicida. O extrato da própolis vermelha utilizado também possui atividade fungicida frente a duas cepas de *C. parapsilosis*.

Tabela 5.2. Concentração Inibitória Mínima e Fungicida Mínima dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis vermelha a 120 bar e 40°C.

6. Cepas		7. Extrato Supercrítico	
8.		9. MIC (µg/mL)	10. MFC (µg/mL)
11.	<i>Candida glabrata</i> RL02	12. 62,5	13. #
14.	<i>Candida glabrata</i> RL03	15. 31,25	16. #
17.	<i>Candida glabrata</i> CG03	18. 62,5	19. #
20.	<i>Candida krusei</i> CK02	21. 62,5	22. #
23.	<i>Candida krusei</i> CK03	24. 250,0	25. #
26.	<i>Candida krusei</i> CK04	27. 250,0	28. #
29.	<i>Candida parapsilosis</i> RL01	30. 125,0	31. 250*
32.	<i>Candida parapsilosis</i> RL13	33. 125,0	34. #
35.	<i>Candida parapsilosis</i> CP04	36. 125,0	37. 500*
38.	<i>Candida tropicalis</i> RL16	39. 500,0	40. 500*
41.	<i>Candida tropicalis</i> RL17	42. 250,0	43. 500*
44.	<i>Candida tropicalis</i> CT09	45. 500,0	46. 500*

# Atividade Fungistática = MIC e MFC > 500 µg/mL

\* Ação Fungicida

Para todas as cepas das espécies *C. glabrata* e *C. krusei* e a cepa RL13 da espécie *C. parapsilosis*, o extrato da própolis vermelha possui apenas propriedades fungistáticas.

Observa-se que os resultados apresentados na Tabela 5.2 estão em sintonia com estudos prévios publicados na literatura. Segundo Queiroz (2010), que estudou a atividade de extratos etanólicos de três tipos de própolis contra espécies de *Candida* através da CIM e CFM, as frações da própolis vermelha foram as que apresentaram menores valores de CIM. Todas as cepas apresentaram atividade fungicida e, dentre as estudadas neste trabalho, a *C. tropicalis* apresentou uma CIM de 2.0 µg/mL. Enquanto isso, Fasolo *et al.* (2013) observou atividade de EEP da própolis vermelha frente cepas do gênero *Candida* e concluiu que tal atividade era devido a presença de benzofenonas.

## 47. CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados, pode-se observar que o fracionamento dos extratos etanólicos de própolis verde e vermelha utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico é um método viável para extração de certos compostos presentes na própolis, porém é necessário realizar uma caracterização mais aprofundada dos extratos supercríticos.

A extração a partir de EEP impregnados em papéis filtro apresentou maior rendimento do que a extração a partir da própolis bruta, consequência da remoção prévia de ceras da matéria prima, promovendo assim o aumento da área superficial e aumentando do acesso aos compostos de interesse. Quanto à composição química dos extratos supercríticos é possível concluir que o pré-tratamento da matéria prima, isto é uso da própolis bruta ou dos EEP de própolis, não influi significativamente nos resultados, pois a diferença entre nos cromatogramas não é evidente para os extratos obtidos em diferentes condições e analisados por CLAE.

A partir das análises da atividade antifúngica é possível concluir que o extrato supercrítico da própolis vermelha apresenta atividade frente a diferentes cepas de *Candida*, sendo que possui maior ação contra as cepas de *Candida glabrata*. Tal atividade pode ser justificada pela presença das benzofenonas preniladas gutiferona E, xantoquimol, e oblongifolina A, as quais foram observadas neste estudo que são compostos característicos da própolis vermelha. Por outro lado, concluiu-se que os extratos da própolis verde não apresentaram ação contra as cepas de *Candida* estudadas.

A atividade antioxidante foi verificada em todas as condições de pressão de ambos os tipos de própolis, apresentando baixos valores de IC<sub>50</sub>, demonstrando boa ação contra radicais livres. Esta atividade está relacionada ao teor de



compostos fenólicos presente nos extratos como, por exemplo, o teor de artepelinina C, composto característico da própolis verde e de benzofenonas, presentes na própolis vermelha.

Em relação ao processo extrativo, observou-se que a variável pressão influi diretamente na composição dos extratos supercríticos, isto é, para pressões mais elevadas, no caso da própolis vermelha, ocorre um aumento na concentração de benzofenonas, produtos com atividades biológicas já conhecidas.

## 48. REFERÊNCIAS

ALDEMANN, J. **Propolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2005.

ALMEIDA, R. N. ; Neto, R. G. ; Barros, F. M.C. ;Cassel, E.; von Poser, G. L. ; Vargas, R. M. F. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol+water as co-solvent. **Chemical Engineering and Processing**, v. 70, p. 95-102, 2013.

BANKOVA, V. S.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; Boudourova-Krasteva, G.; Popov, S.; Sforcin, J. M.; Funari, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, n.4, p. 361-367, 1998.

BARTH, O. M.; Dutra, V. M. L.; Justo, R. L. Pollen analysis of some samples of propolis from southern Brazil. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p. 663-667, 1999.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da "própolis verde" produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 f. Tese (Pós-Graduação em Entomologia)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2001.

BECK-SAGUE, C. M.; Jarvis W. R.; National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. T. **Journal of Infectious Diseases**, v.167, n.5, p.1247-1251, 1993.

BEDASCARRASBURE, E.; Maldonado, L.; Alvarez, A.; Rodríguez, E. Contenido de Fenoles y Flavonoides Del Propoleos Argentino. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n.3, p. 369-72, 2004.

BERROUANE, Y. F.; Herwaldt L. A.; Pfaller, A. M. Trends in antifungal ude and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.3, p. 531-537, 1999.

BIANCHINI, L.; Bedendo, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, n.1, p. 149-152, 1998.

BOGDANOV, S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. **Bee Product Science**, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net), 2012.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1-3, p. 29-38, 1996.

BOSIO, K.; Avanzini, C.; D'avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 174-177, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; Cuvelier, M. E.; Bernet, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. Springer, Darmstadt, Steinkopff, New York ,1994.

BÚFALO, M. C.; Candeias, J. M.; Sforcin J.M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.4, p.483-487, 2009.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and hemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

CABRAL, I. S. R; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-27, 2009.

CALADO, J. C. P., Santos, L. C ., Cabral, F. A., Marcucci, M. C., 2008. Atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de própolis obtidos através da extração Por fluido supercrítico. **I jornada de iniciação científica e tecnológica UNIBAN**. Brasil.

CAO, G. H.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n.5 , p. 749-760, 1997.

CARRILHO, E.; Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica.I. Cromatografia com fluido supercrítico: Conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v.24, n. 4, p.509-515, 2001.

CASSEL, E. **Equilíbrio de Fases a Altas Pressões de Sistemas Contendo Hidrocarbonetos e Dióxido de Carbono**. Tese de Doutorado, Programa de Engenharia Química, COPPE/UFRJ, 1998.

CASSEL, E.; Vargas, R. M .F; Martinez, N.; Lorenzo, D.; Dellacasa, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n.1, p. 171-176, 2009.

CASSEL, E.; Bedinot, C.; Vargas, Rubem Mário Figueiró . **Unidade Piloto de Extração Supercrítica**. 2011, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PROV020110081175. Data de depósito: 03/08/2011, título: "Unidade Piloto de Extração Supercrítica" . Instituição financiadora PUCRS.

CATCHPOLE, O. J.; Grey, J. B.; Mitchell, K. A.; Lan, J. S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **Journal of Supercritical Fluids**, v.29, n.1-2, p.97-106, 2004.

CHANG, R.; Piló-Veloso, D.; Morais, A. L.; Nascimento, E.A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and CG-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.18, n. 4, p.549-556. 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; Montenegro, R.C.; Alves, A.P.N.N., Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

COLOMBO, A. L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n. 5, p. 599-607, 2003.

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, n.4, p. 435-441, 2006.

DÍAZ-CARBALLO, D.; Malak, S.; Bardenheuer, W.; Freistuehler, M.; Peter Reusch, H. The contribution of plukenetione A to the antitumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.12, p. 9635-9643, 2008.

DRAGO, L.; De Vecchi, E.; Nicola, L.; Gismondo, M. R. In vitro activity of a novel própolis formulation (Actichelated própolis). **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.5, p.1914-1921, 2007.

FALCÃO, M. **Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim limão e suas frações para produtos de higiene corporal**. 2012. 62 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

FALCÃO, M.; Fianco, A.L.B.; Lucas, A. M.; Pereira, M. A. A.; Torres, F. C.; Vargas, R. M. F.; Cassel, E. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. **Phytochemistry Review**, v.11, n.4, p. 405-412, 2012.

FASOLO, D.; Pippi, B.; Fuentefria, A.M.; von Poser, G.L.; Teixeira H.F. Investigation of antifungal potential of native Brazilian, red and green propolis - a comparative study. 5th Meeting of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program. **Mercosur Meeting on Pharmaceutical Sciences**. Porto Alegre, RS. Novembro, 2013.

FIANCO, A.L.B.; Falcão, M.; Cassel, E.; Milão, D. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). **Revista Liberato**, v. 14, n. 21, p. 1-112, jan./jun. 2013.

GERALD D.; May P. Herb and spice carbon dioxide extracts-versatile, safe ingredients for premium food and health food. **Food Technology**, v.8, p. 1–5, 2002.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p.50-84, 1979.

GONSALES, G. Z.; Orsi, R. O.; Fernandes Júnior, A.; Funari, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GONZÁLEZ, M.; Guzmán, B.; Rudyk, R.; Romano, E.; Molina, M. A. A. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.22, n.3, p. 243-8, 2003.

GRASELA, D. M.; Olsen, S. J.; Mummaneni, V. *Ravuconazole: Multiple ascending oral dose study in healthy subjects*. In Program and Abstracts of the Fortieth

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, Canada, 2000. Abstract 839, p. 22. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, USA.

HALLIWELL, B.; Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition; Oxford University Press; p. 268 – 340, 2007.

HATA T, Tazawa S, Ohta S, Rhyu M-R, Misaka T, et al. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **PLOS ONE**, v.7, n. 11, 2012.

HULEIHEL, M.; Isanu, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Israel Medical Association Journal**. v. 4, n.11, p. 923-927, 2002.

KALOGEROPOULOS, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinou, I.; Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and anti-microbial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 452-461, 2009.

KANTARCIOGLU, A. S.; Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses**, v.45, n.5-6, p.160-165, 2002.

KAUFFMAN, C. A.; Fisher, J. F.; Sobel, J.D.; Newman, C. A. *Candida* Urinary Tract Infections: Diagnosis. **Oxford Journals**, v. 52, n. 6, p. 452-456. 2011.

KHAN, Z. K.; Gyanchandani, A. **Candidiasis: a review**. PINSA, v .64, n.1, p.1-34, 1998.

KOÇ, A. N.; Silici, S.; Kasap, F.; Hormet-oz, H. T.; Mavus-Buldu, H.; Ercal, B. D. Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.1-2, p.128-134, 2011.

KUJUMGIEV, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V. S.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n.3, p. 329-339, 2004.

LALWANI S.; Punia P.; Mathur P.; Trikha V.; Satyarthee G.; Misra M. C. Hospital acquired infections: preventable cause of mortality in spinal cord injury patients. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 6, n.1, p.36-9, 2014.

LI, F.; Wu, L.; Cao, B.; Zhang, Y.; Li, X.; Liu, Y. Surveillance of the prevalence, antibiotic susceptibility, and genotypic characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011. **BMC Infections Diseases**,v.13, p.353-361. 2013.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n.2, p. 83–99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C.; Bankova, V. S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**,v.2, p.115-123, 1999.

MARCUCCI, M. C.; Ferreres, F.; Custódio, A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 55, n.1-2, p. 76-81, 2000.



MARCUCCI, M. C.; Woisky, R. G.; Salatino, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, p. 3-9, 1998.

MATHUR, P.; Varghese, P.; Tak, V.; Gunjiyal, J.; Lalwani, S.; Kumar, S.; Misra, M. C. Epidemiology of blood stream infections at a level-1 trauma care center of India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 6, n.1, p. 22-27, 2014.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p.42-46, 1999.

MOREIRA, L.; Dias, L. G.; Pereira, J. A.; Estevinho, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.11, p. 3482-3485, 2008.

MORGAN, J.; Meltzer, M. I.; Plikaytis, B. D.; Sofair, A. N.; Huie-White, S.; Wilcox, S.; Harrison, L. H.; Scaberg, E. C.; Hajjeh, R. A.; Teutsch, S. M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infect Control and Hospital Epidemiology**, v.26, n.6, p.540-7, 2005.

MUKHERJEE A. K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, n.12, p. 1467-86, 2001.

NAGAI, T.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n.1, p. 29-33, 2003.

NEWMAN, D. J.; Cragg, G. M.; Holbeck, S.; Sausville, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, New York, v. 2, n.4, p. 279-308, 2002.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2007.

OSAWA, K.; Shigemura , K.; Yoshida, H.; Fujisawa, M.; Arakawa, S. 7.1. Candida urinary tract infection and Candida species susceptibilities to antifungal agents. **The Journal of Antibiotics**, v.66, p. 651–654, 2013.

OTA, C.; Unterkircher, C.; Fantinato, V.; Shimizu, M. T. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 375-378, 2011.

PAPPAS, P.G.; Rex, J. H.; Lee, J. A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.5, p. 634-643, 2003.

PARK, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; Ikegaki, M. Evaluation of ethanolic extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. **Korean Journal of Apiculture**, v.13, n.1, p.27-34, 1998.

PARK, Y. K.; Ikegaki, M.; Alencar, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.9, p.2-7, 2000.

PAVIANI, L. C.; Dariva, C.; Marcucci, M.C.; Cabral, F. A. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from dry ethanolic extract of propolis. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p.15-27, 2010.

PAVIANI, L. C.; Saito, E.,; Sanchez-Camargo, A.P.; Cabral, F.A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.2, p.243-251, 2012.

PEREIRA, M. A. A. Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

PICCINELLI, A. L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L., Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.59, v.12, p. 6484-6491, 2011.

PFALLER, M. A. Infection control: oportunist fungal infections- the increasing importance of *Candida* species. **Infect Control and Hospital Epidemiology**, v.10, n.6, p. 270-3, 1989.

PFALLER, M. A.; Diekema D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004.

PFALLER, M. A.; Zhang, J.; Messer, S. A.; Brandt, M. E.; Hajjeh, R. A.; Jessup, C. J.; Tumberland, M.; Mbidde, E. K.; Ghannoum, M. A. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.1, p.169-71, 1999.

QUEIROZ, V.C.P.P. **Avaliação do potencial antifúngico de própolis de *Apis mellifera* contra leveduras do gênero *Candida***. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo.

QUINTER-MORA, M. L.; Londoño-Orozco, A.; Hernández-Hernández, F.; Manzano-Gayosso, P.; López-Martínez R.; Soto-Zárate, C. I.; Carrillo-Miranda, L.; Penieres-Carrillo, G.; García-Tovar, C. G.; Cruz-Sánchez, T. A. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n.1, p. 22-6, 2008.

RAMOS, A. F. N.; Miranda, J. L. Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.

REX, J. H.; Sobel, J. D.; Powdery, W. *Candida* species. **Infectious Diseases & Antimicrobial Agents**. Disponível em: <http://www.antimicrobe.org/f14.asp>.1998.

RICE-EVANS, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

RICHARDSON, M.; Lass-Flörl, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.5, p.24, 2008.

RUFINO, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Péres-Giménez, J.; Saura-Calixto, F- Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. 4f. **Comunicado técnico** , Embrapa, Fortaleza, CE, 2007.

SAWAYA, A. C. H. F; Souza, K. S.; Marcucci, M. C., Cunha, I. B. S.; Shimizu, M. T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.

SCOPEL, R. S. **Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica**. 2013. 85 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

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

SIMÕES, C. C.; Araujo, D. B.; Araujo, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microorganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 84-89, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A., Petrovick, P. R. **Farmacognosia da Planta e do Medicamento**. 5<sup>o</sup> edição. Revista ampliada. Poto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SPELLBERG, B. J.; Filler, S.G.; Edwards, J. E. Current Treatment Strategies for Disseminated Candidiasis. **Clinical Practice**, v.42, n.2, p.244-51, 2006.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; Schilcher, H. Electron-microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance. **Planta Médica**, v.60, n.3, p. 222-227, 1994.

TAYLOR, P. W.; Stapleton, P. D.; Luzio, J. P. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**. v.7, n.21, p.1086–91, 2002.

TOMAS - BARBERAN, F.A.; Garcia-Viguera, C.; Vit-olivier, P.; Ferreres, F.; tomas-lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, p. 191–196, 1993.

TRICK, W. E.; Fridkin, S. K.; Edwards, J. R.; Gaynes, R. P. Secular trends of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v.1, n.35, p.627-30, 2002.

TRUSHEVA, B.; Popova, M.; Naydenski, H.; Tsvetkova, I.; Rodriguez, J. G.; Bankova, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, n. 75, p.683-689, 2004.

TRUSHEVA, B.; Popova, M., Bankova V.; Simona, S.; Marcucci, M.C.; Miorin, P.L.; Pasin, F.R.; Tsvetkova, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.2, p. 249-254, 2006.

UMTHONG, S.; Puthong, S.; Chan-Chao, C. Trigona laeviceps Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 37, n. 5, p. 855-865, 2009.

UZEL, A.; Sorkun, K.; Önçağ, O.; Çoğulu, D.; Gençay, O.; Salih, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.189-195, 2005.

VALGAS, C.; Souza, S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia J. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p. 369-380, 2007.

VALGAS, C. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2002.

VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E. ; GOMES, G. M.; LONGHI, L. G. S. ; SERAFINI, L. A. ; SANTOS, A. C. A. Carqueja Essential Oil Supercritical Extraction: Experiments and Modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** . v. 23, n.03, p. 375-382, 2006

VARGAS, R. M. F. ; Barroso, M., S. T.; Neto, R. G.; Scopel, R ; Falcão, M. A ; Silva, C. F.; Cassel, E. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid

extraction from *Achyrocline satureioides* D.C. using CO<sub>2</sub>. **Industrial Crops and Products**. v. 50, p. 430-435, 2013.

