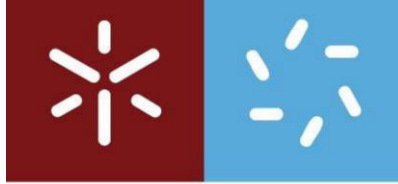


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marta Sofia Fernandes Peixoto

**Avaliação e Caracterização das Propriedades
Antimicrobiana e Antioxidante de Misturas de
Própolis Portugêses**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marta Sofia Fernandes Peixoto

**Avaliação e Caracterização das
Propriedades Antimicrobiana e
Antioxidante de Misturas de Própolis
Português**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de:

**Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida
Aguiar**

Professor Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

Fevereiro de 2018

Declaração

Nome: Marta Sofia Fernandes Peixoto

Endereço eletrónico: martitapeixoto@hotmail.com

Telefone: 915494082

Número do cartão do cidadão: 14585877

Título da tese de Mestrado:

Avaliação e Caracterização das Propriedades Antimicrobiana e Antioxidante de Misturas de Própolis Português

Orientadores:

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Professor Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

Instituição de acolhimento: Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB)

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado em Genética Molecular

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

*Dedicado ao meu padrinho, José Peixoto,
que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos e
sempre me apoiou em todos os momentos, mas infelizmente
partiu deste mundo antes de ver concluída mais esta etapa.*

Agradecimentos

A realização deste trabalho só se tornou possível com o apoio e incentivo de vários intervenientes aos quais manifesto o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço aos professores e orientadores, Cristina Aguiar e Rui Oliveira, por todos os conhecimentos transmitidos, apoio incondicional, disponibilidade, incentivo e atenção dispensada.

Agradeço à professora Ana Cunha pela cooperação na análise dos resultados e instigar um maior espírito crítico.

Reconheço a interajuda e companheirismo de todos os colegas de laboratório, em especial à Carina Araújo, por todo o apoio e amizade. Agradeço também ao Hugo Olival pela ajuda e alegria que proporcionou ao longo deste trabalho.

A todos os técnicos e auxiliares do Departamento de Biologia da Universidade do Minho pela disponibilidade e auxílio.

Agradeço a todos os meus amigos pelos momentos de diversão, apoio e de incentivo que proporcionaram ao longo deste percurso.

Por último, mas não menos importante, agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais, por me apoiarem, compreenderem e incentivarem a alcançar os meus sonhos.

Avaliação e Caracterização das Propriedades Antimicrobiana e Antioxidante de Misturas de Própolis Português

Resumo

Própolis é um produto de consistência viscosa e de cor normalmente escura, com um odor característico que varia entre as amostras. Consiste numa mistura complexa de material resinoso e balsâmico recolhido pelas abelhas (principalmente por *Apis mellifera* L.) a partir de diversas fontes vegetais que é depois processado por enzimas salivares e misturado com outras substâncias como cera de abelha. O própolis protege a colmeia devido às suas propriedades mecânicas, mas também devido à sua atividade biológica. Utilizado na medicina tradicional desde a antiguidade, o própolis possui um grande número de atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e citotóxica que lhe conferem uma vasta gama de aplicações. Todo este potencial bioativo reside numa composição química muito variável e complexa, principalmente devida à grande diversidade de fontes vegetais, mas também a outros fatores como as características geográficas e climáticas assim como a variabilidade genética das abelhas rainha.

Tendo em conta que o própolis é produzido em pequenas quantidades e que, a nível nacional, é ainda frequentemente considerado como um subproduto, pretendeu-se com este trabalho procurar soluções que possam contribuir para valorizar o própolis nacional e contornar as limitações da sua escassez. Nesse sentido, optou-se por elaborar misturas à base de própolis proveniente de origens diferentes (de um apiário no Gerês e de um apiário na Beira Alta) e/ou de alturas de recolha diferentes. Foram então preparadas 19 misturas a partir de extratos etanólicos de própolis com origem num ou nos dois apiários e recolhidos em anos diferentes. Estas misturas foram caracterizadas quimicamente quanto ao teor de polifenóis totais e ao teor de flavonóides totais, avaliadas quanto ao potencial antioxidante pela atividade de captura de radicais livres de DPPH, e testadas para a atividade antimicrobiana, pelo método da diluição em agar.

A comparação dos resultados obtidos nestes parâmetros, para as misturas de extratos etanólicos de própolis com os resultados anteriormente registados para os extratos etanólicos de amostras de própolis individuais, demonstram o elevado potencial das misturas para uso em diversas aplicações. De facto, a caracterização química mostra que a atividade antioxidante em muitas das misturas é superior, sugerindo ocorrência de sinergismo entre compostos. Na atividade antibacteriana, assim como na atividade antifúngica, observam-se por vezes valores de MIC inferiores aos exibidos pelos extratos etanólicos individuais, contra várias das estirpes testadas, ou a manutenção dos valores de MIC da amostra de própolis mais ativa.

Palavras-chave: misturas de própolis, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Evaluation and Characterization of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Portuguese Propolis Mixtures

Abstract

Propolis is a product of viscous consistency and of normally dark color, with a characteristic odor that varies between the samples. It consists of a complex mixture of resinous and balsamic material collected by bees (mainly *Apis mellifera* L.) from various plant sources which is then processed by salivary enzymes and mixed with other substances such as beeswax. Propolis protects the hive due to its mechanical properties, but also because of its biological activity. Used in traditional medicine since antiquity, propolis has many biological activities as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor and cytotoxic that give it a wide range of applications. All this bioactive potential lies in a very variable and complex chemical composition, mainly due to the great diversity of plant sources, but also to other factors such as geographic and climatic characteristics as well as the genetic variability of queen bees.

Considering that propolis is produced in small quantities and that at national level it is still often considered as a by-product, it was intended with this work to look for solutions that could contribute to the valorization of the national propolis and to overcome the limitations of its scarcity. In this sense, it was decided to prepare mixtures based on propolis from different origins (from an apiary in Gerês and from an apiary in Beira Alta) and/or from different harvesting times. Nineteen mixtures were prepared with ethanol extracts of propolis from one or two apiaries and collected in different years. These mixtures were chemically characterized in terms of total polyphenol and total flavonoid contents, evaluated for antioxidant potential by DPPH free radical scavenging activity and tested for antimicrobial activity by the agar dilution method.

The comparison of the results obtained in these parameters for the blends of propolis ethanol extracts with the results previously recorded for the ethanol extracts of individual propolis samples demonstrate the high potential of the blends for use in several applications. In fact, the chemical characterization shows that the antioxidant activity in many of the mixtures is higher, suggesting synergism between compounds. In what concerns antibacterial activity, as well as antifungal activity, MIC values are sometimes lower than those exhibited by the individual ethanol extracts against several of the strains tested, or the maintenance of the MIC values of the most active propolis sample.

Keywords: propolis mixtures, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo	V
Abstract	VII
Lista de acrónimos e siglas.....	XIII
Índice de figuras.....	XV
Índice de tabelas	XVI
1. Introdução.....	1
1.1. História e características do própolis.....	3
1.2. Origem botânica e tipos de própolis	7
1.3. Composição química do própolis	11
1.3.1. Normalização da composição química do própolis.....	12
1.4. Atividades biológicas do própolis.....	15
1.4.1. Atividade antioxidante	15
1.4.2. Atividade antimicrobiana	17
1.4.3. Atividade anti-inflamatória	19
1.4.4. Atividade antitumoral e citotóxica	20
1.5. Efeito tóxico e alergénico	23
1.6. Objetivos	25
2. Material e Métodos	27
2.1. Amostras de própolis.....	29
2.1.1. Extração etanólica do própolis.....	29
2.1.2. Preparação de misturas de extratos etanólicos de própolis	30
2.2. Determinação do teor de polifenóis totais.....	33
2.3. Determinação do teor de flavonóides	34
2.4. Atividade de captura de radicais livres DPPH	34

2.5.	Avaliação do potencial antimicrobiano das misturas de própolis	35
2.5.1.	Microorganismos e condições de cultura.....	36
2.5.2.	Avaliação do potencial antimicrobiano.....	37
2.6.	Análise estatística.....	37
3.	Resultados e Discussão	39
3.1.	Preparação de misturas de extratos etanólicos.....	41
3.2.	Misturas com extratos etanólicos de própolis com a mesma origem.....	45
3.2.1.	Caracterização química.....	45
3.2.2.	Avaliação da atividade antioxidante	53
3.2.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana	56
3.3.	Misturas com extratos etanólicos de própolis de origens diferentes.....	61
3.3.1.	Caracterização química.....	61
3.3.2.	Avaliação da atividade antioxidante	63
3.3.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana	63
4.	Conclusão e Perspetivas futuras	42
5.	Referências	69
6.	Anexos	87
	Anexo I - Compilação da informação relativa à caracterização química e biológica os extratos etanólicos de própolis do Pereiro usados no presente trabalho	89
	Anexo II – Compilação da informação relativa à caracterização química e biológica dos extratos etanólicos de própolis do Gerês usados no presente trabalho	91
7.	Apêndices	93
	Apêndice A – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Pereiro.	95
	Apêndice B – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Gerês.	100

Apêndice C – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Pereiro e do Gerês.....	105
--	-----

Lista de acrónimos e siglas

AVC – Acidente vascular cerebral

CAPE – Éster fenil-etílico do ácido cafeico (do inglês *Caffeic Acid Phenethyl Ester*)

COX – Cicloxigenase

D.O.₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm

DL50 – Dose letal mediana

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (do inglês 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

EAG – Equivalente de ácido gálico

EE – Extrato etanólico

EQ – Equivalente de quercetina

G.EE – Extrato etanólico de própolis do Gerês

GC-MS – Cromatografia gasosa-espectrofotometria de massa (do inglês *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

HCT 116 – Linha tumoral de cancro colorretal

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IC₅₀ – Metade da concentração máxima inibitória (do inglês *Half Maximal Inhibitory Concentration*)

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LBA – Meio de cultura Luria-Bertani com agar

LC-MS – Cromatografia líquida-espectrofotometria de massa (do inglês *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

LOX – Lipoxigenase

Me45 – Melanoma maligno humano

MIC – Concentração mínima inibitória (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

NF-κB – Fator nuclear Kappa B

P.EE – Extrato etanólico de própolis do Pereiro

PI3K/AKT – Via de sinalização

ppm – Partes por milhão

RNS – Espécies reativas de azoto (do inglês *Reactive Nitrogen Species*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

rpm – Rotações por minuto

TLR3 e TLR4 – Recetores do tipo Toll 3 e 4 (do inglês *Toll-like receptor 3, 4*)

UMF – Do inglês *Unique Manuka Factor*

YPD – Meio de cultura *Yeast Peptone Dextrose*

YPDA – Meio de cultura *Yeast Peptone Dextrose* com agar

Índice de figuras

Figura 1: Teor de polifenóis totais das nove misturas de P.EEs expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	46
Figura 2: Teor de flavonóides das misturas dos P.EEs, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	48
Figura 3: Teor de polifenóis totais das oito misturas de G.EEs, expressos em mg de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).	50
Figura 4: Teor de flavonóides, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato), das misturas com G.EEs (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	52
Figura 5: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas de P.EEs. O potencial antioxidante é apresentado em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	53
Figura 6: Potencial antioxidante das misturas com extratos etanólicos de própolis do Gerês. A capacidade de captura de radicais de DPPH foi expressa em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).	55
Figura 7: Caracterização química das duas misturas com extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês: determinação do teor de polifenóis totais (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	61
Figura 8: Caracterização química das duas misturas com extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês: determinação do teor de flavonóides totais (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).....	62

Índice de tabelas

Tabela 1: Tipos de própolis e seus componentes químicos característicos (adaptado de Silva-Carvalho <i>et al.</i> (2015), Bankova <i>et al.</i> (2016b) e Graikou <i>et al.</i> (2016)).....	8
Tabela 2: Extratos etanólicos de própolis do Gerês e do Pereiro usados neste trabalho e preparados por diferentes investigadores a partir de amostras de própolis recolhidas entre 2011 a 2015.....	30
Tabela 3: Constituição das misturas de P.EEs com base nos critérios indicados na primeira coluna e tendo em conta a classificação de cada P.EE relativamente às atividades antioxidante, antifúngica e antibacteriana (Anexo I, Tabelas I.1, I.2, I.3, I.4 e I.5).....	31
Tabela 4: Constituição das misturas G.EEs com base nos critérios indicados na primeira coluna e tendo em conta a classificação de cada G.EE relativamente à atividade antioxidante e antimicrobiana (Anexo II, Tabelas II.1, II.2, II.3, II.4 e II.5).....	32
Tabela 5: Misturas de extratos etanólicos de própolis provenientes de localidades distintas, Pereiro e Gerês, tendo em consideração a atividade antioxidante.	32
Tabela 6: Painel de microrganismos utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana.	36
Tabela 7: Misturas preparadas com os P.EEs de diferentes anos tendo por base os extratos mais e menos ativos, assim como os de atividade intermédia, e obedecendo aos critérios previamente definidos para a formação das misturas ((ver ponto 2.1.2 Material e Métodos).	42
Tabela 8: Misturas preparadas com os G.EEs de diferentes anos tendo por base os extratos mais e menos ativos, assim como os de atividade intermédia, e obedecendo aos critérios previamente definidos para a formação das misturas (ver ponto 2.1.2 Material e Métodos).	43
Tabela 9: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), de três das misturas de P.EEs. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura (Moreira, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).).....	47
Tabela 10: Teores de flavonóides de três das misturas com P.EEs, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura (Moreira, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).).....	49
Tabela 11: Teores de polifenóis totais, de algumas das misturas com G.EEs, em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada G.EE constituinte da mistura (Gonçalves, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).).....	51

Tabela 12: Teores de flavonóides, em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, de algumas misturas com extratos do própolis do Gerês. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada G.EE constituinte da mistura (Gonçalves, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).).....	52
Tabela 13 Atividade antibacteriana, expressa em valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$), das misturas com P.EEs. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada P.EE constituinte da mistura (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017).)	57
Tabela 14: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de P.EEs, expressa em termos de valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada P.EE constituinte da mistura (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017).)	58
Tabela 15: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) das misturas com G.EEs contra diversas bactérias. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada G.EE constituinte da mistura (Freitas, 2015; Gonçalves, 2017).)	59
Tabela I.1: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos individuais utilizados neste trabalho (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão).	89
Tabela I.2: Teores de flavonóides dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro, dos anos de 2011 a 2015, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão).	89
Tabela I.3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH, apresentado em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão)......	90
Tabela I.4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) dos extratos de própolis do Pereiro contra bactérias.....	90
Tabela I.5: Atividade antifúngica, expressa em valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro.....	90
Tabela II.1: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos individuais utilizados neste trabalho (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão).	91
Tabela II.2: Teores de flavonóides dos extratos etanólicos de própolis do Gerês, dos anos de 2011 a 2015, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão)......	91

Tabela II.3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH, apresentado em valores de IC ₅₀ (µg/ ml), dos extratos etanólicos de própolis do Gerês (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).....	92
Tabela II.4: Valores de MIC (µg/ ml) dos extratos de própolis do Gerês contra bactérias.....	92
Tabela II.5: Atividade antifúngica, expressa em valores de MIC (µg/ ml), dos extratos etanólicos de própolis do Gerês.....	92
Tabela A1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Pereiro recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.1.....	95
Tabela A2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Pereiro recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.2.....	96
Tabela A3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Pereiro. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC ₅₀ (µg/ ml), sendo estes exibidos na forma média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.3.	97
Tabela A4: Valores de MIC (µg/ ml) das misturas de própolis da região do Pereiro contra bactérias <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina e <i>Escherichia coli</i> . Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.4.	98
Tabela A5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Pereiro contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida albicans</i> . A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC (µg/ ml). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.5.	99
Tabela B1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas	

independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.1.....	100
Tabela B2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.2.....	101
Tabela B3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Gerês. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC ₅₀ (µg/ ml), sendo estes exibidos na forma média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.3.	102
Tabela B4: Valores de MIC (µg/ ml) das misturas de própolis da região do Gerês contra bactérias <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina e <i>Escherichia coli</i> . Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.4.	103
Tabela B5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Gerês contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida albicans</i> . A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC (µg/ ml). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.5.	104
Tabela C1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Pereiro e do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.1 e II.1, respetivamente.	105
Tabela C2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Pereiro e do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.2 e II.2, respetivamente.....	105
Tabela C3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Pereiro e do Gerês. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC ₅₀ (µg/ ml), sendo estes	

exibidos na forma média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.3 e II.3, respectivamente..... 106

Tabela C4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) das misturas de própolis da região do Pereiro e do Gerês contra bactérias *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Escherichia coli*. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.4 e II.4, respectivamente. 106

Tabela C5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.5 e II.5, respectivamente. 107

1. Introdução

1.1. História e características do própolis

Na natureza encontramos uma grande diversidade de produtos naturais já utilizados pelos animais e com grande potencial para várias utilizações pelo homem, como na medicina (Silva-Carvalho *et al.*, 2014, 2015). Como exemplo podemos mencionar os diversos produtos produzidos pelas abelhas. As abelhas, que estão dispersas pelo mundo desde há 42 milhões de anos, têm um grande sucesso devido à sua excelente organização social, mas também devido às extraordinárias propriedades dos seus produtos, que estão diretamente relacionados com as propriedades da flora circundante (Bankova *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2017). Todos os produtos da colmeia têm revelado benefícios para a saúde, sendo os do mel os mais reconhecidos; no entanto, os restantes, como o própolis, a geleia real, o pólen, a cera e o veneno da abelha, têm atraído cada vez mais a atenção dos investigadores (Siheri *et al.*, 2017).

Própolis, ou “cola das abelhas” como também é designado, é um produto de consistência pegajosa e de cor normalmente escura, embora variável entre castanho, amarelo, verde e vermelho e, com um odor característico que pode diferir entre diferentes amostras. Consiste numa mistura complexa de material resinoso e balsâmico recolhido pelas abelhas (principalmente por *Apis mellifera* L.) a partir de diversas fontes vegetais, sendo posteriormente processado (Pereira *et al.*, 2002; Bankova, 2005; Lustosa *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2011b).

As abelhas utilizam as resinas provenientes de lesões nas plantas para fins idênticos às funções que essas resinas desempenham nas plantas, pois esta resina é produzida de forma a diminuir a perda de seiva e evitar a infeção da ferida, ou seja, para proteção. As abelhas recolhem o material lipofílico de falhas nas cascas das árvores, folhas, ramos e rebentos (Casaca, 2010; Bankova *et al.*, 2016b), adicionam-lhe enzimas salivares e provavelmente outras substâncias do metabolismo, que promovem a hidrólise de alguns dos compostos, e ainda cera de abelha e outros materiais (Fokt *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011b; Falcão *et al.*, 2014). As abelhas obreiras com mais de 15 dias e com as glândulas produtoras de cera atrofiadas recolhem as resinas com as mandíbulas e as patas e transportam esta secreção pegajosa nas suas patas traseiras. Ao chegar à colmeia, outras abelhas retiram-lhe as resinas - um processo demorado devido à sua viscosidade - processando-as e adicionando-lhes cera. A recolha de resinas para a produção de própolis concentra-se no verão e estende-se até ao início do outono na maioria dos países da Europa e

zonas temperadas (Ghisalberti, 1979; Casaca, 2010; Moreira *et al.*, 2011b; Borba *et al.*, 2017; Simone-Finstrom *et al.*, 2017).

A palavra própolis tem origem grega, proveniente de “*pro*”, em defesa de, e “*polis*”, cidade, aludindo ao envolvimento deste produto na defesa da colmeia. O própolis protege a colmeia devido às suas propriedades mecânicas, mas também devido à sua atividade biológica. É depositado sob a forma de um fino revestimento interno nas células do favo e é também utilizado para cobrir pequenas fissuras, contribuindo assim para o fortalecimento da colmeia e para manter a humidade e temperatura. As abelhas também usam o própolis na entrada da colmeia de forma a impedir a aproximação de outros organismos estranhos e para uma maior resistência às intempéries. Para além destas funções mecânicas, o própolis também desempenha funções biológicas, sendo usado para embalsamar organismos invasores que as abelhas não conseguiram transportar para o exterior, impedindo assim a sua putrefação e propagação de infeções e doenças. O própolis é ainda utilizado nas células de criação onde são colocados os ovos, sendo a sua presença na colmeia responsável pela existência de um ambiente mais asséptico (Ghisalberti, 1979; Salatino *et al.*, 2005; Casaca, 2010; Borba *et al.*, 2017).

A ação antimicrobiana do própolis é uma das suas principais características e tem sido reconhecida desde a antiguidade (Bankova *et al.*, 2000). O própolis tem sido utilizado como fármaco e como conservante de alimentos desde os tempos antigos, encontrando-se as primeiras referências da sua utilização na civilização Egípcia em 300 a.C. (Ghisalberti, 1979). Os egípcios beneficiaram das propriedades de preservação do própolis para embalsamar os mortos. Mais tarde, este produto tornou-se muito popular para os Gregos, sendo referenciado por Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno como benéfico para a saúde, essencialmente como antisséptico e cicatrizante. Os Persas descreveram o própolis como um produto capaz de atuar contra eczemas, mialgia e reumatismo, e os Incas empregavam-no como agente antipirético e no tratamento de doenças infecciosas (Lustosa *et al.*, 2008; Fokt *et al.*, 2010; Toreti *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). No final do século XIX, na guerra em África do Sul, o própolis foi amplamente utilizado devido às suas propriedades cicatrizantes e durante a Segunda Guerra Mundial foi introduzido em várias clínicas soviéticas, tendo sido desenvolvidos mais estudos e alargado o número das aplicações deste produto natural. Desde essa época que a comunidade científica se interessa por este produto, particularmente pelos seus constituintes e propriedades biológicas (Pereira *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2011b; Sforcin e Bankova, 2011). A vasta gama de aplicações do própolis deve-se à sua composição química, pois apresenta um número muito variável e complexo de

compostos ativos, principalmente devido à grande diversidade de fontes vegetais, mas outros fatores como as características geográficas e climáticas também a influenciam (Falcão *et al.*, 2014; Feás *et al.*, 2014).

1.2. Origem botânica e tipos de própolis

Como já referido, o própolis apresenta uma composição química muito variável, o que dificulta a sua padronização. Essa diversidade está intimamente ligada à fonte vegetal e à especificidade da flora local, que varia com o clima e condições fitogeográficas. As abelhas recolhem o material vegetal de diferentes partes das plantas, que irão também contribuir para a obtenção de diferentes compostos. A composição química do própolis é ainda influenciada pela época em que o material vegetal é recolhido e pela variabilidade genética das abelhas rainhas (Lustosa *et al.*, 2008; Falcão *et al.*, 2013b; Bankova *et al.*, 2014, 2016b; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Graikou *et al.*, 2016). Koo e Park (1997) demonstraram que a introdução de abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) no Brasil, em 1956, levou a uma africanização das abelhas presentes neste país. Esta africanização promoveu alterações genéticas nas abelhas europeias existentes no Brasil, promovendo um sistema de aloenzimas altamente polimórfico, enquanto a abelha europeia possuía uma única aloenzima. As diferenças genéticas - presença ou ausência deste alelo nas abelhas - levaram a uma composição de própolis distinta, pois cada espécie visita diferentes plantas. Todos estes diferentes fatores contribuem para a variabilidade observada em própolis provenientes de diferentes localidades e diferentes anos, como demonstrado por vários investigadores (Pereira, 2013; Marques, 2015; Oliveira, 2015).

Com base em vários estudos, o própolis tem sido tipificado de acordo com a sua origem vegetal e os seus principais constituintes químicos. Os diferentes tipos de própolis referidos por Bankova *et al.* (2016b) (Tabela 1) são identificados como: Choupo, Verde Brasileiro, Vermelho América do Sul, Mediterrâneo e *Mangifera*. No entanto, há autores que consideram existir dois tipos de própolis adicionais, nomeadamente o de tipo Videiro, que é encontrado na Rússia, e o tipo Clusia, derivado de *Clusia* spp., e com origem em Cuba e Venezuela (Graikou *et al.*, 2016). Estes diferentes tipos de própolis possuem constituintes com diferentes tipos estruturais, principalmente compostos fenólicos de diferentes classes, estando os principais componentes característicos de cada tipo apresentados também na Tabela 1.

O própolis do tipo Verde Brasileiro tem em *Baccharis dracunculifolia* uma das suas fontes vegetais principais (Tabela 1) e é um dos mais valorizados. No entanto, a sua grande potencialidade pode também estar relacionada com a africanização das abelhas, que as torna mais produtivas do que as europeias em relação ao própolis (Salatino *et al.*, 2005). Na região sudeste do Brasil, o própolis é rico em fenilpropanóides prenilados, sendo que os flavonóides aqui

encontrados são distintos dos encontrados no própolis do tipo Choupo (Falcão *et al.*, 2010). O própolis Europeu, do tipo Mediterrâneo, distingue-se pela elevada concentração em diterpenóides e é encontrado em regiões como a Grécia ou Argélia (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Kasiotis *et al.*, 2017).

Tabela 1: Tipos de própolis e seus componentes químicos característicos (adaptado de Silva-Carvalho *et al.* (2015), Bankova *et al.* (2016b) e Graikou *et al.* (2016)).

Origem Geográfica	Tipo de própolis	Fonte vegetal	Componentes característicos
Europa, Ásia Ocidental, China, África do Sul, América do Norte, Nova Zelândia	Choupo	Exsudato dos rebentos de choupos, principalmente <i>Populus</i> <i>nigra</i>	Pinocembrina, galangina, crisina, pinobanksina 3-O-acetato, pentenilo cafeico, fenetil cafeato (CAPE), ácido cafeico, ferúlico e ácido isoferúlico
Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais)	Verde Brasileiro	Exsudatos de folhas de <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i>	Artepilina C, druparina, aromadendrina, ácidos cafeoilquínicos
Brasil (parte nordeste), Cuba, México	Vermelho América do Sul	Exsudatos de <i>Dalbergia</i> <i>ecastophyllum</i> e de outras espécies de <i>Dalbergia</i>	Medicarpina, vestitol, 3-O-metil vestitol
Sul da Grécia e ilhas gregas, Creta, Sicília, Malta, Costa Adriática da Croácia	Mediterrâneo	Resina de <i>Cupressus</i> <i>sempervirens</i>	Ácidos diterpénicos (cupressico, isocupressico, imbricataloico), totarol, ferruginol
Indonésia, Oman, Brasil, Mianmar, Tailândia	<i>Mangífera</i>	Exsudato de fruta de <i>Mangífera indica</i>	Cardóis, cardanóis, ácidos anacárdicos, cicloartanos triterpenos
Rússia	Vidoeiro	<i>Betula verrucosa</i>	Acetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, canferida, α - acetóxiβetulenol
Cuba e Venezuela	Clusia	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenona poliisoprenilada, propolona A, nemorosona, gutiferona

Nas zonas temperadas, a principal fonte vegetal para a produção de própolis consiste em espécies de *Populus*, que apresentam similaridade na sua composição química, essencialmente na Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia (Bankova *et al.*, 2000, 2009). Miguel

et al. (2013) mostraram que várias amostras da região do Algarve apresentam diferenças essencialmente quantitativas nos seus compostos voláteis, ou seja, possivelmente as abelhas coletaram própolis de fontes botânicas idênticas, existindo os mesmos compostos em extratos diferentes. O própolis do tipo Choupo, encontrado na Europa e muito diferente dos restantes tipos de própolis, é composto principalmente por flavonóides, como a pinocembrina, galangina e crisina, ácidos fenólicos e seus ésteres. Apesar de idêntico às amostras europeias, o própolis português também contém outros componentes (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Falcão *et al.*, 2013a). Em Portugal, Falcão *et al.* (2013a) identificaram dois grupos de própolis diferentes: o própolis de clima temperado comum, que contém os compostos fenólicos típicos do Choupo, e um tipo de própolis raro que contém uma composição incomum em quercetina e kaempferol glicosídeo, para além de outros compostos nunca descritos em própolis. Este último tipo indica uma maior diversidade de fontes vegetais para além de *Populus* spp. Silva-Carvalho *et al.* (2015) também demonstraram que o própolis do Pereiro (distrito da Guarda, Beira Alta) tem uma elevada concentração de compostos fenólicos. Para além dos compostos referidos, o própolis contém também minerais, vitaminas, alguns ácidos gordos e algumas enzimas derivadas das secreções das abelhas (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

O conhecimento da composição química do própolis é essencial para conhecer as suas bioatividades, no entanto, uma composição química distinta não conduz sempre a diferenças significativas nas características farmacológicas e físico-químicas. Por exemplo, o própolis Verde Brasileiro e o própolis da Hungria, do tipo Choupo, apresentam um elevado valor em sesquiterpenos, sendo que o primeiro apresenta uma maior concentração de β -cariofileno e o segundo de β -eudesmol; no entanto os dois tipos apresentam atividade antibacteriana semelhante. O própolis do tipo Mediterrâneo apresenta maior quantidade de diterpenos que o do tipo Choupo, mas menor quantidade de polifenóis, assim como menor atividade antioxidante, contudo as propriedades antibacterianas são comparáveis nos dois tipos (Bankova *et al.*, 2014, 2016b). Como demonstrou Kujumgiev *et al.* (1999), própolis de origens distintas, como Bulgária, Egipto, Brasil e ilhas Canárias, que possuem características químicas completamente diferentes, têm, no entanto, uma grande similaridade nas suas atividades biológicas.

1.3. Composição química do própolis

Uma vez que o própolis é uma mistura muito complexa, não é de surpreender que as primeiras tentativas de determinar a sua composição química estivessem baseadas no fracionamento da mistura. Este fracionamento consistia na divisão da parte solúvel em álcool - fração de resina - e na parte insolúvel em álcool - designada fração de cera. Durante alguns anos pouco se fez para descobrir novos compostos, no entanto Popravko *et al.* (1969) aplicaram novas técnicas para separar e identificar compostos, tendo aumentado o número de componentes conhecidos em própolis (Ghisalberti, 1979). Nos anos 90, já tinham sido identificados cerca de 156 constituintes (Bankova *et al.*, 1994) e o número continuou a aumentar com a utilização, nos anos seguintes, de novas técnicas e combinações destas para detetar a origem botânica, identificar e quantificar novos compostos. Alguns dos métodos que têm permitido um maior conhecimento da composição deste produto natural são a espectrofotometria (Popova *et al.*, 2010), cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa – espectrofotometria de massa (GC-MS) (Cheng *et al.*, 2013; Kaškonienė *et al.*, 2014), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Popova *et al.*, 2004) e a cromatografia líquida – espectrofotometria de massa (LC-MS) (Midorikawa *et al.*, 2001; Falcão *et al.*, 2013b), entre outros (Funari e Ferro, 2006; Falcão *et al.*, 2010; Sawaya *et al.*, 2010; Anđelković *et al.*, 2016; Bankova *et al.*, 2016a), e permitiram isolar e identificar mais de 500 compostos até à data (Santos-Buelga e González-Paramás, 2017; Wali *et al.*, 2017). A utilização de diferentes solventes, como etanol, metanol ou água, também influencia a extração de diferentes compostos. O própolis extraído com álcool (70 – 95 %), que é o solvente mais usado, resulta num elevado número de substâncias fenólicas e um maior espectro de atividades, por exemplo, na atividade antimicrobiana (Santos *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2011; Santos-Buelga e González-Paramás, 2017). No entanto, Corrêa *et al.* (2016) demonstraram em própolis verde que, mesmo que a extração seja realizada com álcool, são necessárias pelo menos duas extrações sequenciais de forma a não haver perda de componentes químicos importantes nos resíduos.

Apesar da diversidade química, a generalidade das amostras de própolis partilha uma similaridade considerável na sua natureza química geral, sendo constituídas por cerca de 50 % de resinas, 30 % de ceras, 10 % de óleos essenciais, 5 % de pólenes e 5 % de outros compostos orgânicos (Falcão *et al.*, 2014; Feás *et al.*, 2014; Araujo e Carvalho, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Vários estudos têm sido realizados para identificar os princípios ativos (Bankova, 2009).

No própolis europeu, os principais constituintes são os flavonóides (flavonas, pinocembrina, galangina e crisina), enquanto estes flavonóides estão em muito menor quantidade em amostras de própolis brasileiro, sendo nestas abundantes outros compostos fenólicos (Pereira *et al.*, 2002; Santos-Buelga e González-Paramás, 2017). O própolis possui também ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides, esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos gordos e outros compostos em reduzidas quantidades. Possui ainda elementos inorgânicos como o cobre, magnésio, ferro, sódio, cálcio, alumínio, vanádio e silício. E, ainda, algumas vitaminas como B1, B2, B6, C, E e D e algumas enzimas derivadas da secreção glandular das abelhas (Lustosa *et al.*, 2008; Pasupuleti *et al.*, 2017).

Os compostos voláteis (aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas) constituem uma das frações mais importantes do própolis, por ser responsável pelas suas características organolépticas, que influenciam a sua apreciação pelos consumidores (Cheng *et al.*, 2013; Bankova *et al.*, 2014).

Um dos polifenóis mais presente nesta mistura e responsável por grande parte das suas bioatividades são os flavonóides (Tikhonov *et al.*, 1977; Zabaïou *et al.*, 2017). Estes estão em grande quantidade nos vegetais, estando em maior quantidade nas sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores, participando no crescimento, desenvolvimento e defesa contra agentes patogénicos. Existe já um grande número de flavonóides identificados no própolis, como as flavonas, quercetina, canferol, entre outros (Dornas *et al.*, 2009).

Uma vez que o própolis é um produto natural, é provável também a existência de contaminantes do meio ambiente. Como referido por Burdock (1998), a análise de alguns extratos demonstrou a ausência de clorocarbonetos. No entanto, mais recentemente, González-Martin *et al.* (2017) demonstraram a presença de vários pesticidas, como o triadimefon, prothion, procymidone, metazachlor, folpet, dicofol, e dichlofluanid, em amostras de própolis do Chile e Espanha.

1.3.1. Normalização da composição química do própolis

A normalização do própolis é muito necessária, uma vez que a composição química e as propriedades biológicas estão estritamente relacionadas. É, pois, essencial determinar os parâmetros que devem ser assegurados para que o própolis comercial possua uma determinada atividade farmacológica. A ausência de uma normalização constitui precisamente o maior problema para a aplicação do própolis, como por exemplo, na indústria alimentar, como

conservante de alimentos devido às suas propriedades microbidas e microstáticas, e/ou na indústria farmacêutica, para o tratamento de diferentes doenças (Pereira *et al.*, 2002; Feás *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Graikou *et al.*, 2016).

Sendo difícil e complexa a padronização universal do própolis, torna-se particularmente importante fazer uma investigação detalhada da composição de cada amostra de própolis e da sua origem botânica, pois a fonte vegetal determina a composição do própolis e conseqüentemente as suas bioatividades. Falcão *et al.* (2013a) procuraram padronizar várias amostras de própolis de diferentes regiões de Portugal, tendo em conta apenas as suas características físico-químicas. Nesse trabalho foram avaliados parâmetros como a água, conteúdo de cinzas e ceras, cor, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, na tentativa de relacionar o produto com a sua origem geográfica. As análises realizadas demonstraram a presença de diversidade no própolis português. No entanto, algumas regiões apresentam características semelhantes, o que não permite uma padronização baseada apenas na origem geográfica, comprovando a necessidade de conhecer a composição química e a sua fonte vegetal (Falcão *et al.*, 2013a).

A utilização de amostras quimicamente caracterizadas para ensaios biológicos é essencial para perceber as suas propriedades e fazer estudos comparativos. Kujumgiev *et al.* (1999) defendem que as propriedades do própolis são definidas pela mistura de todos ou alguns dos seus componentes e não pelo efeito de compostos isolados. Saliente-se, contudo, que o estudo de compostos isolados pode levar à descoberta de uma nova atividade, o que também é muito interessante para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. Com o avanço da ciência, estão atualmente disponíveis várias ferramentas de proteômica, metabolômica, análise da expressão génica, entre outros, que podem ajudar no estudo dos mecanismos de ação do própolis ou dos seus constituintes, sendo mais um instrumento para ajudar na sua padronização (Sforcin, 2016).

Embora a padronização do própolis seja muito complexa, poder-se-ão adotar algumas das abordagens utilizadas na padronização de outros produtos, inclusivamente da colmeia, como é o caso do mel padronizado. Beretta *et al.* (2005) procuraram estabelecer um conjunto de informações para a normalização das propriedades antioxidantes do mel. Primeiro, investigaram a capacidade antioxidante de méis comerciais com diferentes origens floral e geográfica, usando um grande número de testes espectrofotométricos. De seguida, procederam à comparação dos diferentes dados obtidos e obtiveram diferentes grupos de mel com base no poder antioxidante, e possivelmente também na sua composição química. Este trabalho revelou que, através de testes

antioxidantes, análises comparativas e avaliação quimiométrica, se pode obter uma base de informação rigorosa para a caracterização da atividade antioxidante do mel. O mesmo tipo de padronização tem sido tentado ao nível da atividade antibacteriana do mel, por forma a catalogar diferentes méis em função de tal propriedade. Medihoney™ é uma linha de produtos à base de mel de manuka (*Leptospermum scoparium*) de grau médico para o tratamento de feridas e queimaduras (Acton, 2008). Este mel é avaliado de acordo com um sistema de classificação designado “*Unique Manuka Factor*” (UMF), que é usado para categorizar o potencial antibacteriano, quantificando compostos como o metilglioxal e a dihidroxiacetona, e usando uma escala de 0 a 20 para classificar a sua eficiência. Para além deste sistema de classificação existem outros que quantificam outro tipo de compostos, os níveis de pH, os níveis de antioxidantes e compostos fenólicos (Mavric *et al.*, 2008; Wallace *et al.*, 2010). O Medihoney™ foi usado em diversos ensaios clínicos, comparando-se com tratamentos convencionais de forma a avaliar a atividade antibacteriana e também o tempo de cura das feridas, tendo-se obtido ótimos resultados. George e Cutting (2007) demonstraram *in vitro* as suas propriedades sobre diferentes microrganismos, concluindo que seria necessário apenas 4 % de Medihoney™ para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e estirpes multirresistentes, 6-8 % para *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e 12-14 % para *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando assim a importância da padronização, que permite saber as quantidades necessárias do produto para cada efeito. Estes estudos indicam que há benefícios clínicos na utilização de mel no tratamento de várias feridas (Robson *et al.*, 2009).

Segundo Bankova (2005) é quase impossível fazer uma padronização química universal do própolis, devido à diversidade dos seus compostos, mas poderá fazer-se uma padronização dos diferentes tipos de própolis de acordo com a sua origem botânica e o perfil químico. Ainda assim, a aceitação na prática clínica requer uma padronização química que garanta a sua qualidade, segurança e eficácia; enquanto tal se não verificar, a sua utilização em produtos farmacêuticos será limitada (Bankova *et al.*, 2000, 2005).

1.4. Atividades biológicas do própolis

Nos últimos 50 anos, este produto foi sujeito a numerosos estudos que foram demonstrando diversas propriedades biológicas e farmacológicas, como as atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora e anticancerígena (Silva *et al.*, 2012; Falcão *et al.*, 2013b, 2014; Bankova *et al.*, 2014; Feás *et al.*, 2014; Graikou *et al.*, 2016) .

Os extratos de própolis das regiões tropicais exibem uma maior variedade de atividades biológicas do que os extratos das regiões temperadas, atribuída a uma maior diversidade vegetal e à maior diversidade de compostos químicos; no entanto, a diversidade de atividades farmacológicas pode também ser devida a sinergismos entre os diversos constituintes (Menezes, 2005).

Para além das aplicações farmacêuticas, o própolis tem também sido estudado como um agente inibidor da corrosão, que é um grave problema para a indústria e a construção civil (Morais *et al.*, 2017; Varvara *et al.*, 2017). Varvara *et al.* (2017) relataram a ação inibidora do própolis sobre a corrosão de bronze numa solução de pH 5. O estudo foi realizado variando a concentração de própolis e do tempo de imersão no eletrólito corrosivo. O própolis revelou ótimas propriedades anticorrosivas no bronze, com uma eficiência inibidora de 98,9 % após 12 h de exposição. Neste estudo, foi ainda inferido que esta propriedade estará relacionada com a adsorção dos compostos fenólicos presentes no própolis, que formam uma camada superficial compacta e homogênea na superfície metálica.

1.4.1. Atividade antioxidante

Estímulos endógenos, como o metabolismo celular, e estímulos exógenos, como a radiação ultravioleta, toxinas e fármacos, originam espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como espécies reativas de azoto (RNS). Quando expostas a espécies reativas, biomoléculas como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, sofrem modificações oxidativas que, consequentemente, afetam a célula, podendo provocar a sua morte. Estas espécies químicas são muito reativas e instáveis; porém, podem ser aprisionadas ou neutralizadas por substâncias antioxidantes (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2016).

O stresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio entre pro-oxidantes e defesas antioxidantes no organismo. O mecanismo pelo qual os radicais livres interferem nas funções celulares ainda não é bem compreendido, no entanto, um dos processos parece estar relacionado com a formação de hidroperóxidos lipídicos (Mitra e Uddin, 2014). Muitas doenças estão relacionadas com a ocorrência de stresse oxidativo, tais como as doenças neurodegenerativas, psiquiátricas, cardiovasculares, doenças renais, cancro, diabetes, aterosclerose, e ainda processos como o envelhecimento precoce e inflamação (Menezes, 2005; Dornas *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2016). Lapidot *et al.* (2002) verificaram que as células- β pancreáticas são sensíveis ao stresse oxidativo. Isto pode contribuir para o mau funcionamento característico destas células, diminuindo, ou mesmo interrompendo, a produção e secreção da insulina no pâncreas, levando à diabetes. Vários investigadores (Jabir, 2017; Pristiwanto *et al.*, 2017; Samadi *et al.*, 2017) comprovaram a eficácia do própolis contra a diabetes, nomeadamente como antioxidante, diminuindo os distúrbios metabólicos, diminuindo a expressão dos recetores TLR3 e TLR4, responsáveis pela imunidade inata, e ainda uma melhoria dos níveis de glucose no sangue.

O cérebro também é suscetível a danos oxidativos, em especial no sistema nervoso central, pois tem uma elevada utilização de oxigénio e uma elevada quantidade de lípidos não saturados, que são especialmente sensíveis à peroxidação lipídica induzida por radicais livres, para além de ter poucos mecanismos de defesa antioxidante. A principal fonte de energia deste órgão é o metabolismo oxidativo da ação respiratória mitocondrial, o que torna o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio os principais indutores do stresse oxidativo. A acumulação de danos oxidativos no cérebro pode ser responsável pelo aparecimento tardio e pela lenta progressão das doenças neurodegenerativas (Dornas *et al.*, 2009; Heo e Lee, 2004). Heo e Lee (2004) provaram que a quercetina exerceu um efeito protetor maior do que a vitamina C em células neuronais na condição de stresse induzido por oxidação. A quercetina levou a uma diminuição mais significativa nos danos da membrana da célula neuronal, revelando assim um papel muito importante na proteção destas células contra a neurotoxicidade induzida por stresse oxidativo, tal como na doença de Alzheimer. Mohamed *et al.* (2016), Desamero *et al.* (2017) e Nanaware *et al.* (2017) são alguns dos autores que comprovaram, em ratos, o efeito protetor do própolis sobre o cérebro, como a proteção de hematotoxicidade e danos neurológicos induzidos por temperatura ambiente muito elevada, neuroproteção em relação aos danos provocados pelo AVC isquémico e, ainda, melhoria da memória e a proteção antioxidante do sistema nervoso central. Li *et al.* (2012)

descreveram também a capacidade dos óleos essenciais de própolis para reduzir a ansiedade, atuando sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e melhorando a atividade antioxidante, sugerindo a possibilidade de usar o própolis como antidepressivo, tal como referido por Lee *et al.* (2013).

As plantas medicinais, frutas e legumes são amplamente conhecidos por terem poder antioxidante e, uma vez que os produtos da colmeia são originados a partir de plantas, é normal que também tenham tal propriedade. Os compostos fenólicos são um dos principais grupos conhecidos por atuarem como antioxidantes (Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2016). Vários estudos têm sido realizados, comprovando uma correlação entre o elevado conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, sendo as amostras de própolis com maior conteúdo de flavonóides totais as que apresentam um maior poder antioxidante (Moreira *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2010; Fabris *et al.*, 2013; Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2016). As amostras de própolis de Portugal também têm mostrado atividade antioxidante, como demonstrado por Marques (2015) em amostras de própolis do Pereiro e por Freitas (2015) em própolis do Gerês. Miguel *et al.* (2010) verificaram que os fenóis, flavonas e flavonóis têm um maior contributo na atividade antioxidante do que flavanonas e dihidroflavonóis.

Uma outra aplicação do própolis é na indústria alimentar. As reações de oxidação encurtam a vida útil dos alimentos, provocando odores, sabores e alterações de cor além de que altera o seu valor nutricional (Moreira *et al.*, 2011a). A título de exemplo, e como comprovado por Natsir *et al.* (2017), o própolis tem potencial como conservante natural de carne.

A atividade antioxidante tem sido das mais estudadas em própolis, no entanto, ainda não existem estudos que indiquem a dosagem segura deste produto natural a ser utilizada em seres humanos (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

1.4.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do própolis, uma das suas bioatividades mais estudadas, está comprovada contra diferentes bactérias, leveduras, vírus e parasitas. *In vitro*, o própolis atua diretamente sobre os microrganismos, mas *in vivo* pode estimular o sistema imunológico a ativar os mecanismos responsáveis pela morte microbiana (Sforcin e Bankova, 2011).

As atividades antibacteriana e antifúngica devem-se essencialmente à presença da flavonona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster fenil-etílico do ácido cafeico (CAPE) ou

ao sinergismo entre estes ou outros compostos (Bosio *et al.*, 2000; Uzel *et al.*, 2005). Estas substâncias atuam provavelmente inibindo a RNA-polimerase das bactérias e destruindo a membrana citoplasmática, levando à perda dos íons potássio e conseqüentemente à autólise (Takaisi-Kikuni e Schilcher, 1994; Lustosa *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2011a). Galangina e pinocembrina, quando isoladas do própolis, demonstraram atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis*, *B. alvei* e *Proteus vulgaris* (Ghisalberti, 1979). Este efeito já foi demonstrado em vários trabalhos, sendo que diferentes extratos de própolis comprovaram inibir o crescimento de diversas bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces naeslundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e leveduras como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Kujumgiev *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2011; Popova *et al.*, 2013; Araujo e Carvalho, 2015). Vários estudos têm comprovado uma maior atividade de própolis contra bactérias Gram-positivas e mais limitada para Gram-negativas (Silva *et al.*, 2012; Marques, 2015; Gomes *et al.*, 2016). Até ao momento, ainda não se sabe o porquê desta menor atividade do própolis sobre as bactérias Gram-negativas, no entanto, pensa-se que esteja relacionado com a estrutura da parede celular, que é mais complexa nas bactérias Gram-negativas. A parede celular deste grupo de bactérias tem na sua constituição lipopolissacarídeos, responsáveis pela antigenicidade, toxicidade e patogenicidade, e possui ainda um teor lipídico mais elevado do que as bactérias Gram-positivas (Vargas *et al.*, 2004; Lustosa *et al.*, 2008). Hashimoto *et al.* (1998) reportaram a inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori* por uma amostra de própolis brasileiro sugerindo assim que a ingestão de própolis pode ter alguma ação na inibição de úlceras gástricas, dada a relação da bactéria com esta patologia.

Em relação à atividade antifúngica também têm sido realizados alguns estudos, como o de Berretta *et al.* (2013), que estudaram a formação de um gel mucoadesivo com própolis para combater a candidíase vulvovaginal. Este estudo demonstrou uma atividade antifúngica muito idêntica ao creme clotrimazole, utilizado para este efeito. Tobaldini-Valerio *et al.* (2016) também demonstraram que o própolis é um forte agente antifúngico, não apenas para *Candida albicans*, mas também para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Devido às propriedades bactericidas e fungicidas, Pereira *et al.* (2016) estudaram a aplicação de própolis em culturas de feijoeiro, cafeeiro, pepineiro e tomateiro, onde se apurou uma redução significativa de vários agentes fitopatogênicos e, ainda, efeitos sobre a população de ácaros e redução dos sintomas de stresse hídrico nas culturas.

Vários trabalhos têm demonstrado também uma atividade sinérgica do própolis quando associado a antibióticos e esta associação com fármacos comercialmente disponíveis é de grande interesse, principalmente como alternativa terapêutica para a resistência microbiana (Lustosa *et al.*, 2008; Sforcin e Bankova, 2011). Num estudo com a bactéria *Salmonella typhi*, Orsi *et al.* (2006) mostraram o efeito antibacteriano de uma amostra de própolis do Brasil e uma da Bulgária, esta última mais eficiente, mas quando testados juntamente com antibióticos que atuam na parede celular, ambos mostraram um efeito sinérgico semelhante. Scazzocchio *et al.* (2006) constataram que a associação de extrato etanólico de própolis a alguns antibióticos como ampicilina, gentamicina e estreptomicina, aumentou o efeito antimicrobiano contra estirpes Gram-positivas. Este efeito foi também reportado por Guzmán e Cruz (2017) para a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Estes resultados são de grande interesse por permitirem perspetivar diminuir as doses clínicas de antibióticos e, por consequência, os seus efeitos colaterais. Todavia, tem sido difícil obter para os produtos naturais a eficiência exibida pelas drogas convencionais (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Sforcin, 2016).

1.4.3. Atividade anti-inflamatória

A inflamação ocorre normalmente em resposta a uma agressão ao organismo - neste processo ocorre a ativação de uma cascata de sinais químicos que permite a correção do tecido lesado. A inflamação tem duas fases: aguda e crónica. Na fase aguda ocorre a ativação das células do sistema imunitário libertando fatores de crescimento, citocinas e espécies ROS/RNS no local da lesão. Quando a inflamação aguda não tem sucesso no tratamento da lesão surge a inflamação crónica. Esta é crítica na patogénese de muitas doenças como a aterosclerose, cancro, asma e alzheimer (Ramos e Miranda, 2007; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Vários estudos têm associado o própolis com a atividade anti-inflamatória (Mirzoeva e Calder, 1996; Hu *et al.*, 2005; Chirumbolo, 2010) que por sua vez parece estar relacionada com a presença de flavonóides, essencialmente a galangina, inibindo a cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), que são enzimas essenciais para que ocorra o processo de inflamação. Tem também sido descrito que o CAPE exibe atividade anti-inflamatória, pois inibe a libertação do ácido araquidónico da membrana celular inibindo as enzimas COX-1 e COX-2 (Banskota *et al.*, 2001; Borrelli *et al.*, 2002; Ramos e Miranda, 2007; Lustosa *et al.*, 2008). Valenzuela-Barra *et al.* (2015) reportaram a atividade anti-inflamatória em extratos de própolis do Chile, embora com algumas

diferenças, causadas pela variação dos compostos fenólicos entre as amostras. Machado *et al.* (2016) utilizaram uma mistura de ácido úsnico e própolis para tratar a acne, sendo que aqui o própolis foi utilizado pela sua ação cicatrizante, secante e anti-inflamatória e o ácido úsnico pelas atividades antimicrobiana, antiviral, antiproliferativa, antitumoral, anti-inflamatória. Este tratamento da acne foi particularmente eficaz. Paralelamente, foi igualmente demonstrado que o própolis é eficaz como antimicrobiano contra *Propionibacterium acnes* que liberta enzimas que contribuem para a destruição da parede folicular e estimula a resposta inflamatória (Luz e Fraga, 2017).

1.4.4. Atividade antitumoral e citotóxica

O genoma dos organismos vivos está sujeito a danos provocados por agentes externos ou processos endógenos, podendo levar à ocorrência de mutações. No entanto, os agentes antigenotóxicos e antimutagênicos podem contrariar estes efeitos, existindo por isso uma grande procura para identificar estes compostos (Roberto *et al.*, 2016).

O própolis é capaz de bloquear vias de sinalização oncogénicas específicas, como β -catenina, NF-kB e algum intermediário da via PI3K/AKT, promovendo uma diminuição da proliferação e crescimento celular. Pode também atuar por indução da apoptose, diminuição da população de células estaminais do cancro, assim como exercer efeitos antiangiogénicos e promover alterações no metabolismo glicolítico das células cancerosas (Valença *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2014; Elbaz *et al.*, 2016; Frozza *et al.*, 2017). Por exemplo, Varanda *et al.* (1999) demonstraram o efeito antimutagénico de um extrato etanólico de própolis sobre *Salmonella typhimurium*, estando este efeito relacionado com a presença de compostos com atividade antioxidante. Bielec *et al.* (2015) descreveram a atividade antiproliferativa de um extrato etanólico de própolis da Polónia. Este extrato inibiu a proliferação celular, bem como reduziu o tamanho das células no melanoma maligno humano (Me45) e numa linha tumoral de cancro colorretal (HCT 116).

O CAPE apresenta uma ação antitumoral potente sendo um bom candidato para o efeito quimiopreventivo, já a artepilina C parece ser eficaz a combater as células tumorais (Banskota *et al.*, 2001). Liao *et al.* (2003) estudaram o efeito de CAPE isolado de própolis na angiogénese, na invasão tumoral e em metástases pulmonares, verificando que pode afetar processos metastáticos de células tumorais por desequilíbrio redox sem toxicidade significativa no tecido normal. Utilizando um extrato etanólico de própolis chinês, Chang *et al.* (2017) comprovaram também a importância

de CAPE na ação antitumoral, pois promove, no microambiente inflamatório, a ativação da apoptose, autofagia e ainda a inibição da via de sinalização do recetor do tipo Toll 4 (TLR4). Este recetor, quando sobreativado, pode causar disfunção na resposta imune. Kimoto *et al.* (1998) demonstraram o efeito citotóxico e inibição do crescimento de células de tumores malignos, constatando que a artepilina C extraída de um extrato de própolis brasileiro ativa o sistema imunológico e também possui atividade antitumoral direta.

Nestes últimos anos têm sido realizados muitos ensaios que comprovam a atividade antitumoral e citotóxica do própolis em vários tipos de cancros, como no cancro colorretal (Valença *et al.*, 2013), em que a citotoxicidade do própolis afeta o metabolismo glicolítico das células tumorais, cancro no fígado (Elbaz *et al.*, 2016; Seydi *et al.*, 2016), neuroblastoma (Kim e Yoo, 2016) e cancro na laringe (Frezza *et al.*, 2017). São ainda necessários vários estudos nesta área, sendo essencial comparar a ação do própolis com as drogas antitumorais, ou mesmo em associação com estas (Sforcin e Bankova, 2011).

1.5. Efeito tóxico e alergénico

Em contraste com os benefícios do própolis, este também tem algumas desvantagens, como o efeito tóxico e alergénico (Banskota *et al.*, 2001). No entanto, vários estudos têm demonstrado que é necessário ingerir uma grande quantidade de própolis, com valores de DL_{50} de cerca de 2 a 7,3 g/Kg em ratos para se tornar tóxico, concluindo-se assim que é pouco tóxico (Burdock, 1998). Como mencionado anteriormente o própolis consiste numa mistura que integra material vegetal, mas por vezes as abelhas recolhem algumas substâncias perigosas, como asfalto em construções rodoviárias, podendo causar efeitos alergénicos e/ou tóxicos (Banskota *et al.*, 2001). Em consonância, têm sido detetados alguns episódios de alergia e de dermatites de contacto, como o caso descrito por Lamoureux *et al.* (2017), que ocorreu devido ao uso tópico de uma essência de própolis para uma picada de inseto, sendo que esta situação se trata de um tipo de alergia atípica e rara. O extrato de própolis possui ação antialérgica, no entanto, em elevadas concentrações, o própolis ativa os mastócitos, levando à libertação de histamina que promove o processo de inflamação (Sforcin, 2007). O própolis geralmente induz eczema de contacto “clássico” e uma vez que as suas aplicações têm vindo a aumentar, a incidência de alergia também parece estar a aumentar, como descrito na literatura: 1,2 - 6,6 % das pessoas testadas reagiram ao própolis (Walgrave *et al.*, 2005; Lamoureux *et al.*, 2017).

1.6. Objetivos

O própolis é um produto com uma vasta gama de aplicações, no entanto a sua produção é muito limitada, sendo que uma colmeia europeia pode produzir cerca de 50 a 150 g de própolis por ano (Casaca, 2010). Em Portugal, onde a apicultura tem alguma expressão, com um valor de cerca de 50 milhões de euros, segundo a Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, o própolis ainda é pouco valorizado; para além da baixa produção, a sua recolha é uma tarefa complexa e de pouco sucesso, e a sua utilização não é direta pois o própolis não pode ser usado em bruto, acabando por ser considerado um subproduto da colmeia (Pardal *et al.*, 2014). Regularmente comercializado a valores inferiores a 50 euros por quilograma, mas pode atingir cerca de 150 euros por quilograma noutros países (Dias *et al.*, 2012).

Tendo em conta a baixa produtividade do própolis e que, em Portugal, ainda é geralmente considerado um produto subvalorizado, pretendeu-se com este trabalho procurar soluções que permitam valorizar o própolis nacional e contornar as limitações da sua escassez. Nessa perspetiva, tentou-se elaborar algumas misturas com extratos etanólicos de própolis de origens diferentes e/ou colhidas em anos diferentes. Este é um tipo de abordagem inovadora, mas que permitiria, por um lado, aproveitar e valorizar este produto natural e, por outro lado, contribuir eventualmente para uma maior uniformização ao nível da sua composição. Num estudo prévio, Oliveira (2015) fez ensaios com algumas misturas de própolis e algumas das bioatividades avaliadas foram potenciadas. Este trabalho de carácter exploratório demonstrou que a incorporação de própolis em misturas, mesmo partindo de amostras com atividades diferentes, nunca se traduziu em perda de bioatividades, indicando que estas misturas poderão revelar-se uma boa possibilidade de rentabilização deste produto. Para além das misturas poderem aproveitar diferentes amostras, há a possibilidade de alguns extratos de própolis/compostos potenciarem outros extratos/compostos, melhorando as bioatividades da mistura assim como será possível contribuir desta forma para uma maior uniformização da composição química, diluindo diferenças existentes entre amostras individuais.

Pretendeu-se assim preparar misturas de extratos de própolis provenientes de localizações geográficas distintas e/ou recolhidas em anos diferentes, que apresentam perfis diferentes nas suas atividades biológicas. Usaram-se extratos etanólicos de própolis proveniente das duas regiões - Pereiro e Gerês – e recolhido em diferentes anos. As misturas de extratos foram preparadas usando extratos da mesma localidade, mas de anos diferentes, com o objetivo de averiguar a

possibilidade de rentabilizar este produto por um apicultor, e extratos provenientes de diferentes regiões, esta abordagem com vista a valorizar e tentar homogeneizar certos extratos.

As misturas foram de seguida caracterizadas quanto aos seus perfis químicos e avaliadas em relação às suas bioatividades, nomeadamente a atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo os resultados comparados com os obtidos para os extratos etanólicos de própolis individuais, recolhidas num só ano. Desta forma se pretende averiguar se tais misturas podem ser exploradas em diversas aplicações, se apresentam ou não vantagens relativamente aos extratos individuais e se ao incorporar própolis de regiões distintas e/ou recolhidas diferentes se poderá contribuir para de certa forma contornar a questão da escassez deste produto natural, dando maior valorização aos recursos nacionais. Uma vez que o própolis ainda é pouco conhecido em Portugal, este trabalho tem também como objetivo mostrar as suas diversas potencialidades, contribuindo para a sua valorização.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras de própolis

As diferentes amostras de própolis utilizadas neste trabalho foram recolhidas em Portugal, ao longo de um período de cinco anos, entre 2011 e 2015, em apiários de duas localidades distintas. Um dos apiários situa-se no distrito da Guarda, mais especificamente no concelho de Pinhel, freguesia do Pereiro (40°44'57.135" N; 7°0'59.403" O), o outro apiário localiza-se no Gerês, junto ao rio Cávado, entre as freguesias de Paradela e Sirvozel, em Montalegre (41°45'41.62" N; 7°58'03.34" W). Amostras de própolis foram coletadas de cada um dos apiários anualmente, normalmente em agosto e/ou setembro, e foram identificadas com as letras maiúsculas P e G de acordo com a sua proveniência (Pereiro e Gerês respetivamente) seguidas de dois algarismos correspondentes ao ano da colheita, por exemplo G11 e P15 que correspondem ao própolis proveniente do Gerês e colhido em 2011 e ao própolis recolhido em 2015 no Pereiro, respetivamente.

2.1.1. Extração etanólica do própolis

As amostras foram extraídas com diferentes solventes, em diferentes trabalhos, ainda que todas fossem usadas para preparar extratos etanólicos (EE), os únicos usados no presente estudo. De um modo geral, o processo de extração etanólica foi realizado da seguinte forma: a cerca de 15 g de própolis foram adicionados 100 ml de etanol absoluto (Sigma-Aldrich) incubando-se no escuro, à temperatura ambiente e num agitador orbital (Orbital shaker, Bibby Stuart S01), a 110 rotações por minuto (rpm) durante 24 h. Esta solução foi de seguida filtrada usando um funil de Buchner e um Kitasato associado a uma bomba de vácuo (600 milibar). O filtrado foi reservado e os resíduos resultantes foram sujeitos a mais duas extrações com etanol absoluto, seguindo o procedimento descrito. Os filtrados de própolis reservados foram misturados e submetidos à evaporação do solvente recorrendo a um Rotavapor (Büchi Rotavapor RE 121), conectado a um banho (Büchi 461 Water Bath) a uma temperatura de 38 – 40 °C e a uma rotação de 47 rpm, dando origem aos diferentes extratos etanólicos de própolis, que foram conservados a 4 °C, no escuro, até uso posterior. Os extratos etanólicos usados no presente trabalho – G.EEs e P.EEs - encontram-se na tabela que se segue.

Tabela 2: Extratos etanólicos de própolis do Gerês e do Pereiro usados neste trabalho e preparados por diferentes investigadores a partir de amostras de própolis recolhidas entre 2011 a 2015.

G.EEs		P.EEs	
G11.EE	Pereira (2013)	P11.EE	Alves A. (não publicado)
G12.EE	Pereira (2013)	P12.EE	Pereira (2013)
G13.EE	Araújo (2014)	P13.EE	Alves A. (não publicado)
G14.EE	Freitas (2015)	P14.EE	Marques (2015)
G15.EE	Gonçalves (2017)	P15.EE	Moreira (2017)

2.1.2. Preparação de misturas de extratos etanólicos de própolis

As misturas de extratos etanólicos de própolis foram preparadas tendo em conta as bioatividades dos extratos de amostras individuais de própolis, nomeadamente as atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica de G.EEs e P.EEs. Assim, numa primeira fase deste trabalho, procedeu-se à recolha da informação relativa às três bioatividades referidas para os vários extratos etanólicos usados (Tabela 2), seguindo-se a sua análise e classificação em três categorias designadas como: o “mais ativo”, o “menos ativo” e os “intermédios” (os restantes) no conjunto dos P.EEs (Anexo I, Tabelas I.1, I.2, I.3, I.4 e I.5) e dos G.EEs (Anexo II, Tabelas II.1, II.2, II.3, II.4 e II.5) usados. Com base nesta classificação, foram preparadas misturas contendo exclusivamente P.EEs ou G.EEs obedecendo aos seguintes critérios: (i) mistura do EE mais ativo com o EE menos ativo, (ii) mistura de um EE intermédio com o EE menos ativo, (iii) mistura de um EE intermédio com o EE mais ativo, (iv) mistura de EEs intermédios e (v) mistura de todos os cinco EEs de própolis de cada região.

Relativamente ao própolis do Pereiro, e tendo em consideração as três categorias de classificação para as três atividades biológicas e os critérios subjacentes à elaboração das misturas, preparou-se um total de 13 misturas (Tabela 3). No entanto, algumas misturas repetem-se, por terem na sua formulação os mesmos extratos, desta forma correspondendo a um total de 9 misturas diferentes.

Tabela 3: Constituição das misturas de P.EEs com base nos critérios indicados na primeira coluna e tendo em conta a classificação de cada P.EE relativamente às atividades antioxidante, antifúngica e antibacteriana (Anexo I, Tabelas I.1, I.2, I.3, I.4 e I.5).

Critérios usados na mistura de EE	Atividade Antioxidante	Atividade Antifúngica*	Atividade Antibacteriana*
Mais ativo + Menos ativo	P15.EE+P14.EE	P11.EE+P12.EE	P14.EE+P11.EE
Intermédio + Menos ativo	P13.EE+P14.EE	P13.EE+P12.EE	P13.EE+P11.EE
Intermédio + Mais ativo	P13.EE+P15.EE	P13.EE+P11.EE	P13.EE+P14.EE
Mistura de intermédios	P11.EE+P12.EE+P13.EE	P13.EE+P14.EE	P13.EE+P12.EE
Mistura de todos os extratos	P11.EE+P12.EE+P13.EE+P14.EE+P15.EE		

*Nota: Dada a ausência de resultados sobre as propriedades antimicrobiana do P15.EE à data de formulação das misturas, este extrato só foi considerado na análise da atividade antioxidante.

No que diz respeito ao própolis do Gerês, os critérios subjacentes à preparação das misturas foram a atividade antioxidante e antimicrobiana, uma vez que não se verifica diferenças no valor de MIC para G11.EE, G12.EE, G13.EE e G14.EE, contra qualquer estirpe de bactéria e leveduras, que promoveu a formação de 9 misturas (Tabela 4). Como duas das misturas possuem a mesma composição, foram consideradas apenas 8 misturas com extratos provenientes do Gerês.

Foram elaboradas mais duas misturas, neste caso juntando própolis proveniente de apiários diferentes. Usou-se para esse efeito G.EEs e P.EEs (Tabela 5), e tendo igualmente em consideração os extratos mais e menos ativos quanto à atividade antioxidante (Anexos I e II, Tabelas I.1, I.2, I.3 e II.1, II.2, II.3 respetivamente).

Tabela 4: Constituição das misturas G.EEs com base nos critérios indicados na primeira coluna e tendo em conta a classificação de cada G.EE relativamente à atividade antioxidante e antimicrobiana (Anexo II, Tabelas II.1, II.2, II.3, II.4 e II.5).

Critérios usados na mistura de EE	Atividade Antioxidante	Atividade Antimicrobiana
Mais ativo + Menos ativo	G15.EE+G13.EE	G15.EE+G14.EE
Intermédio + Menos ativo	G11.EE+G13.EE	G11.EE+G14.EE
Intermédio + Mais ativo	G11.EE+G15.EE	G11.EE+G15.EE
Mistura de intermédios	G11.EE+G12.EE+G14.EE	G11.EE+G12.EE+G13.EE
Mistura de todos os extratos	G11.EE+G12.EE+G13.EE+G14.EE+G15.EE	

Tabela 5: Misturas de extratos etanólicos de própolis provenientes de localidades distintas, Pereiro e Gerês, tendo em consideração a atividade antioxidante.

Critérios subjacentes à mistura	Misturas
Menos ativo (Pereiro) + Mais ativo (Gerês)	P14.EE+G15.EE
Mais ativo (Pereiro) + Menos ativo (Gerês)	P15.EE+G14.EE

As misturas serão representadas genericamente pela letra **m**. Quando preparadas com amostras de um só apiário, mas recolhidas em anos distintos, à letra m segue-se a letra identificadora do apiário (G ou P) e um parêntesis contendo no interior os EEs utilizados para fazer a mistura. Assim por exemplo $mP_{(P11.EE - P15.EE)}$, representa a mistura dos cinco extratos etanólicos de própolis do Pereiro recolhido nos anos de 2011 a 2015.

Quando preparadas com amostras dos dois apiários, a letra m é seguida de um parêntesis que inclui no seu interior o G.EE e o P.EE usados para fazer essa mistura. Assim por exemplo

$m_{(P14.EE - G15.EE)}$ representará a mistura do extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2014 e do extratos etanólico de própolis do Gêres recolhido em 2015.

Todas as misturas foram preparadas a partir de extratos etanólicos a uma concentração de 10 mg/ ml. As misturas foram feitas tendo em conta uma proporcionalidade dos seus componentes, ou seja, para uma mistura de dois extratos e 1 ml de volume final foram adicionados 0,5 ml de cada extrato. Para as misturas de 3 e 5 extratos seguiu-se o mesmo critério, dividindo o volume total da mistura pelo número de extratos nela presentes por forma a calcular o volume a adicionar dos extratos.

2.2. Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de polifenóis totais foi determinado usando uma adaptação do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Kumazawa *et al.*, 2004). O extrato etanólico de própolis (50 μ l), preparado numa gama de concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 μ g/ml, foi adicionado a 50 μ l do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) a 10 % (p/v) e a 40 μ l de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Acros Organics) a 7,5 % (p/v). Para cada concentração foi realizado um branco, onde se adicionou apenas o extrato e perpez-se o restante volume com etanol, e foi feito também um controlo, contendo apenas os reagentes. A absorvância foi medida a 760 nm, num espectrofotómetro (SpectraMax Plus) após uma hora de incubação à temperatura ambiente no escuro.

Os resultados são apresentados em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de própolis (mg EAG/ g extrato), tendo para o efeito sido efetuada uma curva de calibração com ácido gálico (Sigma-Aldrich) no intervalo de concentrações de 5 a 50 μ g/ml. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Salvo indicação em contrário, o ensaio foi realizado pelo menos três vezes.

Os resultados obtidos para as misturas de extratos etanólicos de própolis foram posteriormente comparados com os valores previamente registados para cada um dos P.EEs (Anexo I, Tabela I.1) e G.EEs (Anexo II, Tabela II.1).

2.3. Determinação do teor de flavonóides

A quantidade de flavonóides nos extratos foi determinada tendo por base o método de Woisky e Salatino (1998) que se baseia na formação de um complexo flavonóide-alumínio (Coelho, 2013).

O ensaio foi realizado utilizando uma mistura de 50 µl de extrato etanólico de própolis (numa gama de concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000, 1200 e 1400 µg/ml) e 50 µl de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) (Acros Organics) a 2 % (p/v). Foi realizado um controlo, contendo apenas os reagentes e perfazendo-se o volume com etanol, e ainda um branco para cada concentração em que somente se colocou o extrato. A solução obtida foi incubada uma hora à temperatura ambiente no escuro e, de seguida, a absorvância da mistura foi medida a 420 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax Plus).

O conteúdo total de flavonóides foi calculado usando a quercetina (Acros Organics) como composto padrão, tendo sido utilizada num intervalo de concentrações entre 5 a 200 µg/ ml para a obtenção da sua curva de calibração. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de própolis (mg EQ/ g extrato), sendo que todos os ensaios foram realizados pelo menos três vezes e em triplicado.

Os valores de flavonóides obtidos para as misturas de extratos etanólicos de própolis foram depois comparados com os valores anteriormente registados para cada um dos P.EEs (Anexo I, Tabela I.2) e G.EEs (Anexo II, Tabela II.2).

2.4. Atividade de captura de radicais livres DPPH

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um radical livre estável, uma vez que a posição do eletrão desemparelhado sobre a molécula como um todo faz com que as moléculas não dimerizem, ao contrário da maioria dos outros radicais livres. A sua conformação também é responsável pela sua coloração roxa, caracterizada por uma banda de forte absorção em solução de etanol a cerca de 517 nm (Blois, 1958; Molyneux, 2004; Mitra e Uddin, 2014). Este método baseia-se na redução das moléculas de DPPH quando estão na presença de antioxidantes dadores

de hidrogénio, esta ligação promove a alteração da cor roxa para amarela. A mudança de cor é medida por espectrometria, permitindo a monitorização visual da reação (Mitra e Uddin, 2014).

A atividade de captura de radicais livres de DPPH foi determinada dissolvendo as misturas em etanol absoluto para obter as concentrações de 1 a 50 µg/ml e o DPPH (Sigma-Aldrich) foi preparado a 0,004 % (p/v) em etanol. Numa placa de 96 poços foram adicionados 100 µl de DPPH para 50 µl da amostra de própolis, sendo depois incubada à temperatura ambiente no escuro durante 20 minutos. Como referido anteriormente, a absorvância da reação foi medida a 517 nm. A percentagem de redução para as diferentes concentrações foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \left(\frac{A_{\text{Controlo}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controlo}}} \right) \times 100$$

em que a A_{Amostra} é a absorvância do extrato com o DPPH e A_{Controlo} é a absorvância do controlo, com DPPH e etanol. Para cada mistura foram realizados pelo menos três ensaios independentes com três réplicas. A partir destes valores foi calculado o IC_{50} (µg/ml), que define a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade de DPPH, ou seja, é a concentração de extrato necessária para reduzir 50 % do radical livre. Como padrão foi utilizado o ácido gálico.

Os valores de IC_{50} das misturas de extratos etanólicos de própolis foram posteriormente comparados com os valores previamente registados para cada um dos P.EEs (Anexo I, Tabela I.3) e G.EEs (Anexo II, Tabela II.3).

2.5. Avaliação do potencial antimicrobiano das misturas de própolis

A atividade antimicrobiana das diferentes misturas de própolis foi avaliada utilizando uma adaptação do método de diluição em agar, sendo as misturas incorporadas em várias concentrações, a fim de determinar os valores das concentrações mínimas inibitórias (MIC).

2.5.1. Microrganismos e condições de cultura

Para este estudo foram utilizados microrganismos indicadores de suscetibilidade e de interesse científico, nomeadamente, 6 bactérias Gram-positivas, 1 bactéria Gram-negativa e 2 leveduras (Tabela 6).

Tabela 6: Painel de microrganismos utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana.

	Espécies	Referência
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i>	48886
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 7064
	<i>Bacillus megaterium</i>	Desconhecido
	<i>Propionibacterium acnes</i>	H60803 (2961351)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	M746665 MRSA – Resistente à metilina
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	CECT 423
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	53B
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741/Y00000

No decorrer deste trabalho, as bactérias foram cultivadas em meio LB (Difco TM), constituído por extrato de levedura 0.5 % (p/v), triptona 1 % (p/v), cloreto de sódio 1 % (p/v) e, as leveduras em meio YPD (Difco TM) que é composto por extrato de levedura 1 % (p/v), peptona 1 % (p/v) e glucose 2 % (p/v). Na preparação dos meios sólidos foi adicionado agar 2 % (p/v), designando-se os meios por LBA e YPDA, respetivamente.

As bactérias foram cultivadas em meio LBA durante 24 horas a 37 °C e as leveduras durante 48 horas a 30 °C, sendo depois mantidas a 4 °C.

Os inóculos das bactérias e leveduras foram preparados, respetivamente, em meio LB a 37 °C e 200 rpm e em meio YPD a 30 °C e 200 rpm, durante a noite. Após diluição em meio fresco para uma $D.O_{600} = 0.1$ (densidade ótica a 600 nm), as culturas foram novamente incubadas até uma $D.O_{600} = 0.4 - 0.6$, de forma a alcançar a fase exponencial.

2.5.2. Avaliação do potencial antimicrobiano

Para estudar o efeito das misturas de extratos etanólicos de própolis nos diferentes microrganismos, estas foram incorporadas no meio LBA e YPDA, em concentrações que variaram de 25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/ml, dependendo da mistura e da estirpe em análise. Após esterilização do meio, cada uma das misturas de extratos etanólicos estudada foi adicionada, tendo em conta as concentrações desejadas, e o meio foi de imediato vertido em placas de Petri.

A partir das culturas microbianas preparadas como descrito na secção anterior ($D.O_{600} = 0,4 - 0,6$) transferiram-se diretamente 5 µl de cada cultura microbiana, em triplicado, para placas contendo meio e as misturas de própolis nas concentrações apropriados. As placas foram incubadas 24 h a 37 °C no caso das bactérias e 48 h a 30 °C tratando-se de leveduras. Os valores de MIC foram obtidos para os diferentes microrganismos nas várias misturas e concentrações de própolis por observação de presença/ ausência de crescimento. Nas condições testadas, o valor de MIC foi considerado a menor concentração de cada mistura para a qual não se verificou crescimento. Para cada estirpe, os ensaios foram realizados na ausência de própolis e ainda na presença do solvente das misturas, o etanol, num volume equivalente ao volume máximo de mistura usado.

Os valores de MIC obtidos para as misturas de extratos etanólicos de própolis foram posteriormente comparados com os valores previamente registados para cada um dos P.EEs (Anexo I, Tabelas I.4 e I.5) e G.EEs (Anexo II, Tabelas II.4 e II.5).

2.6. Análise estatística

Todos os ensaios para determinação dos teores de polifenóis e flavonóides, assim como o ensaio de captura de radicais livres de DPPH foram analisados e os resultados apresentados na

forma de média±desvio padrão, a partir de um número variável de ensaios, sempre igual ou superior a três ($n \geq 3$).

Para a realização da análise estatística dos resultados foi utilizado o programa GraphPad Prism 5. As diferenças entre os resultados foram avaliadas usando a análise de variância (ANOVA) para comparar mais do que duas médias, e o teste Tukey para comparar todas as médias entre si. Foi ainda usada a análise t-test quando comparadas apenas duas médias. Quando os valores destes testes apresentam um valor de $P < 0,05$, indica que os resultados obtidos para as diferentes misturas de própolis apresentam diferenças estatisticamente significativas. Esta análise foi expressa através de um sistema de notação alfabética, sendo que duas misturas com a mesma letra não serão significativamente diferentes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Preparação de misturas de extratos etanólicos

O própolis é um produto natural relativamente escasso, mas ainda assim pode não ser esgotado nas aplicações a que se destina, ou ser retirado (algum) das colmeias mas não ser explorado na totalidade, restando sobras deste recurso apícola. Trabalhos do nosso grupo de investigação com várias amostras de própolis têm mostrado que o própolis mantém aparentemente o seu perfil bioativo, quer em extratos preparados anteriormente e conservados durante períodos de tempo relativamente alargados, quer em extratos preparados de fresco a partir de amostras conservadas ao longo de anos, independentemente da proveniência das amostras (Freitas, 2015; Oliveira, 2015; Araújo, 2017). Neste contexto, surgiu a ideia de realizar misturas com própolis recolhido em diferentes anos, ou mais precisamente misturas dos seus extratos, visando um total aproveitamento deste recurso natural, na perspetiva de aproveitar todos os recursos do apicultor.

Considerando ainda a diversidade de composição química do própolis, dependente da sua proveniência, e que, apesar do nosso país ser relativamente pequeno, há apicultores que têm apiários em diferentes localidades, pensou-se que a mistura de própolis de regiões diferentes poderá representar também uma solução para não só valorizar e rentabilizar este produto natural como também, eventualmente, contribuir para uma certa homogeneização do mesmo, esbatendo algumas diferenças encontradas nas amostras individuais e indo ao encontro de uma tão almejada padronização, que neste caso poderia dizer respeito a um própolis nacional, o própolis português.

Os objetivos elencados poderão ser conseguidos se as misturas mantiverem ou revelarem melhoria no seu perfil ou espetro de bioatividades. Para fazer a referidas misturas escolheu-se trabalhar com extratos etanólicos, dado ser reconhecido que este solvente é o que promove uma extração com maiores quantidades de compostos fenólicos, sendo que quanto maior a percentagem de etanol maior é a quantidade de flavonóides extraídos (Silva *et al.*, 2012; Santos-Buelga e González-Paramás, 2017). Os EEs escolhidos para este trabalho (Tabela 2) são bastante distintos (Freitas, 2015; Marques, 2015), provindo o própolis de localidades e apicultores diferentes. Os modos de produção e recolha são também diferentes para as duas amostras: enquanto um dos apicultores promove a produção de própolis através da colocação de grades e procede à sua recolha com os devidos cuidados, outro apicultor não tem qualquer intervenção na produção de própolis e procede à sua recolha por raspagem, aquando da limpeza das colmeias, havendo resíduos de outras substâncias da colmeia. Estes fatores promovem perfis bioativos

distintos, tornando-se interessante a sua utilização para averiguar se ocorre sinergismo ou perda de bioatividades quando se misturam tais EE.

Para a realização das misturas com os extratos etanólicos de própolis proveniente do apiário do Pereiro e colhido entre os anos de 2011 a 2015, a seleção dos extratos a usar teve em conta vários parâmetros, nomeadamente a atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana dos extratos das amostras individuais. Assim, procedeu-se à compilação e análise dos dados de trabalhos anteriores com os P.EEs, sistematizando toda a informação relativa aos parâmetros escolhidos. Em relação ao potencial antioxidante, analisaram-se os dados relativos aos teores de polifenóis totais e de flavonóides totais e ainda a capacidade de capturar radicais livres DPPH (Sousa, 2015; Barroso, 2017; Moreira, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017) (Anexo I, Tabelas I.1, I.2 e I.3). Através da análise destes dados constatou-se que P15.EE é o que apresenta uma atividade antioxidante mais forte e P14.EE uma atividade mais fraca. Relativamente à atividade antifúngica, e tendo em conta a análise dos valores de MIC obtidos em trabalhos anteriores contra várias espécies de *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*, entre outras leveduras (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017), P11.EE e P12.EE são os extratos mais e menos ativo, respetivamente (Anexo I, Tabela I.5). Na atividade antibacteriana foram tidos em conta os MIC contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre outras), averiguando-se ser P14.EE o mais ativo e P11.EE o menos ativo (Anexo I, Tabela I.4).

Na Tabela 7 são apresentados as diferentes misturas formadas com os P.EEs.

Tabela 7: Misturas preparadas com os P.EEs de diferentes anos tendo por base os extratos mais e menos ativos, assim como os de atividade intermédia, e obedecendo aos critérios previamente definidos para a formação das misturas ((ver ponto 2.1.2 Material e Métodos).

Misturas com extratos etanólicos de própolis do Pereiro
• mP _(11.EE+12.EE)
• mP _(11.EE+13.EE)
• mP _(11.EE+14.EE)
• mP _(12.EE+13.EE)
• mP _(13.EE+14.EE)
• mP _(13.EE+15.EE)
• mP _(14.EE+15.EE)
• mP _(11.EE - 13.EE)
• mP _(11.EE - 15.EE)

Em relação aos extratos originários do apiário do Gerês e colhidos entre os anos de 2011 a 2015 foram tidos em conta dois parâmetros, nomeadamente a atividade antioxidante e antimicrobiana. No potencial antioxidante foram tidos em conta os dados de trabalhos anteriores sobre a quantificação total dos polifenóis e a atividade de sequestro dos radicais livres (Freitas, 2015; Sousa, 2015; Gonçalves, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017), constatando-se ser G15.EE o mais bioativo e G13.EE o menos bioativo (Anexo II, Tabelas II.1, II.2 e II.3). Já na atividade antibacteriana e antifúngica, todos os G.EEs apresentaram exatamente o mesmo valor de MIC contra os diferentes microrganismos (Freitas, 2015), à exceção de G15.EE com valores de MIC mais baixos contra alguns dos microrganismos (Gonçalves, 2017). Não havendo um extrato que se destaque pela negativa neste contexto, G14.EE foi considerado o menos bioativo e G15.EE o mais bioativo (Anexo II, Tabelas II.4 e II.5).

Na Tabela 8 são apresentadas as diferentes misturas formadas com os G.EEs.

Tabela 8: Misturas preparadas com os G.EEs de diferentes anos tendo por base os extratos mais e menos ativos, assim como os de atividade intermédia, e obedecendo aos critérios previamente definidos para a formação das misturas (ver ponto 2.1.2 Material e Métodos).

Misturas com extratos etanólicos de própolis do Gerês
• $mG_{(11.EE+13.EE)}$
• $mG_{(11.EE+14.EE)}$
• $mG_{(11.EE+15.EE)}$
• $mG_{(13.EE+15.EE)}$
• $mG_{(14.EE+15.EE)}$
• $mG_{(11.EE - 13.EE)}$
• $mG_{(11.EE+12.EE+14.EE)}$
• $mG_{(11.EE - 15.EE)}$

Nas misturas com extratos etanólicos de própolis originário do apiário do Pereiro e própolis do apiário do Gerês, foram selecionados os P.EEs e G.EEs mais e menos ativos relativamente ao potencial antioxidante. Verificou-se assim que P15.EE e P14.EE são os extratos mais e menos bioativos (Anexo I, Tabelas I.1, I.2 e I.3), respetivamente, no que diz respeito ao própolis proveniente do apiário do Pereiro. Os G.EEs com maior e menor potencial antioxidante são respetivamente G15.EE e G13.EE (Anexo II, Tabelas II.1, II.2 e II.3). As misturas foram preparadas

a partir de EEs individuais juntando o extrato etanólico mais forte de um apiário com o mais fraco do apiário da outra localidade, culminando nas duas misturas: $m_{(P15.EE+G13.EE)}$ e $m_{(P14.EE+G15.EE)}$.

3.2. Misturas com extratos etanólicos de própolis com a mesma origem

3.2.1. Caracterização química

O própolis é uma substância resinosa constituída por uma mistura de material vegetal, o que lhe confere uma composição química diversificada. Esta variedade de compostos é responsável pelas suas atividades biológicas, nomeadamente a presença de uma vasta gama de flavonóides, compostos fenólicos, ácidos aromáticos e terpenos, por sua vez associados a um grande número de benefícios para a saúde (Zhang *et al.*, 2015; Afrouzan *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos possuem diversas atividades biológicas, em que se destaca a atividade antioxidante, responsável pela remoção de radicais livres, inibição da peroxidação e quelação de metais de transição, sendo por isso bem conhecidos por retardar o progresso de muitas doenças crónicas (Mitra e Uddin, 2014). A determinação dos teores de polifenóis e de flavonóides é importante em vários produtos alimentares e farmacêuticos, de forma a avaliar a sua qualidade e potencialidade. O método Folin-Ciocalteu e a coloração com $AlCl_3$, para determinar o conteúdo total de polifenóis e de flavonóides, respetivamente, são metodologias simples usadas atualmente (Kumazawa *et al.*, 2004; Calegari *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017b).

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado em todas as misturas usando ácido gálico como padrão. Os flavonóides, um dos maiores constituintes dos polifenóis, foram determinados por um método colorimétrico que se baseia na formação de um complexo flavonóide-alumínio, usando quercetina como padrão. Como se pode verificar nas Figuras 1 e 2, há misturas de P.EEs que se destacam. Nas várias misturas os valores de polifenóis variam entre 115,8 a 150,8 mg EAG/ g extrato (Apêndice A, Tabela A1) e os valores de flavonóides entre 65,2 a 101,6 mg EQ/ g extrato (Apêndice A, Tabela A2).

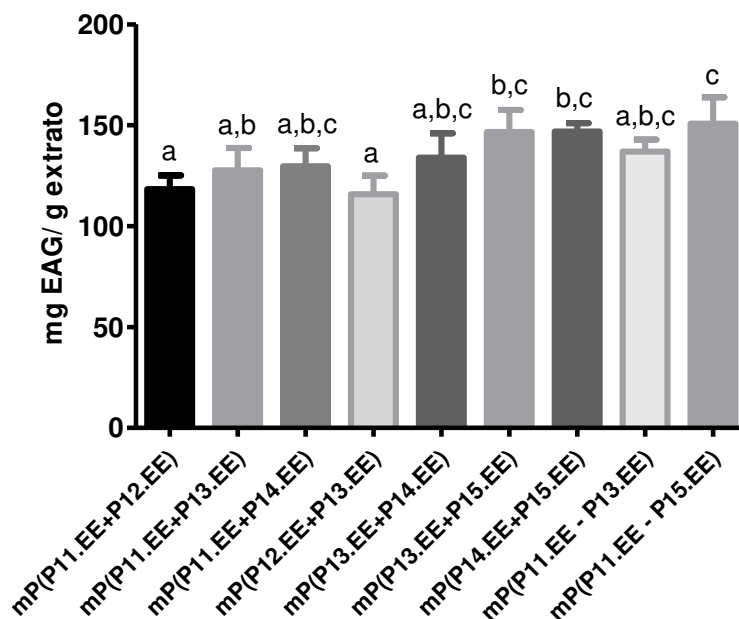


Figura 1: Teor de polifenóis totais das nove misturas de P.EEs expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

As misturas $mP_{(P11.EE+P12.EE)}$ e $mP_{(P12.EE+P13.EE)}$ são as amostras com menor quantidade de polifenóis, sendo estes teores significativamente diferentes dos apresentados pelas amostras $mP_{(P13.EE+P15.EE)}$, $mP_{(P14.EE+P15.EE)}$ e $mP_{(P11.EE - P15.EE)}$, que possuem teores superiores. Estas últimas três misturas contêm P15.EE, o extrato que apresenta o valor mais elevado de polifenóis ($151,5 \pm 6,9$ mg EAG/ g extrato). Os valores de polifenóis apresentados neste trabalho encontram-se entre os reportados na literatura, uma vez que estes variam de 31,2 e 299,0 mg EAG/ g extrato para própolis da Tailândia e China, respetivamente (Kumazawa *et al.*, 2004). Alves e Kubota (2013) indicam valores entre $70,60 \pm 0,24$ e $389,03 \pm 0,48$ mg EAG/ g extrato para extratos etanólicos de própolis de Santa Maria, uma outra amostra de extrato etanólico do Brasil apresenta valores de $120,0 \pm 3,5$ mg EAG/ g extrato (Choi *et al.*, 2006). Moreira *et al.* (2008) reporta valores de $151,0 \pm 0,01$ mg EAG/ g extrato para um extrato de própolis português recolhido na zona do Fundão, sendo este valor muito idêntico aos apresentados pelas misturas de P.EEs.

Na tabela 9 indicam-se os teores de polifenóis totais obtidos para 3 das misturas de P.EEs que ilustram resultados de tipos diferentes. Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura, também apresentados em Anexo I (Tabela I.1). P14.EE é o extrato que apresenta uma menor quantidade de polifenóis (98,0 mg EAG/ g extrato) mas, quando misturado com P15.EE (151,5 mg EAG/ g extrato), verifica-se que a mistura

$mP_{(P14.EE+P15.EE)}$ parece manter o valor mais elevado, ou seja, um valor de polifenóis próximo de 150 mg EAG/ g extrato, que é estatisticamente diferente do valor de P14.EE. Em misturas de duas amostras com quantidades diferentes de um constituinte, esperar-se-ia registrar uma média desse componente. No entanto, como este método avalia a atividade redutora dos polifenóis e não os quantifica, pode haver a ocorrência de sinergismo. Também na mistura $mP_{(P13.EE+P14.EE)}$ se verifica um aumento significativo na quantidade de polifenóis relativamente ao extrato P14.EE. Em $mP_{(P11.EE - P15.EE)}$, que contém todos os extratos do Pereiro de 2011 a 2015, é mantido o valor de P15.EE, sendo este significativamente diferente do valor apresentado pelos extratos P12.EE, P13.EE e P14.EE (Tabela 9). Nas restantes misturas (Apêndice A, Tabela A1) observam-se tendências semelhantes às descritas no que diz respeito aos teores de polifenóis totais.

Tabela 9: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), de três das misturas de P.EEs. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura (Moreira, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).)

Amostras	mg EAG/ g extrato
P13.EE	113,3 ± 8,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
$mP_{(P13.EE+P14.EE)}$	134,0 ± 12,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
P15.EE	151,5 ± 6,9
$mP_{(P14.EE+P15.EE)}$	146,9 ± 4,1
P11.EE	126,6 ± 12,1
P12.EE	109,6 ± 2,4
P13.EE	113,3 ± 8,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
P15.EE	151,5 ± 6,9
$mP_{(P11.EE - P15.EE)}$	150,8 ± 13,1

No teor de flavonóides totais a maioria das amostras são homogêneas, independentemente do teor de polifenóis, sendo que apenas as três misturas mais ativas ($mP_{(P13.EE+P15.EE)}$, $mP_{(P14.EE+P15.EE)}$ e $mP_{(P11.EE - P15.EE)}$) se revelaram significativamente diferentes e apresentaram um maior teor de flavonóides (Figura 2). Estas três misturas apresentam valores de flavonóides semelhantes à amostra de própolis do Uzbequistão ($94,2 \pm 6,8$ mg EQ/ g extrato), sendo que as restantes misturas têm valores superiores aos descritos para a amostra de própolis de África do Sul ($50,8 \pm 0,8$ mg EQ/ g extrato)(Kumazawa *et al.*, 2004).

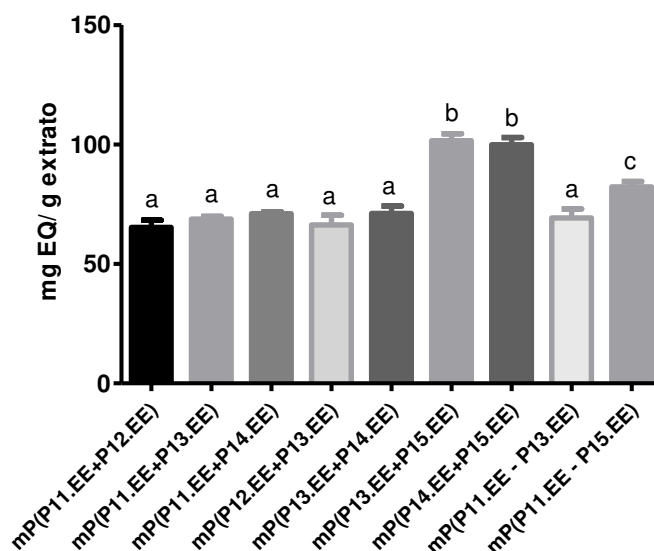


Figura 2: Teor de flavonóides das misturas dos P.EEs, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

A amostra $mP_{(P11.EE+P14.EE)}$ possui um teor de flavonóides superior aos das amostras individuais (Tabela 10), assim como se verifica para as restantes misturas que não possuem P15.EE e que apresentam valores próximos a 70 mg EQ/ g extrato (Apêndice A, Tabela A2). No entanto, quando as misturas possuem P15.EE (101,8 mg EQ/ g extrato), os valores de flavonóides são muito mais elevados, como é o caso de $mP_{(P14.EE+P15.EE)}$, em que P14.EE possui apenas 44,7 mg EQ/ g extrato, mas a mistura apresenta um valor de 99,9 mg EQ/ g extrato. Na tabela 10 indicam-se ainda os teores de flavonóides totais obtidos para uma outra mistura que ilustra outro tipo de resultado diferente: a mistura com os extratos de 2011 a 2015 exibe um teor superior e estatisticamente diferente do valor da maioria dos teores de cada P.EE, aparentemente devido à presença de P15.EE. Uma vez que este método avalia a formação de um complexo flavonóide-alumínio e não quantifica diretamente as moléculas de polifenóis, os resultados parecem sugerir a ocorrência de sinergismos já que os teores obtidos são normalmente superiores a um valor médio esperado num método de quantificação.

A legislação para os extratos de própolis, publicada no Brasil, exige que os extratos etanólicos de própolis devem conter pelo menos 0,25 % de flavonóides e 0,50 % de polifenóis em relação ao peso seco (Brazilian Ministry of Agriculture, 2000). As amostras analisadas demonstram elevadas quantidades de flavonóides, enquadrando-se nos valores descritos na literatura (Kumazawa *et al.*, 2004; Alves e Kubota, 2013), assim como cumpre os valores mínimos da

legislação publicada no Brasil. O própolis desta região possui compostos distintos do própolis europeu, devendo por isso ter também uma legislação distinta, no entanto ainda não existe uma legislação europeia/nacional nesta matéria.

Tabela 10: Teores de flavonóides de três das misturas com P.EEs, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura (Moreira, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).)

Amostras	mg EQ/ g extrato
P11.EE	58,3 ± 1,5
P14.EE	44,7 ± 12,0
mP_(P11.EE+P14.EE)	71,0 ± 0,7
P14.EE	44,7 ± 12,0
P15.EE	101,8 ± 4,2
mP_(P14.EE+P15.EE)	99,9 ± 3,0
P11.EE	58,3 ± 1,5
P12.EE	47,2 ± 6,3
P13.EE	54,5 ± 7,0
P14.EE	44,7 ± 12,0
P15.EE	101,8 ± 4,2
mP_(P11.EE - P15.EE)	82,3 ± 2,2

As misturas com extratos etanólicos de própolis do Gerês dos anos de 2011 a 2015 exibem diferenças significativas relativamente ao teor de polifenóis totais (Figura 3) e flavonóides (Figura 4), sendo que estas últimas são menos acentuadas. Os valores de polifenóis variam de 120,0 a 162,7 mg EAG/ g extrato (Apêndice B, Tabela B1). Mesmo sendo de localidades distintas, o que normalmente promove uma composição química diferente, as misturas com extratos de própolis do Gerês apresentam valores semelhantes às misturas com própolis do Pereiro, relativamente ao teor de polifenóis totais. A sua quantidade é idêntica ao própolis da Polónia, com 150,8 mg EAG/ g extrato (Czarny *et al.*, 2017) e geoprópolis produzido por *Melipona orbignyi*, com 121 mg EAG/ g extrato (Santos *et al.*, 2017b).

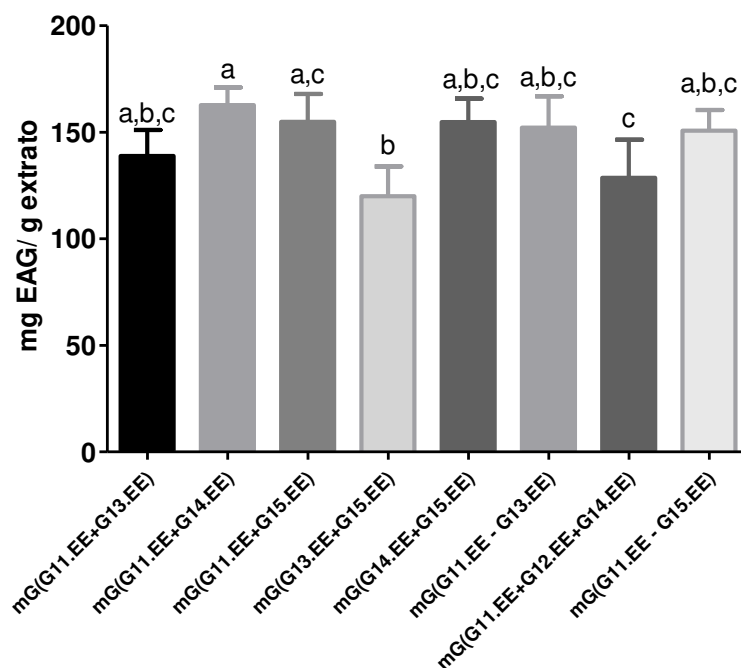


Figura 3: Teor de polifenóis totais das oito misturas de G.EEs, expressos em mg de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

Em algumas das misturas com G.EEs verificou-se um aumento do conteúdo de polifenóis relativamente ao extrato com maior teor, como na $mG_{(G11.EE+G14.EE)}$ com um valor de 162,7 mg EAG/ g extrato, superior aos valores de G11.EE (113,4 mg EAG/ g extrato) e G14.EE (92,2 mg EAG/ g extrato; Tabela 11). Na tabela 11 apresenta-se uma mistura em que pelo contrário se observa uma ligeira diminuição do teor de polifenóis totais relativamente ao extrato com um maior valor: misturando G13.EE (116,5 mg EAG/ g extrato) e G15.EE (175,8 mg EAG/ g extrato) obteve-se um teor de 120,0 mg EAG/ g extrato. Já quando misturamos todos os extratos de própolis do Gerês o teor de polifenóis totais é significativamente superior (150,7 mg EAG/ g extrato) ao da maioria das amostras individuais, exceto de G15.EE. Araújo (2017) demonstrou que uma mistura com extratos de própolis do Gerês manteve o teor de polifenóis idêntico ao da amostra mais concentrada, sendo uma das amostras mais fortes comparativamente às individuais. Assim, de um modo geral, as misturas estudadas mostram que juntar EEs de própolis colhidos em diferentes anos se traduz normalmente num aumento dos teores destes compostos, considerados os principais bioativos do própolis.

Tabela 11: Teores de polifenóis totais, de algumas das misturas com G.EEs, em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada G.EE constituinte da mistura (Gonçalves, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).)

Amostras	mg EAG/ g extrato
G11.EE	113,4 ± 14,3
G14.EE	92,2 ± 19,4
mG_(G11.EE+G14.EE)	162,7 ± 8,4
G13.EE	116,5 ± 5,6
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G13.EE+G15.EE)	120,0 ± 13,9
G11.EE	113,4 ± 14,3
G12.EE	125,1 ± 19,5
G13.EE	116,5 ± 5,6
G14.EE	92,2 ± 19,4
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G11.EE - G15.EE)	150,7 ± 9,7

O método colorimétrico para quantificação do teor de flavonóides identifica essencialmente flavonas e flavonóis como a quercetina, galangina e luteolina, sendo por isso um dos melhores métodos para quantificar o teor de flavonóides (Chang *et al.*, 2002). A quantificação de flavonóides totais para as misturas com extratos etanólicos de própolis do Gerês demonstra uma pequena variação entre todas as amostras (Figura 4), uma vez que o valor mais baixo é de 58,0 mg EQ/ g extrato e a mistura com maior quantidade de flavonóides apresenta 68,3 mg EQ/ g extrato (Apêndice B, Tabela B2).

Tal como se verificou para os polifenóis, também no conteúdo de flavonóides encontramos dois tipos de tendência nas misturas: uma diminuição ($mG_{(G11.EE+G15.EE)}$) ou um aumento ($mG_{(G11.EE - G13.EE)}$) desses teores nas misturas comparativamente ao G.EE individual com maior teor de flavonóides (Tabela 12). Na mistura com todos os extratos de própolis de 2011 a 2015 da região do Gerês verifica-se um valor de 60,9 mg EQ/ g extrato, que é superior aos extratos G11.EE e G12.EE e inferior a G15.EE, que é de 79,7 mg EQ/ g extrato. A literatura sobre misturas de própolis é praticamente inexistente, tornando impossível fazer comparações de resultados. No entanto, os valores enquadram-se nos publicados para amostras de própolis nacional como o própolis de Beja, Coimbra e Bragança (Silva *et al.*, 2012).

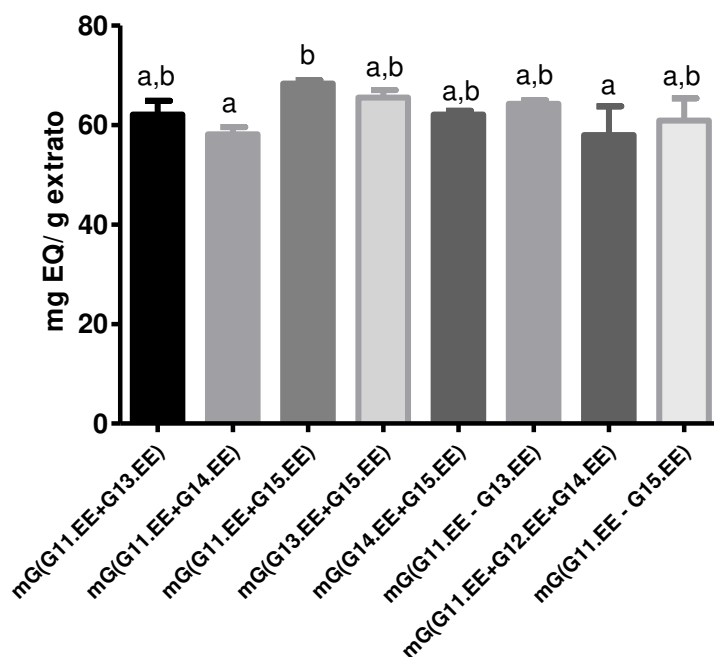


Figura 4: Teor de flavonóides, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/g extrato), das misturas com G.EEs (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

Tabela 12: Teores de flavonóides, em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, de algumas misturas com extratos do própolis do Gerês. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada G.EE constituinte da mistura (Gonçalves, 2017; C. Araújo, comunicação pessoal, 2017).)

Amostras	mg EQ / g extrato
G11.EE	42,1 ± 5,2
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G11.EE+G15.EE)	68,3 ± 0,7
G11.EE	42,1 ± 5,2
G12.EE	49,7 ± 3,0
G13.EE	57,4 ± 3,1
mG_(G11.EE - G13.EE)	64,3 ± 0,7
G11.EE	42,1 ± 5,2
G12.EE	49,7 ± 3,0
G13.EE	57,4 ± 3,1
G14.EE	58,6 ± 2,8
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G11.EE - G15.EE)	60,9 ± 4,5

Analisados os resultados podemos concluir que em nenhuma das misturas de própolis, quer com extratos do Pereiro quer com extratos do Gerês, se registam teores de compostos fenólicos ou de flavonóides inferiores ao valor médio esperado para uma mistura, sendo apenas visível por vezes uma diminuição relativamente ao valor do EE com maior concentração de polifenóis ou flavonóides. Em algumas misturas é inclusivamente registado um aumento desses teores, sendo este bem visível para os teores de flavonóides em grande parte das misturas com P.EEs. Assim, verifica-se que quando se mistura os extratos não ocorre o somatório de todos os compostos, mas mantém-se o valor da amostra que possui uma maior concentração do constituinte.

3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade das misturas à base de extratos etanólicos do Pereiro capturarem radicais livres de DPPH é apresentada na Figura 5. O ensaio de eliminação do radical livre DPPH é um método simples para avaliar a atividade antioxidante dos compostos (Kumazawa *et al.*, 2004). Atualmente é reconhecido que a remoção destes radicais pelos compostos fenólicos é devido à sua capacidade de doação de hidrogénios, ou seja, quanto maior o número de grupos OH^- nas estruturas dos compostos fenólicos, maior será essa capacidade, logo, maior a atividade de eliminação do radical DPPH (Chen e Ho, 1995; Tang *et al.*, 2002; Molyneux, 2004).

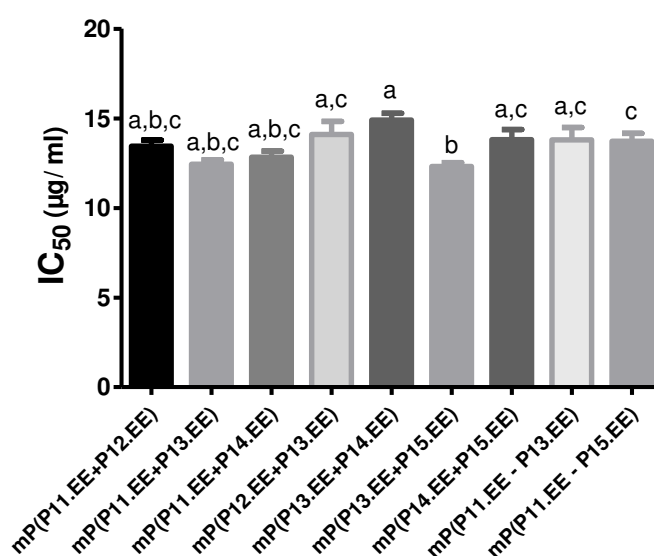


Figura 5: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas de P.EEs. O potencial antioxidante é apresentado em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

Os valores de IC_{50} das misturas com P.EEs são similares (Figura 5), sendo o valor mais elevado de 14,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o da amostra $mP_{(P13.EE+P14.EE)}$ e o mais baixo de 12,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pertencente à $mP_{(P13.EE+P15.EE)}$ (Apêndice A, Tabela A3). Tendo em conta os valores das amostras individuais, constata-se uma diminuição significativa do valor de IC_{50} quando misturados todos os extratos. Mas em qualquer outra das misturas verificou-se uma diminuição do valor de IC_{50} , sendo este ainda menor do que o exibido pelo extrato constituinte da mistura com o valor mais baixo, exceto no caso das misturas que possuem P15.EE (10,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Verifica-se ainda que a mistura com maior potencial antioxidante ($mP_{(P13.EE+P15.EE)}$) é também uma das misturas com maior teor de polifenóis totais e a que apresenta um maior teor de flavonóides. No entanto, também se verifica que a amostra com menor potencial antioxidante ($mP_{(P13.EE+P14.EE)}$) não é a que apresenta um menor teor de compostos fenólicos e flavonóides, apontando a intervenção de outros compostos nesta atividade biológica. Como explicito anteriormente, uma vez que este método se baseia na capacidade de os compostos doarem hidrogénios, este não é específico para os compostos fenólicos e/ou flavonóides, sendo por isso plausível a interferência de outros compostos neste tipo de análise.

Os valores de IC_{50} apresentados por estas misturas são inferiores aos descritos para amostras de própolis do Rio de Janeiro que variam de 30,65 a 56,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Salgueiro e Castro, 2016) assim como para o própolis da Tailândia que varia de 17,9 a 108,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Lu *et al.*, 2003).

Na figura 6, são apresentados os valores de IC_{50} para a captura de radicais livres de DPPH das misturas com G.EEs. Nestas, observa-se uma grande uniformidade, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre as diversas misturas. As misturas apresentam valores de IC_{50} entre 11,8 e 13,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Apêndice B, Tabela B3), sendo estes valores inferiores ao da amostra com menor valor de IC_{50} da mistura, indicando assim uma maior atividade antioxidante. As misturas potenciaram a capacidade antioxidante do própolis, assim como verificaram Özkök e Silici (2017) que quando misturaram produtos da colmeia com própolis, viram as suas características bioativas melhoradas. Isto demonstra o potencial do própolis para melhorar a capacidade antioxidante de outros produtos e, como verificado neste estudo, de melhorar o seu próprio potencial quando misturado com outro extrato, indicando um possível sinergismo entre os compostos.

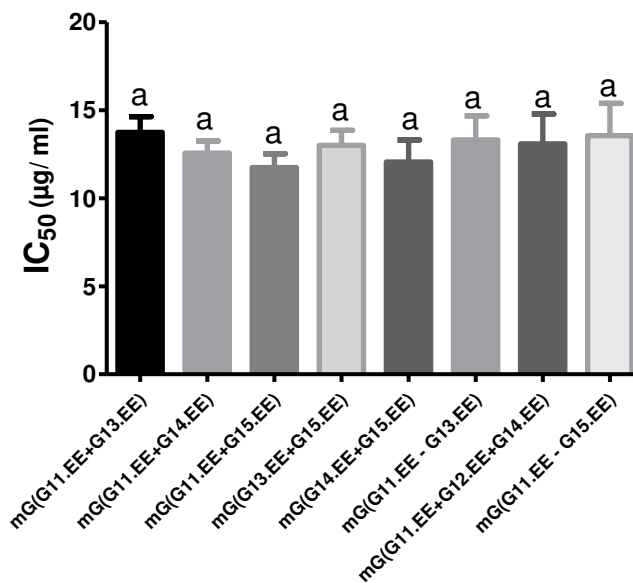


Figura 6: Potencial antioxidante das misturas com extratos etanólicos de própolis do Gerês. A capacidade de captura de radicais de DPPH foi expressa em valores de IC₅₀ (µg/ ml) (amostras significativamente diferentes, P<0,05, apresentam letras diferentes).

Os resultados do ensaio para avaliação da capacidade antioxidante nas misturas com extratos de própolis do Pereiro, ou do Gerês, sugerem algum tipo de sinergismo entre os compostos. Verifica-se uma diminuição dos valores de IC₅₀ em todas as misturas e os valores são semelhantes, embora uma das misturas com extratos do Pereiro (mP_(P13.EE+P15.EE) com um valor de 14,9 µg/ ml) tenha revelado menor potencial antioxidante enquanto uma das misturas com extratos do Gerês (mG_(G11.EE+G15.EE)) é a que exhibe maior capacidade antioxidante (11,8 µg/ ml).

Comparando os resultados obtidos neste ensaio com os resultados obtidos na caracterização química, concluímos que para além das influências destes compostos fenólicos na atividade antioxidante tem de haver a intervenção de outros compostos, pois o teor de polifenóis e de flavonóides não estão diretamente relacionados, assim como demonstrado por Miguel *et al.* (2010). Como se verificou anteriormente, as misturas com o G15.EE apresentaram um elevado teor de flavonóides relativamente às restantes misturas, no entanto, esse elevado teor de compostos não se manifesta expressivamente na atividade antioxidante, apresentando comportamento idêntico às restantes misturas. Contudo, existem estudos que comprovam a existência de uma correlação significativa entre a quantidade de flavonóides e a capacidade antioxidante, mas também demonstram que estes compostos não são os únicos responsáveis por esta atividade (Salgueiro e Castro, 2016). Flavonóides, como quercetina, flavonas, isoflavonas,

flavononas, antocianinas, catequina e isocatequina são uns dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante (Lu *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que para um bom controlo da qualidade do própolis é necessária a medição da atividade antioxidante, como descrito por alguns autores (Silva *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2010)

3.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, devido à aquisição de resistências e falta de alternativas ao nível de produtos antimicrobianos, tem havido um maior interesse na pesquisa de novos produtos contra agentes patogénicos. Entre os agentes patogénicos descritos como maiores causadores de infeções e que têm vindo a ganhar resistências estão *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Silva *et al.*, 2012). Neste contexto, muitos pesquisadores concentram-se em produtos naturais como fonte de novas moléculas bioativas. O própolis é um dos produtos naturais promissores com atividade antimicrobiana (Afrouzan *et al.*, 2018).

Na Tabela 13 são exibidas as propriedades antibacterianas de algumas das misturas de P.EEs que apresentam resultados de tipos diferentes, analisadas pelo método da diluição em agar. Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os teores de cada P.EE constituinte da mistura, também apresentados em Anexo I (Tabela I.4). Entretanto, uma vez determinados os valores de MIC para P15.EE, constatou-se ser um extrato com atividade antibacteriana intermédia. As diferentes misturas apresentam igual valor de MIC contra as diversas bactérias testadas, havendo apenas algumas exceções (Apêndice A, Tabela A4). Quando testadas em *Bacillus subtilis* todas as misturas apresentaram um valor de MIC de 200 µg/ ml, representando uma diminuição da mínima concentração inibitória relativamente a três dos EEs individuais (Tabela 13). *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* não crescem na presença de 500 µg/ ml de quase todas as misturas, com exceção de mP_(P11.EE+P13.EE) onde é necessária uma concentração de 750 µg/ ml para impedir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. De forma a combater a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, é necessária uma maior concentração de própolis: 1000 µg/ ml de mP_(P12.EE+P13.EE) e mP_(P13.EE+P15.EE), e superior a 1500 µg/ ml no caso de mP_(P14.EE+P15.EE). As restantes misturas têm um MIC de 1500 µg/ ml. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Silva *et al.* (2012)

para própolis português contra *S. aureus* (590 a 1720 µg/ ml) e menores do que os apresentados para *E. coli* (3190 µg/ ml).

Tabela 13 Atividade antibacteriana, expressa em valores de MIC (µg/ ml), das misturas com P.EEs. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada P.EE constituinte da mistura (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017).)

Amostras	Gram-positivas				Gram-negativa
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
P11.EE	500	—	>750	—	—
P13.EE	200	—	750	—	—
mP_(P11.EE+P13.EE)	200	500	750	1500	1500
P12.EE	500	—	500	—	>1000
P13.EE	200	—	750	—	—
mP_(P12.EE+P13.EE)	200	500	500	1000	1000
P13.EE	200	—	750	—	—
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
mP_(P13.EE+P15.EE)	200	500	500	1000	1000
P14.EE	100	—	500	—	—
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
mP_(P14.EE+P15.EE)	200	500	500	>1500	>1500

*— - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

A atividade antifúngica foi avaliada contra duas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, sendo que os valores de MIC variam entre 500 e 750 µg/ ml (Apêndice A, Tabela A5), sendo semelhante ao reportado por Tobaldini-Valerio *et al.* (2016). Nesta atividade, considerando os valores de MIC entretanto determinados para P15.EE, constatou-se ser este o extrato mais forte contra as duas leveduras (500 µg/ ml). Ainda que as misturas para esta atividade, quando considerado P15.EE, não sigam os critérios definidos, verifica-se no total das misturas a existência de mP_(P13.EE+P15.EE) e mP_(P12.EE+P13.EE) que correspondem aos critérios da atividade antifúngica: mais ativo com intermédio e menos ativo com intermédio. Assim para a atividade antifúngica não chegou a ser testada a mistura correspondente ao critério mais ativo com menos ativo. Para *S. cerevisiae*, de um modo geral, as misturas exibem o menor valor de MIC apresentado por um dos seus extratos, exceto no caso de mP_(P11.EE+P13.EE) em que o valor de MIC ainda é inferior (500 µg/ ml) ao menor valor exibido pelos extratos da mistura (750 µg/ ml). Já no caso *C. albicans* apenas a mP_(P13.EE+P15.EE) apresenta um valor de MIC de 500 µg/ ml, equivalente ao menor

valor encontrado nos extratos da mistura (Tabela 14). Vários autores (Silva *et al.*, 2012; Falcão *et al.*, 2014), têm verificado que amostras de própolis de Portugal têm sido mais ativas contra bactérias Gram-positivas do que contra leveduras, no entanto nas misturas com própolis do Pereiro, verifica-se que os valores de MIC variam de 200 a 500 µg/ ml (não incluindo a MRSA) para as bactérias Gram-positivas e de 500 a 750 µg/ ml para as leveduras.

Tabela 14: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de P.EEs, expressa em termos de valores de MIC (µg/ml). (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada P.EE constituinte da mistura (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017).)

Amostras	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
P11.EE	750	500
P13.EE	750	750
mP_(P11.EE+P13.EE)	500	750
P13.EE	750	750
P15.EE	500	500
mP_(P13.EE+P15.EE)	500	500
P11.EE	750	500
P12.EE	>1000	750
P13.EE	750	750
P14.EE	750	>750
P15.EE	500	500
mP_(P11.EE - P15.EE)	500	750

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.

As misturas com extratos da região do Gerês apresentam um valor de MIC muito baixo contra a bactéria *Bacillus subtilis*, de 25 µg/ ml para todas as misturas, este é também o valor da $mG_{(G11.EE - G15.EE)}$ para a bactéria *Bacillus cereus*. Para *Bacillus megaterium*, verificou-se um aumento do MIC relativamente às amostras individuais, obtendo-se o valor >100 µg/ ml. Este é também o valor de MIC para quase todas as misturas quando testadas contra a bactéria *Propionibacterium acnes*, sendo apenas o MIC de 100 µg/ ml para a $mG_{(G11.EE - G15.EE)}$ (Tabela 15). Para *Staphylococcus aureus* verificou-se o valor de MIC de >500 µg/ ml para a maioria das misturas, sendo este superior aos valores dos EEs, verificou-se também que duas misturas ($mG_{(G13.EE+G15.EE)}$ e $mG_{(G14.EE+G15.EE)}$) apresentam o valor do EE menos ativo (750 µg/ ml), há ainda a $mG_{(G11.EE+G15.EE)}$ com um valor de 200 µg/ ml, valor do EE mais ativo. Para as estirpes mais resistentes, MRSA e *Escherichia coli*, as misturas registaram valores de MIC de 1500 e 2000 µg/ ml, mas todas as misturas apresentam um melhor resultado do que o dos extratos individuais (Apêndice B, Tabela B4). Os valores de MIC

para a *E. coli* são um pouco mais elevados do que os descritos para amostras de própolis da Tailândia, que varia de 840 a 1670 µg/ ml (Runyoro *et al.*, 2017). Ainda assim, estas misturas de própolis apresentam um bom potencial antibacteriano, tendo em conta que os produtos naturais podem ser classificados como antimicrobianos quando apresentam um valor de MIC entre 100 e 1000 mg/ ml (Popova *et al.*, 2013).

Tabela 15: Valores de MIC (µg/ml) das misturas com G.EEs contra diversas bactérias. (Para facilidade de análise, incluem-se na tabela os valores de MIC de cada G.EE constituinte da mistura (Freitas, 2015; Gonçalves, 2017).)

Amostras	Gram-positivas						Gram-negativa
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G11.EE+G15.EE)	25	NR	NR	>100	200	1500	1500
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G14.EE+G15.EE)	25	NR	NR	>100	750	2000	2000
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G12.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G11.EE - G15.EE)	25	25	>100	100	>500	2000	2000

*NR – Não Realizado; — - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *B. cereus* – *Bacillus cereus*; *B. megaterium* – *Bacillus megaterium*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Relativamente à atividade antifúngica das misturas com extratos do Gerês de 2011 a 2015, verificou-se que todas as misturas apresentam o mesmo MIC, 1500 µg/ ml (Apêndice B, Tabela B5). Comparativamente às amostras individuais todas as misturas tiveram melhores resultados, exceto comparativamente a G15.EE que exibe um MIC de 1000 µg/ ml para *C. albicans*. As misturas de própolis com extratos do Gerês são muito ativas contra bactérias Gram-positivas e menos ativas contra bactérias Gram-negativas e leveduras, assim como o geoprópolis de *Melipona orbignyi* (Santos *et al.*, 2017b).

Está comprovado que a atividade antimicrobiana é afetada pelos compostos fenólicos, sendo maior esta atividade quanto maior o número de compostos, assim como verificaram Isla *et al.* (2005) em própolis da Argentina. Como se verificou anteriormente as misturas com extrato de

própolis da região do Pereiro apresentam uma maior concentração de compostos fenólicos, e apresentam, de forma geral, uma atividade antimicrobiana mais forte do que as misturas com extrato do Gerês. Verificando-se diferenças de atuação entre as misturas com extratos do Pereiro e do Gerês, no entanto, já foram estudados casos em que os locais de origem não influenciam a atividade antimicrobiana (Molnár *et al.*, 2017). As misturas com própolis da região do Gerês, assim como demonstrado por Freitas (2015) para os extratos individuais, são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que contra leveduras. Os flavonóides atuam de forma direta sobre as membranas de algumas bactérias, reduzindo a capacidade de permeabilidade e tornando-as mais frágeis (Velasquez e Gómez, 2017), verificando-se por isso uma maior resistência para combater as bactérias Gram-negativas, como é o caso da *E. coli*, devido à sua parede celular mais complexa. Em todas as misturas parece haver alguns casos de sinergismo e também alguns casos de antagonismo, no entanto, a maioria das misturas exibe o menor valor de MIC apresentado por algum dos EEs seu constituinte. Oliveira (2015) encontrou todas estas situações ao preparar misturas com dois extratos, exceto a perda do efeito antimicrobiano. Estas situações são indicadoras da diferente composição química dos extratos e da interação entre os compostos, podendo esta ser sinérgica, tornando a mistura mais ativa, ou antagónica (Krol *et al.*, 1993). Kedzia *et al.* (1990) reportam a complexidade do mecanismo da atividade antimicrobiana e pensam estar atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.

3.3. Misturas com extratos etanólicos de própolis de origens diferentes

3.3.1. Caracterização química

A quantificação do teor de polifenóis totais e flavonóides das misturas com extratos de própolis provenientes das duas regiões, Pereiro e Gerês, é exibida nas Figuras 7 e 8. Nestas duas misturas verifica-se não haver uma diferença significativa quanto ao teor de polifenóis, no entanto, no teor de flavonóides as diferenças na sua concentração já são significativas.

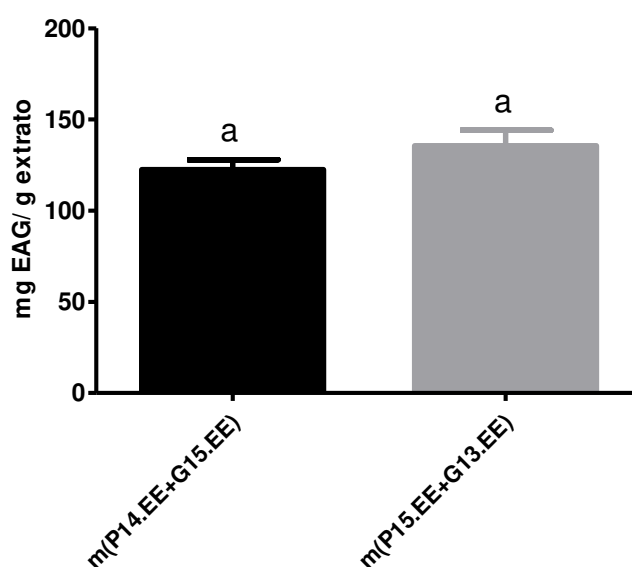


Figura 7: Caracterização química das duas misturas com extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês: determinação do teor de polifenóis totais (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

Em $m_{(P14.EE+G15.EE)}$ os extratos individuais apresentam teores de polifenóis de 98,0 e 175,8 mg EAG/g extrato, verificando-se uma média dos valores (122,5 mg EAG/ g extrato). A $m_{(P15.EE+G13.EE)}$ apresenta um teor de polifenóis de 135,5 mg EAG/ g extrato, sendo este superior ao do extrato G13.EE, 116,5 mg EAG/g extrato (Apêndice C, Tabela C1). Para as duas misturas verifica-se uma diminuição da concentração relativamente à amostra com o valor mais elevado, no entanto, esta diminuição é mais pronunciada na mistura $m_{(P14.EE+G15.EE)}$. As diferenças na composição química

entre amostras de regiões distintas foi demonstrada por Moreira *et al.* (2008) em extratos de Portugal com valores de polifenóis totais de 151 e 329 mg EAG/ g extrato, sendo um dos valores semelhante aos apresentados por estas misturas.

Para o teor de flavonóides os valores entre as duas misturas são mais distintos, 75,5 e 95,5 mg EQ/ g extrato (Figura 8), mas ambas mantêm o valor do extrato individual mais concentrado (Apêndice C, Tabela C2).

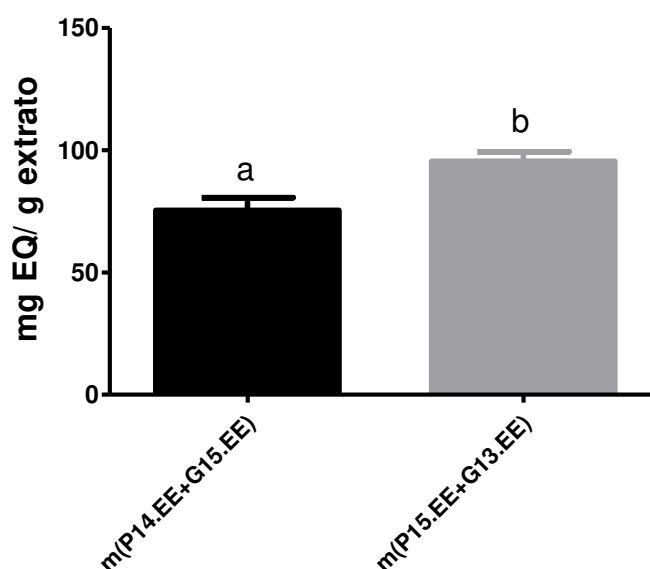


Figura 8: Caracterização química das duas misturas com extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês: determinação do teor de flavonóides totais (amostras significativamente diferentes, $P < 0,05$, apresentam letras diferentes).

As duas misturas registaram teores de flavonoides bastante distintos. Miguel *et al.* (2010) demonstraram que amostras da região do Algarve, mas de regiões distintas, apresentavam diferenças quantitativas nos seus compostos, assim como se verifica para as amostras de própolis do Gerês e Pereiro. No entanto, da análise desta caracterização química podemos inferir que, apesar dos extratos serem de localidades distintas e provavelmente possuírem diferentes compostos, mantém-se sempre o valor do EE individual mais concentrado. Esta última conclusão indica a possibilidade de aproveitar extratos de própolis com uma menor bioatividade, juntando a extratos com mais potencialidades e assim, mantendo fortes atividades biológicas e uma maior quantidade de própolis para aplicação na indústria alimentar ou farmacêutica.

3.3.2. Avaliação da atividade antioxidante

Na atividade antioxidante, avaliada pelo ensaio de captação de radicais livres de DPPH, as duas amostras apresentam o mesmo valor de IC_{50} , (15,4 e 15,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Apêndice C, Tabela C3). Estes valores são ligeiramente superiores aos apresentados pelas misturas de extratos de própolis com a mesma origem, no entanto, são inferiores aos exibidos pelos extratos individuais, com a exceção de P15.EE, verificando-se uma melhoria neste tipo de atividade antioxidante nas misturas. Esta não deve estar relacionada apenas com o teor de flavonóides, uma vez que estes apresentaram valores bem diferentes, concluindo-se assim uma interação de outros compostos na atividade antioxidante. Santos *et al.* (2017a) mostraram que uma fração de própolis sem compostos fenólicos apresentou uma atividade antioxidante insignificante, indicando que os compostos em falta são os responsáveis por esta atividade. Mais uma vez é demonstrado que a junção de extratos de regiões distintas e com diferenças na sua composição química é benéfico, pois não se verifica perda de atividade antioxidante, sendo um bom resultado que indica o excelente potencial das misturas.

3.3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana e antifúngica apresentada por estas duas misturas, $m_{(P14.EE+G15.EE)}$ e $m_{(P15.EE+G13.EE)}$, revela que não há perda de atividade relativamente aos extratos individuais (Apêndice C, Tabelas C4 e C5). Por exemplo, a mistura $m_{(P14.EE+G15.EE)}$, onde o extrato do Gerês é o mais ativo, apresenta um valor de MIC de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contra *B. subtilis*, igual ao do G15.EE, e a mistura $m_{(P15.EE+G13.EE)}$ apresenta um valor de MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que é um valor inferior ao do P15.EE e superior ao do G13.EE, mas igual ao das misturas com extratos de própolis do Pereiro. A mistura $m_{(P14.EE+G15.EE)}$, demonstra uma maior atividade antibacteriana, mas o extrato do Gerês é mais eficaz contra as bactérias do que contra as leveduras. Deste ensaio podemos também aferir que não são apenas os flavonóides os responsáveis por esta atividade, uma vez que a mistura $m_{(P15.EE+G13.EE)}$ é o que apresenta uma maior concentração de flavonóides, mas não é o que apresenta uma melhor atividade antimicrobiana. De forma genérica corrobora-se que a junção de extratos de regiões diferentes não promove a perda de atividade antimicrobiana, assim como demonstrado por Oliveira (2015).

4. Conclusão e Perspetivas futuras

O própolis é um produto natural com diversos constituintes e cada vez mais estudado para novas aplicações. No entanto, estudos com misturas de própolis e outros produtos ainda são muito escassos. Com a realização deste trabalho, confirma-se que o própolis é uma mistura complexa onde ocorrem interações entre os diferentes compostos que podem promover as suas bioatividades, assim como, na generalidade, não há perda de atividade quando se formam misturas contendo própolis de proveniências e/ou colheitas diferentes.

Os polifenóis, mais especificamente os flavonóides, são reportados como uns dos compostos responsáveis pela maioria das atividades biológicas (Afrouzan *et al.*, 2007; Mohammadzadeh *et al.*, 2007). Todas as misturas apresentam uma elevada concentração de flavonóides assim como uma boa atividade antioxidante e antimicrobiana, reforçando a ideia de que as suas misturas de própolis são igualmente ou até mais interessantes para aplicações relacionadas com estas atividades.

O efeito sinérgico entre os extratos pode ser devido a compostos diferentes terem ações sobre distintos alvos, promovendo um maior dano celular, ou pode haver interação entre os compostos, conduzindo à produção de espécies mais tóxicas. Um dos objetivos deste trabalho consistia em estudar se a mistura de diferentes amostras de própolis poderia alterar o seu perfil bioativo. Deste ensaio, inferimos que a mistura de extratos com menos potencial com extratos mais bioativos leva a amostras igualmente bioativas, não se verificando perda de potencial, pelo contrário, por vezes há ocorrência de sinergismo. De igual forma, verifica-se que as misturas com extratos de regiões distintas também mantêm as bioatividades. Assim como demonstrado anteriormente (Oliveira, 2015) a eficiência biológica global do extrato etanólico do Pereiro é superior à do extrato da região do Gerês. No entanto, quando se faz uma mistura entre extratos destas duas regiões, as diferenças a nível da atividade antioxidante e antimicrobiana são diluídas.

A realização deste trabalho confirmou as ótimas propriedades bioativas do própolis português e que pode ser feito um melhor aproveitamento, e ainda obter uma melhoria nas suas propriedades. Isto possibilita que haja uma maior quantidade de própolis para as diversas aplicações assim como junção a outros produtos de interesse. Uma dessas aplicações para o própolis seria a junção deste a outros alimentos de forma a aumentar as características nutritivas e impactos positivos na fisiologia e psicologia do organismo.

A realização deste estudo deixa ainda muitas perguntas por responder, sendo essencial dar continuidade a este trabalho. A formação de misturas demonstrou ter potencial para ser utilizado em diversas aplicações, no entanto, ainda não compreendemos a interação dos diferentes

compostos que promovem o sinergismo e/ou antagonismo. É também importante tentar perceber se o que ocorreu com os extratos estudados também irá ocorrer com outros extratos, ou se terão uma resposta diferente, assim como averiguar a resposta deste composto quando misturado com outros produtos. Tendo em conta estes problemas, continua a ser de suma importância padronizar o própolis.

5. Referências

- Acton, Claire (2008). Medihoney™ : a complete wound bed preparation product. *British Journal of Nursing*, 17(11), S44-S48.
- Afrouzan, H., Azar, T., Zakeri, S. e Ali, E. H. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iranian Biomedical Journal*, 22(1), 50-65.
- Afrouzan, H., Bankova, Vassya, Tahmasebi, G. H., Bigdeli, M. e Popova, M. (2007). Comparison of Gymnosperms and Angiosperms Plants on Quality and Quantity of Propolis. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 14(1).
- Agriculture, Brazilian Ministry of (2000). Normative instruction #11. 16-17 Official Diary of the Union.
- Alves, Elizângela e Kubota, Ernesto Hashime (2013). Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(1), 37-41.
- Anđelković, Boban, Vujisić, Ljubodrag, Vučković, Ivan, Tešević, Vele, Vajs, Vlatka e Gođevac, Dejan (2016). Metabolomics study of Populus type propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 135, 217-226.
- Araújo, Carina Sousa (2014), Extração, caracterização química e avaliação de propriedades antimicrobianas de amostras de própolis. Relatório de Projecto da Licenciatura em Biologia Aplicada. Universidade do Minho.
- Araújo, Carina Sousa (2017), Exploring the biomedical potential of portuguese propolis. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Aplicada. Universidade do Minho.
- Araujo, Juliana Matos e Carvalho, Manuella da Silva (2015). Fabricação de produto à base de própolis no combate à formação de biofilme microbiológico na indústria de alimentos. *GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias*, 5(1), 1674-1682.
- Bankova, Vassya (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 114-117.
- Bankova, Vassya (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2), 23-28.
- Bankova, Vassya, Bertelli, Davide, Borba, Renata, Conti, Bruno José, Silva Cunha, Ildenize Barbosa, Danert, Carolina, Eberlin, Marcos Nogueira, I Falcão, Soraia, Isla, Maria Inés, Moreno, Maria Inés Nieva, Papotti, Giulia, Popova, Milena, Santiago, Karina Basso, Salas, Ana, Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland, Schwab, Nicolas Vilczaki, Sforcin,

- José Maurício, Simone-Finstrom, Michael, Spivak, Marla, Trusheva, Boryana, Vilas-Boas, Miguel, Wilson, Michael e Zampini, Catiana (2016a). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 1-49.
- Bankova, Vassya, Christov, R., Popov, S., Pureb, O. e Bocari, G. (1994). Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 49(1-2), 6-10.
- Bankova, Vassya, de Castro, S. L. e Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, Vassya e Marcucci, Maria Cristina (2000). Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World*, 81(4), 182-188.
- Bankova, Vassya, Popova, Milena e Trusheva, Boryana (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1-28.
- Bankova, Vassya, Popova, Milena e Trusheva, Boryana (2016b). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1-11.
- Banskota, Arjun H., Tezuka, Yasuhiro e Kadota, Shigetoshi (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561-571.
- Barroso, Liliane Calçada (2017), Analysis of the effects of propolis extracts on DNA damage and mutagenicity. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Aplicada. Universidade do Minho.
- Beretta, Giangiacomo, Granata, Paola, Ferrero, Maria, Orioli, Marica e Maffei Facino, Roberto (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- Berretta, Andresa Aparecida, de Castro, Patrícia Alves, Cavalheiro, Amanda Henriques, Fortes, Vanessa Silveira, Bom, Vinícius Pedro, Nascimento, Andresa Piacezzi, Marquele-Oliveira, Franciane, Pedrazzi, Vinicius, Ramalho, Leandra Naira Zambelli e Goldman, Gustavo Henrique (2013). Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-18.
- Bielec, Beata, Wojtyczka, Robert D. e Bułdak, Rafał J. (2015). The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and me45 malignant melanoma cells in vitro conditions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(2), 203-212.

- Blois, Marsden S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Borba, Renata S., Wilson, Michael B. e Spivak, Marla (2017). Hidden benefits of honeybee propolis in hives. In *Beekeeping – From Science to Practice*, 17-38: Springer.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F. e Ialenti, A. (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73(1), S53-S63.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'avolio, A., Ozino, O. e Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2), 174-177.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363.
- Calegari, M. A., Prasniewski, A., SILVA, C. D., Sado, R. Y., Maia, F., Tonial, L. e Oldoni, T. L. (2017). Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(1), 45-55.
- Casaca, João Diogo (2010). *Manual de produção de pólen e própolis*. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.
- Castro, Patricia Alves de, Savoldi, Marcela, Bonatto, Diego, Barros, Mário Henrique, Goldman, Maria Helena S., Berretta, Andresa A. e Goldman, Gustavo Henrique (2011). Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 10(3), 398-411.
- Chang, Chia-Chi, Yang, Ming-Hua, Wen, Hwei-Mei e Chern, Jiing-Chuan (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Chang, Huasong, Wang, Yuehua, Yin, Xusheng, Liu, Xinying e Xuan, Hongzhan (2017). Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 471-480.
- Chen, Chung-Wen e Ho, Chi-Tang (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2(1), 35-46.

- Cheng, H., Qin, Z. H., Guo, X. F., Hu, X. S. e Wu, J. H. (2013). Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51(2), 813-822.
- Chirumbolo, Salvatore (2010). The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 9(4), 263-285.
- Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M. e Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Coelho, Joana Patrícia Mendes (2013), Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Dissertação de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais. Instituto Politécnico de Bragança.
- Corrêa, Wallace Ribeiro, López, Begoña Giménez-Cassina, Prado, Sheila Cristina do, Cunha, Ildenize Barbosa da Silva, Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland e Salvador, Marcos José (2016). ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Apicultural Research*, 55(1), 1-7.
- Czarny, Anna, Kulbacka, Julita, Nowakowska, Danuta, Gancarz, Roman e Wilk, Kazimiera A. (2017). Antimicrobial activity, cytotoxicity and total phenolic content of different extracts of propolis from the west pomeranian region in Poland. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 74(2), 715-722.
- Desamero, Mark Joseph M., Villablanca, Mikaela Angelica, Bariuan, Jussiaea V., Collantes, Therese Marie A., Gobonseng, Delia T. Ang, Ang, Mary Jasmin C., Fajardo Jr, Alejandro C., Cervancia, Cleofas R. e Estacio, Maria Amelita C. (2017). Honey and propolis abrogate neurologic deficit and neuronal damage in the hippocampus and cerebral cortex of ischemic stroke rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 10(1), 7-15.
- Dias, Luís G., Pereira, Ana Paula e Estevinho, Leticia M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4246-4253.

- Domingos, Aline Thamara de Sousa , Nóbrega, Monasses Marques e Silva, Rogério Alexandrino (2017). Biologia das abelhas *Apis Mellifera*: Uma revisão bibliográfica. *ACTA Apicola Brasilica*, 4(2), 8-12.
- Dornas, W. C., Oliveira, T. T., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F. e Nagem, T. J. (2009). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(3), 241-249.
- Elbaz, Nancy M., Khalil, Islam A., Abd-Rabou, Ahmed A. e El-Sherbiny, Ibrahim M. (2016). Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 254-269.
- Fabris, Sabrina, Bertelle, Mariangela, Astafyeva, Oxana, Gregoris, Elena, Zangrando, Roberta, Gambaro, Andrea, Lima, Giuseppina Pace Pereira e Stevanato, Roberto (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology & Pharmacy*, 4(1), 46-51.
- Falcão, Soraia I., Freire, Cristina e Vilas-Boas, Miguel (2013a). A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1729-1741.
- Falcão, Soraia I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M. e Vilas-Boas, M. (2013b). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, 24(4), 309-318.
- Falcão, Soraia I., Vale, Nuno, Cos, Paul, Gomes, Paula, Freire, Cristina, Maes, Louis e Vilas-Boas, Miguel (2014). In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. *Phytotherapy Research*, 28(3), 437-443.
- Falcão, Soraia I., Vilas-Boas, Miguel, Estevinho, Leticia M., Barros, Cristina, Domingues, Maria R. M. e Cardoso, Susana M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 887-897.
- Feás, Xesús, Pacheco, Lazaro, Iglesias, Antonio e Estevinho, Leticia M. (2014). Use of Propolis in the Sanitization of Lettuce. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12243-12257.

- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A. e Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Freitas, Ana Sofia Pereira (2015), Evaluation of bioactivities of a propolis sample (Gerês) of Portuguese origin. Dissertação de Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho.
- Frozza, Caroline Olivieri da Silva, Santos, Denis Amilton, Rufatto, Luciane Corbellini, Minetto, Luciane, Scariot, Fernando Joel, Echeverrigaray, Sergio, Pich, Claus Tröger, Moura, Sidnei, Padilha, Francine Ferreira, Borsuk, Sibeles, Savegnago, Lucielli, Collares, Tiago, Seixas, Fabiana Kömmling, Dellagostin, Odir, Roesch-Ely, Mariana e Henriques, João Antonio Pêgas (2017). Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 951-963.
- Funari, Cristiano S. e Ferro, Vicente O. (2006). Análise de propolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 171-178.
- George, Narelle May e Cutting, Keith F. (2007). Antibacterial honey (Medihoney™): in-vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multiresistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wounds*, 19(9), 231-236.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee World*, 60(2), 59-84.
- Gomes, Maria F. F., Ítavo, Camila C. B. F., Leal, Cássia R. B., Ítavo, Luís C. V. e Lunas, Resenângela C. (2016). Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(4), 279-282.
- Gonçalves, Raquel Batista (2017), Desenvolvimento de extratos de própolis português visando diferentes aplicações: o caso da aplicação oral. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- González-Martín, M. I., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M. e Betances Salcedo, E. V. (2017). Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. *Talanta*, 165, 533-539.
- Graikou, Konstantia, Popova, Milena, Gortzi, Olga, Bankova, Vassya e Chinou, Ioanna (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261-267.
- Guzmán, Eduardo Lozano e Cruz, Francisco Javier Moreno (2017). Combinations of Extracts of Propolis and Other Compounds Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In

- Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, 143-158 (Ed Hany A. El-Shemy). Rijeka: InTech.
- Hashimoto, Tetsuo, Aga, H., Tabuchi, A., Shibuya, T., Chaen, H., Fukuda, S. e Kurimoto, M. (1998). *Anti-Helicobacter pylori compounds in Brazilian propolis*.
- Heo, Ho Jin e Lee, Chang Yong (2004). Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7514-7517.
- Hu, Fuliang, Hepburn, H. R., Li, Yinghua, Chen, M., Radloff, S. E. e Daya, S. (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 276-283.
- Isla, Maria I., Paredes-Guzman, Julio F., Nieva-Moreno, M. I., Koo, H. e Park, Yong K. (2005). Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1166-1172.
- Jabir, Ferdous A. (2017). The local Propolis as protective and therapeutic modulator on some biochemical parameters in diabetic nephropathic rats. *AL-Qadisiyah Medical Journal*, 11(19), 137-146.
- Kasiotis, Konstantinos M., Anastasiadou, Pelagia, Papadopoulos, Antonis e Machera, Kyriaki (2017). Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. *PloS one*, 12(1), 1-27.
- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A. e Kubiliene, L. (2014). Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static GC-MS. *Open Chemistry*, 12(6), 736-746.
- Kedzia, B., Geppert, B. e Iwaszkiewicz, J. (1990). Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytothérapie*, 6, 7-10.
- Kim, Han Bit e Yoo, Byung Sun (2016). Propolis Inhibits Neurite Outgrowth in Differentiating SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Toxicological Research*, 32(3), 239-243.
- Kimoto, Tetsuo, Arai, Shigeyuki, Kohguchi, Michihiro, Aga, Miho, Nomura, Yutaka, Micallef, Mark J., Kurimoto, Masashi e Mito, Keiichiro (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention*, 22(6), 506-515.

- Koo, Michel Hyun e Park, Yong Kun (1997). Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(2), 367-369.
- Krol, W, Scheller, S, Shani, J, Pietsz, G e Czuba, Z (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus. *Arzneimittel-Forschung*, 43(5), 607-609.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. e Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235–240.
- Kumazawa, Shigenori, Hamasaka, Tomoko e Nakayama, Tsutomu (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329-339.
- Lamoureux, Anouck, Meharon, Martine, Durand, Anne-Louise, Darrigade, Anne-Sophie, Doutre, Marie-Sylvie e Milpied, Brigitte (2017). A first case of erythema multiforme-like contact dermatitis caused by propolis. *Contact Dermatitis*, 77(4), 263-264.
- Lapidot, Tair, Walker, Michael D. e Kanner, Joseph (2002). Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7220-7225.
- Lee, Mi-Sook, Kim, Young Han, Park, Wan-Soon, Ahn, Won Gyeong, Park, Ok Kyu, Kwon, Seung-Hae, Morita, Kyoji, Shim, Insop e Her, Song (2013). Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-10.
- Li, Y. J., Xuan, H. Z., Shou, Q. Y., Zhan, Z. G., Lu, X. e Hu, F. L. (2012). Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Human & Experimental Toxicology*, 31(2), 157–165.
- Liao, Hui-Fen, Chen, Yu-Ywan, Liu, Jun-Jen, Hsu, Ming-Ling, Shieh, Hui-Ju, Liao, Hung-Jen, Shieh, Chwen-Jen, Shiao, Ming-Shi e Chen, Yu-Jen (2003). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7907-7912.
- Lu, Li-Chang, Chen, Yue-Wen e Chou, Cheng-Chun (2003). Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(4), 277-282.

- Lustosa, Sarah R., Galindo, Alexandre B., Nunes, Lívio C. C., Randau, Karina P. e Neto, Pedro J. R. (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 447-454.
- Luz, Maria Natália Campos e Fraga, Edmir Geraldo de Siqueira (2017). Avaliação in vitro da Atividade Antimicrobiana de Própolis Vermelha Frente ao *Propionibacterium acnes*. *Mostra Científica da Farmácia*, 3(1), 1-5.
- Machado, A. V., Almeida, J. F. S., Dantas, E. A. , Castro, L. C. D. e Nunes, S. D. C. (2016). Tratamento da acne com o uso de ácido úsnico e própolis. *Fisioterapia Brasil*, 13(6), 414-418.
- Marques, Rita Alexandra Cardoso (2015), Contributos para a elucidação do modo de ação de própolis português: o caso do própolis do Pereiro. Dissertação de Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho.
- Mavric, Elvira, Wittmann, Silvia, Barth, Gerold e Henle, Thomas (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(4), 483-489.
- Menezes, H. (2005). Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(3), 405-411.
- Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. e Kadota, S. (2001). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, 12(6), 366-373.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Cruz, C., Duarte, J., Antunes, M. D., Cavaco, A. M. M., Mendes, D., Lima, A. S., Pedro, L. G., Barroso, J. G. e Figueiredo, A. C. (2013). Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and -untreated beehives maintained at Algarve (Portugal). *Natural Product Research*, 27(8), 743-749.
- Miguel, Maria Graça, Nunes, Susana, Dandlen, Susana Anahi, Cavaco, Ana Margarida e Antunes, Maria Dulce (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3418-3423.
- Mirzoeva, O. K. e Calder, P. C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55(6), 441-449.

- Mitra, K. e Uddin, N. (2014). Total phenolics, flavonoids, proanthocyanidins, ascorbic acid contents and in-vitro antioxidant activities of newly developed isolated soya protein. *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(5), 160-168.
- Mohamed, Mohamed, Abdou, Wafaa, Ismail, Tamer e Farouk, Sameh (2016). The ameliorative potential of ethanolic extract of propolis on hematotoxicity and structural neuronal damage in hyperthermia-exposed rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(8), 875-882.
- Mohammadzadeh, Shiva, Shariatpanahi, Mohammad, Hamedi, Manoochehr, Ahmadkhaniha, Reza, Samadi, Nasrin e Ostad, Seyed Nasser (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103(4), 1097-1103.
- Molnár, Szabolcs , Mikuska, Kata , Patonay, Katalin , Sisa, Krisztina , Daood, Hussein G. , Némedi, Erzsébet e Kiss, Attila (2017). Comparative studies on polyphenolic profile and antimicrobial activity of propolis samples selected from distinctive geographical areas of Hungary. *Food Science and Technology International*, 23(4), 349-357.
- Molyneux, Philip (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Morais, Williams Raphael De Souza, Silva, Jaceguai Soares, Silva, Carmem Lúcia De Paiva E. e Tonholo, Josealdo (2017). Estudo Prospectivo do uso da Própolis como Inibidor de Corrosão. *Cadernos de Prospecção*, 10(3), 615-625.
- Moreira, Ana Bárbara Silva (2017), Desenvolvimento de uma linha de cosmética à base de própolis português. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Moreira, Leandro, Dias, Luís G., Pereira, José Alberto e Estevinho, Leticia (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 3482-3485.
- Moreira, Leandro, Rogão, Mónica e Estevinho, Leticia M. (2011a). Efeitos terapêuticos do propólis. *O Apicultor*, 20(71), 25-32.
- Moreira, Leandro, Rogão, Mónica e Estevinho, Leticia M. (2011b). Propólis ao longo da história da humanidade. *O Apicultor*, 20(73), 21-24.
- Mouhoubi-Tafinine, Zina, Ouchemoukh, Salim e Tamendjari, Abderezak (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85-90.

- Nanaware, Sadhana, Shelar, Madhuri, Sinnathambi, Arulmozhi, Mahadik, K. R. e Lohidasan, Sathiyarayanan (2017). Neuroprotective effect of Indian propolis in β -amyloid induced memory deficit: Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 543-553.
- Natsir, Muh, Kurniawati, Desy e kurniasih, Yeti (2017). Study of the utilization of propolis local propolis from Konawe, Southeast Sulawesi, as preservative natural preservative for beef. In *AIP Conference Proceedings*, Vol. 1823, 020049: American Institute of Physics.
- Oliveira, Tânia Isabel Fernandes (2015), Efeitos tóxicos de amostras de própolis Português: potencial antioxidante e atividades biológicas de extratos e misturas. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Orsi, Ricardo de Oliveira, Sforcin, José Mauricio, Funari, Silvia Regina Cunha, Ary, Fernandes Junior e Bankova, Vassya (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella Typhi*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2), 108-112.
- Özkök, Duran e Silici, Sibel (2017). Antioxidant activities of honeybee products and their mixtures. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 201-206.
- Pardal, Paulo, Casalta, Fábio e Godinho, Joana (2014). Própolis: avaliação quantitativa da produção de própolis. *Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém (UIIPS)*, 2, 182-191.
- Pasupuleti, Visweswara Rao, Sammugam, Lakshmi, Ramesh, Nagesvari e Hua, Siew (2017). Honey, propolis and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 42.
- Pereira, Alberto dos Santos, Seixas, Fernando Rodrigues Mathias Silva e Neto, Francisco Radler de Aquino (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quimica Nova*, 25(2), 321-326.
- Pereira, Cassiano Spaziani, Matte, Willian Daróz e Venâncio, Pedro Henrique Bianchini (2016). Aplicação de extrato de própolis na agricultura. *Revista de Ciências Agroambientais*, 14(1), 143-156.
- Pereira, Hélder Ricardo Cardoso (2013), Genotoxic, phytotoxic and protective effects of Portuguese propolis. Dissertação de Mestrado de Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.

- Popova, Milena, Bankova, Vassya, Butovska, Daniela, Petkov, Valentin, Nikolova-Damyanova, Boryana, Sabatini, Anna Gloria, Marcazzan, Gian Luigi e Bogdanov, Stefan (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15(4), 235-240.
- Popova, Milena, Chen, Chia-Nan, Chen, Pen-Yuan, Huang, Chung-Yang e Bankova, Vassya (2010). A Validated Spectrophotometric Method for Quantification of Prenylated Flavanones in Pacific Propolis from Taiwan. *Phytochemical Analysis*, 21(2), 186-191.
- Popova, Milena, Dimitrova, Rosa, Al-Lawati, Hassan Talib, Tsvetkova, Iva, Najdenski, Hristo e Bankova, Vassya (2013). Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 158-166.
- Popravko, S. A., Gurevich, A. I. e Kolosov, M. N. (1969). Flavonoid components of propolis. *Chemistry of Natural Compounds*, 5(6), 397-401.
- Pristiwanto, Bambang, Soewondo, A., Sumitro, Sutiman B. e Rifa'i, Muhaimin (2017). Inhibition of toll-like receptor 3-4 with ethanolic extract of propolis on innate immunity in diabetes mellitus mice (*Mus musculus*). In *AIP Conference Proceedings*, Vol. 1844, 020008: AIP Publishing.
- Ramos, A. F. N. e Miranda, J. L. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697-710.
- Roberto, Matheus Mantuanelli, Jamal, Cláudia Masrouah, Malaspina, Osmar e Marin-Morales, Maria Aparecida (2016). Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and Molecular Biology*, 39(2), 257-269.
- Robson, Val, Dodd, Susanna e Thomas, Stephen (2009). Standardized antibacterial honey (Medihoney™) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *Journal of Advanced Nursing*, 65(3), 565-575.
- Runyoro, Deborah K. B., Ngassapa, Olipa D. e Kamugisha, Alex (2017). Antimicrobial Activity of Propolis from Tabora and Iringa Regions, Tanzania and Synergism with Gentamicin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(1), 171-176.
- Salatino, A., Weinstein Teixeira, W., Negri, G. e Message, D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33-38.

- Salgueiro, Fernanda B. e Castro, Rosane N. (2016). Comparison between chemical composition and antioxidant activity of different extracts of green propolis. *Quimica Nova*, 39(10), 1192-1199.
- Samadi, Nazli, Mozaffari-Khosravi, Hassan, Rahmanian, Masoud e Askarishahi, Mohsen (2017). Effects of bee propolis supplementation on glycemic control, lipid profile and insulin resistance indices in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind clinical trial. *Journal of Integrative Medicine*, 15(2), 124-134.
- Santos-Buelga, Celestino e González-Paramás, Ana M. (2017). Phenolic Composition of Propolis. In *Bee Products-Chemical and Biological Properties*, 99-111: Springer.
- Santos, C. R., Arcenio, F., Carvalho, E. S., Lúcio, E. M. R. A., Araújo, G. L., Teixeira, L. A., Sharapin, N. e Rocha, L. (2003). Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1), 71-74.
- Santos, Darlan C., David, Jorge Mauricio e David, Juceni Pereira (2017a). Chemical composition, cytotoxic activity and antioxidant of a propolis type from Bahia. *Quimica Nova*, 40(2), 171-175.
- Santos, Helder, Campos, Jaqueline, Santos, Cintia, Balestieri, José, Silva, Denise, Carollo, Carlos, de Picoli Souza, Kely, Estevinho, Leticia e Santos, Edson (2017b). Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 953-971.
- Sawaya, Alexandra C. H. F., Abdelnur, Patricia Verardi, Eberlin, Marcos N., Kumazawa, Shigenori, Ahn, Mok-Ryeon, Bang, Keuk-Seung, Nagaraja, Narayanappa, Bankova, Vassya S. e Afrouzan, Houshang (2010). Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 81(1-2), 100-108.
- Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D. e Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327-333.
- Seydi, Enayatollah, Hosseini, Sahar Amir, Salimi, Ahmad e Pourahmad, Jalal (2016). Propolis induce cytotoxicity on cancerous hepatocytes isolated from rat model of hepatocellular carcinoma: Involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting. *PharmaNutrition*, 4(4), 143-150.

- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*, 30(6), 894–905.
- Sforcin, J. M. e Bankova, Vassya (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.
- Siheri, Weam, Alenezi, Sameah, Tusiimire, Jonans e Watson, David G. (2017). The Chemical and Biological Properties of Propolis. In *Bee Products-Chemical and Biological Properties*, 137-178: Springer.
- Silva-Carvalho, Ricardo, Baltazar, Fátima e Almeida-Aguiar, Cristina (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-29.
- Silva-Carvalho, Ricardo, Miranda-Gonçalves, Vera, Ferreira, Ana Margarida, Cardoso, Susana M., Sobral, Abílio J. F. N., Almeida-Aguiar, Cristina e Baltazar, Fátima (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *Journal of Functional Foods*, 11, 160-171.
- Silva, João Carlos, Rodrigues, Sandra, Feás, Xesús e Estevinho, Leticia M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790-1795.
- Silva, Joaquim Fernando Mendes, Souza, Maria Clara, Matta, Samara Ramalho, Andrade, Marisol Ribeiro e Vidal, Flavia Vila Nova (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99(3), 431-435.
- Simone-Finstrom, Michael, Borba, Renata S., Wilson, Michael e Spivak, Marla (2017). Propolis counteracts some threats to honey bee health. *Insects*, 8(2), 46-66.
- Singleton, Vernon L., Orthofer, Rudolf e Lamuela-Raventós, Rosa M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sousa, José (2015), Avaliação da capacidade antioxidante de própolis de diversas origens geográficas: Comparação de métodos. Relatório de Projecto de Licenciatura.

- Takaisi-Kikuni, Ntongo B. e Schilcher, Heinz (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta medica*, 60(3), 222-227.
- Tang, S. Z., Kerry, J. P., Sheehan, D. e Buckley, D. J. (2002). Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry*, 76(1), 45-51.
- Tikhonov, A., Salo, D., Pryakhin, O. e Gritsenko, V. (1977). Standardization of propolis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 11.
- Tobaldini-Valerio, Flávia K., Bonfim-Mendonça, Patricia S., Rosseto, Helen C., Bruschi, Marcos L., Henriques, Mariana, Negri, Melyssa, Silva, Sonia e Svidzinski, Terezinha I. E. (2016). Propolis: a potential natural product to fight Candida species infections. *Future Microbiology*, 11(8), 1035-1046.
- Toreti, Viviane Cristina, Sato, Helia Harumi, Pastore, Glaucia Maria e Park, Yong Kun (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-13.
- Uzel, Ataç, Sorkun, Kadri`ye, Öncəğ, Özant, Çoğulu, Dilşah, Gençay, Ömür e Sali`h, Beki`r (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160(2), 189-195.
- Valença, Isabel, Morais-Santos, Filipa, Miranda-Gonçalves, Vera, Ferreira, Ana M., Almeida-Aguiar, Cristina e Baltazar, Fátima (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 184-192.
- Valenzuela-Barra, Gabriela, Castro, Consuelo, Figueroa, Catalina, Barriga, Andrés, Silva, Ximena, de las Heras, Beatriz, Hortelano, Sonsoles e Delporte, Carla (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44.
- Varanda, Eliana Ap., Monti, Rubens e Tavares, Denise C. (1999). Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 19(6), 403-413.
- Vargas, Agueda Castagna, Loguercio, Andrea Pinto, Witt, Niura Mazzini, Costa, Mateus Matiuzzi, Silva, Mariana Sá e Viana, Luciane Ribeiro (2004). Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34(1), 159-163.

- Varvara, Simona, Bostan, Roxana, Bobis, Otilia, Găină, Luiza, Popa, Florin, Mena, Vicente e Souto, Ricardo M. (2017). Propolis as a green corrosion inhibitor for bronze in weakly acidic solution. *Applied Surface Science*, 426, 1100-1112.
- Velasquez, Boris Daniel e Gómez, Sandra Patricia Montenegro (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 11.
- Walgrave, Susan E., Warshaw, Erin M. e Glesne, Lynn A. (2005). Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*, 16(4), 209-215.
- Wali, Adil F., Mushtaq, Ahlam, Rehman, Muneeb U., Akbar, Seema e Masoodi, Mubashir Hussain (2017). Bee Propolis (Bee's Glue): A Phytochemistry Review. *Journal of Critical Reviews*, 4(4), 9-13.
- Wallace, Alison, Eady, Sarah, Miles, Michelle, Martin, Harry, McLachlan, Andrew, Rodier, Maroussia, Willis, Jinny, Scott, Russell e Sutherland, Juliet (2010). Demonstrating the safety of manuka honey UMF® 20+ in a human clinical trial with healthy individuals. *British Journal of Nutrition*, 103(7), 1023-1028.
- Watanabe, Maria Angélica Ehara, Amarante, Marla Karine, Conti, Bruno José e Sforcin, José Maurício (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1378-1386.
- Woisky, Ricardo G. e Salatino, Antonio (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.
- Zabaiou, Nada, Fouache, Allan, Trousson, Amalia, Baron, Silvère, Zellagui, Amar, Lahouel, Mesbah e Lobaccaro, Jean-Marc A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, 214-222.
- Zhang, Jianglin, Cao, Xueping, Ping, Shun, Wang, Kai, Shi, Jinhu, Zhang, Cuiping, Zheng, Huoqing e Hu, Fuliang (2015). Comparisons of ethanol extracts of Chinese propolis (poplar type) and poplar gums based on the antioxidant activities and molecular mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15.

6. Anexos

Anexo I - Compilação da informação relativa à caracterização química e biológica os extratos etanólicos de própolis do Pereiro usados no presente trabalho

Caracterização química

Tabela I.1: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos individuais utilizados neste trabalho (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).

Extratos de própolis	mg EAG/ g extrato	Autores
P11.EE	126,6 ± 12,1	C. Araújo (comunicação pessoal, 2017)
P12.EE	109,6 ± 2,4	
P13.EE	113,3 ± 8,1	
P14.EE	98,0 ± 2,1	Moreira (2017)
P15.EE	151,5 ± 6,9	

*A negrito assinala-se o valor mais elevado e a cinza o valor mais baixo.

Tabela I.2: Teores de flavonóides dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro, dos anos de 2011 a 2015, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).

Extratos de própolis	mg EQ/ g extrato	Autores
P11.EE	58,3 ± 1,5	C. Araújo (comunicação pessoal, 2017)
P12.EE	47,2 ± 6,3	
P13.EE	54,5 ± 7,0	
P14.EE	44,7 ± 12,0	Moreira (2017)
P15.EE	101,8 ± 4,2	

*A negrito assinala-se o valor mais elevado e a cinza o valor mais baixo.

Avaliação de bioatividades

Tabela I.3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH, apresentado em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro (os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão).

Extratos de própolis	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Autores
P11.EE	14,7 \pm 2,7	
P12.EE	22,0 \pm 0,4	C. Araújo (comunicação pessoal, 2017)
P13.EE	15,2 \pm 2,3	
P14.EE	20,3 \pm 0,3	
P15.EE	10,3 \pm 1,7	Moreira (2017)

*A negrito assinala-se o valor do EE mais ativo e a cinza o valor do EE menos ativo.

Tabela I.4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) dos extratos de própolis do Pereiro contra bactérias.

EE	<i>B. subtilis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	Autores
P11.EE	500	—	>750	—	—	
P12.EE	500	—	500	—	>1000	Marques (2015) e Oliveira (2015)
P13.EE	200	—	750	—	—	
P14.EE	100	—	500	—	—	
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250	Moreira (2017)

*— - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Tabela I.5: Atividade antifúngica, expressa em valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro.

Extratos de própolis	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	Autores
P11.EE	750	500	
P12.EE	>1000	750	Marques (2015) e Oliveira (2015)
P13.EE	750	750	
P14.EE	750	>750	
P15.EE	500	500	Moreira (2017)

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.

Anexo II – Compilação da informação relativa à caracterização química e biológica dos extratos etanólicos de própolis do Gerês usados no presente trabalho

Caracterização química

Tabela II.1: Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos individuais utilizados neste trabalho (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).

Extratos de própolis	mg EAG/ g extrato	Autores
G11.EE	113,4 ± 14,3	C. Araújo (comunicação pessoal, 2017)
G12.EE	125,1 ± 19,5	
G13.EE	116,5 ± 5,6	
G14.EE	92,2 ± 19,4	Gonçalves (2017)
G15.EE	175,8 ± 17,0	

*A negrito assinala-se o valor mais elevado e a cinza o valor mais baixo.

Tabela II.2: Teores de flavonóides dos extratos etanólicos de própolis do Gerês, dos anos de 2011 a 2015, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato) (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).

Extratos de própolis	mg EQ/ g extrato	Autores
G11.EE	42,1 ± 5,2	C. Araújo (comunicação pessoal, 2017)
G12.EE	49,7 ± 3,0	
G13.EE	57,4 ± 3,1	
G14.EE	58,6 ± 2,8	Gonçalves (2017)
G15.EE	79,7 ± 9,6	

*A negrito assinala-se o valor mais elevado e a cinza o valor mais baixo.

Avaliação de bioatividades

Tabela II.3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH, apresentado em valores de IC₅₀ (µg/ ml), dos extratos etanólicos de própolis do Gerês (os valores são apresentados na forma de média±desvio padrão).

Extratos de própolis	IC ₅₀ (µg/ ml)	Autores
G11.EE	17,8 ± 0,8	Freitas (2015)
G12.EE	14,4 ± 0,6	
G13.EE	25,2 ± 2,5	
G14.EE	16,5 ± 0,8	Gonçalves (2017)
G15.EE	19,7 ± 8,8	

*A negrito assinala-se o valor do EE mais ativo e a cinza o valor do EE menos ativo.

Tabela II.4: Valores de MIC (µg/ ml) dos extratos de própolis do Gerês contra bactérias.

EE	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	Autores
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000	Freitas (2015)
G12.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000	
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000	
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000	
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250	Gonçalves (2017)

*— - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *B. cereus* – *Bacillus cereus*; *B. megaterium* – *Bacillus megaterium*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Tabela II.5: Atividade antifúngica, expressa em valores de MIC (µg/ ml), dos extratos etanólicos de própolis do Gerês.

Extratos de própolis	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	Autores
G11.EE	>2000	>2000	Freitas (2015)
G12.EE	>2000	>2000	
G13.EE	>2000	>2000	
G14.EE	>2000	>2000	
G15.EE	>1500	1000	Gonçalves (2017)

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.

7. Apêndices

Apêndice A – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Pereiro.

Tabela A1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Pereiro recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.1.

Amostras	mg EAG/ g extrato
P11.EE	126,6 ± 12,1
P12.EE	109,6 ± 2,4
mP_(P11.EE+P12.EE)	118,3 ± 6,8
P11.EE	126,6 ± 12,1
P13.EE	113,3 ± 8,1
mP_(P11.EE+P13.EE)	127,7 ± 11,0
P11.EE	126,6 ± 12,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
mP_(P11.EE+P14.EE)	129,6 ± 8,9
P12.EE	109,6 ± 2,4
P13.EE	113,3 ± 8,1
mP_(P12.EE+P13.EE)	115,8 ± 9,3
P13.EE	113,3 ± 8,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
mP_(P13.EE+P14.EE)	134,0 ± 12,1
P13.EE	113,3 ± 8,1
P15.EE	151,5 ± 6,9
mP_(P13.EE+P15.EE)	146,6 ± 11,0
P14.EE	98,0 ± 2,1
P15.EE	151,5 ± 6,9
mP_(P14.EE+P15.EE)	146,9 ± 4,1
P11.EE	126,6 ± 12,1
P12.EE	109,6 ± 2,4
P13.EE	113,3 ± 8,1
mP_(P11.EE - P13.EE)	136,9 ± 5,9
P11.EE	126,6 ± 12,1
P12.EE	109,6 ± 2,4
P13.EE	113,3 ± 8,1
P14.EE	98,0 ± 2,1
P15.EE	151,5 ± 6,9
mP_(P11.EE - P15.EE)	150,8 ± 13,1

Tabela A2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Pereiro recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.2.

Amostras	mg EQ/ g extrato
P11.EE	58,3 ± 1,5
P12.EE	47,2 ± 6,3
mP_(P11.EE+P12.EE)	65,2 ± 3,1
P11.EE	58,3 ± 1,5
P13.EE	54,5 ± 7,0
mP_(P11.EE+P13.EE)	68,8 ± 1,2
P11.EE	58,3 ± 1,5
P14.EE	44,7 ± 12,0
mP_(P11.EE+P14.EE)	71,0 ± 0,7
P12.EE	47,2 ± 6,3
P13.EE	54,5 ± 7,0
mP_(P12.EE+P13.EE)	66,3 ± 4,1
P13.EE	54,5 ± 7,0
P14.EE	44,7 ± 12,0
mP_(P13.EE+P14.EE)	71,1 ± 3,1
P13.EE	54,5 ± 7,0
P15.EE	101,8 ± 4,2
mP_(P13.EE+P15.EE)	101,6 ± 2,9
P14.EE	44,7 ± 12,0
P15.EE	101,8 ± 4,2
mP_(P14.EE+P15.EE)	99,9 ± 3,0
P11.EE	58,3 ± 1,5
P12.EE	47,2 ± 6,3
P13.EE	54,5 ± 7,0
mP_(P11.EE - P13.EE)	69,3 ± 3,8
P11.EE	58,3 ± 1,5
P12.EE	47,2 ± 6,3
P13.EE	54,5 ± 7,0
P14.EE	44,7 ± 12,0
P15.EE	101,8 ± 4,2
mP_(P11.EE - P15.EE)	82,3 ± 2,2

Tabela A3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Pereiro. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo estes exibidos na forma $\text{m\u00e9dia} \pm \text{desvio padr\u00e3o}$ de 3 ou mais r\u00e9plicas independentes. Para facilidade de an\u00e1lise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, j\u00e1 apresentados no Anexo I, Tabela I.3.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
P11.EE	$14,7 \pm 2,7$
P12.EE	$22,0 \pm 0,4$
mP_(P11.EE+P12.EE)	$13,5 \pm 0,3$
P11.EE	$14,7 \pm 2,7$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
mP_(P11.EE+P13.EE)	$12,5 \pm 0,2$
P11.EE	$14,7 \pm 2,7$
P14.EE	$20,3 \pm 0,3$
mP_(P11.EE+P14.EE)	$12,8 \pm 0,3$
P12.EE	$22,0 \pm 0,4$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
mP_(P12.EE+P13.EE)	$14,1 \pm 0,7$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
P14.EE	$20,3 \pm 0,3$
mP_(P13.EE+P14.EE)	$14,9 \pm 0,4$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
P15.EE	$10,3 \pm 1,7$
mP_(P13.EE+P15.EE)	$12,3 \pm 0,2$
P14.EE	$20,3 \pm 0,3$
P15.EE	$10,3 \pm 1,7$
mP_(P14.EE+P15.EE)	$13,8 \pm 0,6$
P11.EE	$14,7 \pm 2,7$
P12.EE	$22,0 \pm 0,4$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
mP_(P11.EE - P13.EE)	$13,8 \pm 0,7$
P11.EE	$14,7 \pm 2,7$
P12.EE	$22,0 \pm 0,4$
P13.EE	$15,2 \pm 2,3$
P14.EE	$20,3 \pm 0,3$
P15.EE	$10,3 \pm 1,7$
mP_(P11.EE - P15.EE)	$13,7 \pm 0,4$

Tabela A4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) das misturas de própolis da região do Pereiro contra bactérias *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Escherichia coli*. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.4.

Amostras	Gram-positivas				Gram-negativa
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
P11.EE	500	—	>750	—	—
P12.EE	500	—	500	—	>1000
mP_(P11.EE+P12.EE)	200	500	500	1500	1500
P11.EE	500	—	>750	—	—
P13.EE	200	—	750	—	—
mP_(P11.EE+P13.EE)	200	500	750	1500	1500
P11.EE	500	—	>750	—	—
P14.EE	100	—	500	—	—
mP_(P11.EE+P14.EE)	200	500	500	1500	1500
P12.EE	500	—	500	—	>1000
P13.EE	200	—	750	—	—
mP_(P12.EE+P13.EE)	200	500	500	1000	1000
P13.EE	200	—	750	—	—
P14.EE	100	—	500	—	—
mP_(P13.EE+P14.EE)	200	500	500	1500	1500
P13.EE	200	—	750	—	—
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
mP_(P13.EE+P15.EE)	200	500	500	1000	1000
P14.EE	100	—	500	—	—
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
mP_(P14.EE+P15.EE)	200	500	500	>1500	>1500
P11.EE	500	—	>750	—	—
P12.EE	500	—	500	—	>1000
P13.EE	200	—	750	—	—
mP_(P11.EE - P13.EE)	200	500	500	1500	1500
P11.EE	500	—	>750	—	—
P12.EE	500	—	500	—	>1000
P13.EE	200	—	750	—	—
P14.EE	100	—	500	—	—
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
mP_(P11.EE - P15.EE)	200	500	500	1500	1500

*— - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Tabela A5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Pereiro contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo I, Tabela I.5.

Amostras	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
P11.EE	750	500
P12.EE	>1000	750
mP_(P11.EE+P12.EE)	750	750
P11.EE	750	500
P13.EE	750	750
mP_(P11.EE+P13.EE)	500	750
P11.EE	750	500
P14.EE	750	>750
mP_(P11.EE+P14.EE)	750	750
P12.EE	>1000	750
P13.EE	750	750
mP_(P12.EE+P13.EE)	750	750
P13.EE	750	750
P14.EE	750	>750
mP_(P13.EE+P14.EE)	750	750
P13.EE	750	750
P15.EE	500	500
mP_(P13.EE+P15.EE)	500	500
P14.EE	750	>750
P15.EE	500	500
mP_(P14.EE+P15.EE)	500	750
P11.EE	750	500
P12.EE	>1000	750
P13.EE	750	750
mP_(P11.EE - P13.EE)	750	750
P11.EE	750	500
P12.EE	>1000	750
P13.EE	750	750
P14.EE	750	>750
P15.EE	500	500
mP_(P11.EE - P15.EE)	500	750

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.

Apêndice B – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Gerês.

Tabela B1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.1.

Amostras	mg EAG/ g extrato
G11.EE	113,4 ± 14,3
G13.EE	116,5 ± 5,6
mG_(G11.EE+G13.EE)	138,9 ± 12,2
G11.EE	113,4 ± 14,3
G14.EE	92,2 ± 19,4
mG_(G11.EE+G14.EE)	162,7 ± 8,4
G11.EE	113,4 ± 14,3
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G11.EE+G15.EE)	154,9 ± 13,1
G13.EE	116,5 ± 5,6
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G13.EE+G15.EE)	120,0 ± 13,9
G14.EE	92,2 ± 19,4
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G14.EE+G15.EE)	154,8 ± 11,1
G11.EE	113,4 ± 14,3
G12.EE	125,1 ± 19,5
G13.EE	116,5 ± 5,6
mG_(G11.EE - G13.EE)	152,2 ± 14,7
G11.EE	113,4 ± 14,3
G12.EE	125,1 ± 19,5
G14.EE	92,2 ± 19,4
mG_(G11.EE+G12.EE+G14.EE)	128,7 ± 17,8
G11.EE	113,4 ± 14,3
G12.EE	125,1 ± 19,5
G13.EE	116,5 ± 5,6
G14.EE	92,2 ± 19,4
G15.EE	175,8 ± 17,0
mG_(G11.EE - G15.EE)	150,7 ± 9,7

Tabela B2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.2.

Amostras	mg EQ/ g extrato
G11.EE	42,1 ± 5,2
G13.EE	57,4 ± 3,1
mG_(G11.EE+G13.EE)	62,1 ± 2,8
G11.EE	42,1 ± 5,2
G14.EE	58,6 ± 2,8
mG_(G11.EE+G14.EE)	58,2 ± 1,4
G11.EE	42,1 ± 5,2
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G11.EE+G15.EE)	68,3 ± 0,7
G13.EE	57,4 ± 3,1
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G13.EE+G15.EE)	65,5 ± 1,5
G14.EE	58,6 ± 2,8
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G14.EE+G15.EE)	62,1 ± 0,8
G11.EE	42,1 ± 5,2
G12.EE	49,7 ± 3,0
G13.EE	57,4 ± 3,1
mG_(G11.EE - G13.EE)	64,3 ± 0,7
G11.EE	42,1 ± 5,2
G12.EE	49,7 ± 3,0
G14.EE	58,6 ± 2,8
mG_(G11.EE+G12.EE+G14.EE)	58,0 ± 5,8
G11.EE	42,1 ± 5,2
G12.EE	49,7 ± 3,0
G13.EE	57,4 ± 3,1
G14.EE	58,6 ± 2,8
G15.EE	79,7 ± 9,6
mG_(G11.EE - G15.EE)	60,9 ± 4,5

Tabela B3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Gerês. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo estes exibidos na forma $\text{média} \pm \text{desvio padrão}$ de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.3.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G13.EE	$25,2 \pm 2,5$
$mG_{(G11.EE+G13.EE)}$	$13,7 \pm 0,9$
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G14.EE	$16,5 \pm 0,8$
$mG_{(G11.EE+G14.EE)}$	$12,6 \pm 0,7$
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G15.EE	$19,7 \pm 8,8$
$mG_{(G11.EE+G15.EE)}$	$11,8 \pm 0,8$
G13.EE	$25,2 \pm 2,5$
G15.EE	$19,7 \pm 8,8$
$mG_{(G13.EE+G15.EE)}$	$13,0 \pm 0,9$
G14.EE	$16,5 \pm 0,8$
G15.EE	$19,7 \pm 8,8$
$mG_{(G14.EE+G15.EE)}$	$12,1 \pm 1,3$
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G12.EE	$14,4 \pm 0,6$
G13.EE	$25,2 \pm 2,5$
$mG_{(G11.EE - G13.EE)}$	$13,3 \pm 1,4$
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G12.EE	$14,4 \pm 0,6$
G14.EE	$16,5 \pm 0,8$
$mG_{(G11.EE+G12.EE+G14.EE)}$	$13,1 \pm 1,7$
G11.EE	$17,8 \pm 0,8$
G12.EE	$14,4 \pm 0,6$
G13.EE	$25,2 \pm 2,5$
G14.EE	$16,5 \pm 0,8$
G15.EE	$19,7 \pm 8,8$
$mG_{(G11.EE - G15.EE)}$	$13,6 \pm 1,8$

Tabela B4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) das misturas de própolis da região do Gerês contra bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Escherichia coli*. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.4.

Amostras	Gram-positivas						Gram-negativa
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G13.EE)	25	NR	NR	>100	>500	1500	1500
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G14.EE)	25	NR	NR	>100	>500	1500	1500
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G11.EE+G15.EE)	25	NR	NR	>100	200	1500	1500
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G13.EE+G15.EE)	25	NR	NR	>100	750	1500	1500
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G14.EE+G15.EE)	25	NR	NR	>100	750	2000	2000
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G12.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
mG_(G11.EE - G13.EE)	25	NR	NR	>100	>500	1500	2000
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G12.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G12.EE+G14.EE)	25	NR	NR	>100	>500	1500	1500
G11.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G12.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G13.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G14.EE	50	50	50	—	200	>2000	>2000
G15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250
mG_(G11.EE - G15.EE)	25	25	>100	100	>500	2000	2000

*NR – Não Realizado; — - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *B. cereus* – *Bacillus cereus*; *B. megaterium* – *Bacillus megaterium*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Tabela B5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Gerês contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada G.EE constituinte da mistura, já apresentados no Anexo II, Tabela II.5.

Amostras	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
G11.EE	>2000	>2000
G13.EE	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G13.EE)	1500	1500
G11.EE	>2000	>2000
G14.EE	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G14.EE)	1500	1500
G11.EE	>2000	>2000
G15.EE	>1500	1000
mG_(G11.EE+G15.EE)	1500	1500
G13.EE	>2000	>2000
G15.EE	>1500	1000
mG_(G13.EE+G15.EE)	1500	1500
G14.EE	>2000	>2000
G15.EE	>1500	1000
mG_(G14.EE+G15.EE)	1500	1500
G11.EE	>2000	>2000
G12.EE	>2000	>2000
G13.EE	>2000	>2000
mG_(G11.EE - G13.EE)	1500	1500
G11.EE	>2000	>2000
G12.EE	>2000	>2000
G14.EE	>2000	>2000
mG_(G11.EE+G12.EE+G14.EE)	1500	1500
G11.EE	>2000	>2000
G12.EE	>2000	>2000
G13.EE	>2000	>2000
G14.EE	>2000	>2000
G15.EE	>1500	1000
mG_(G11.EE - G15.EE)	1500	1500

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.

Apêndice C – Caracterização química e biológica das misturas de extratos de própolis do Pereiro e do Gerês.

Tabela C1: Teores de polifenóis totais das misturas com extratos do própolis do Pereiro e do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.1 e II.1, respetivamente.

Amostras	mg EAG/ g extrato
P14.EE	98,0 ± 2,1
G15.EE	175,8 ± 17,0
m_(P14.EE+G15.EE)	122,5 ± 5,4
P15.EE	151,5 ± 6,9
G13.EE	116,5 ± 5,6
m_(P15.EE+G13.EE)	135,5 ± 8,6

Tabela C2: Teores de flavonóides das misturas com extratos do própolis do Pereiro e do Gerês recolhido nos anos de 2011 a 2015. Os valores encontram-se expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato, sendo estes apresentados na forma de média±desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.2 e II.2, respetivamente.

Amostras	mg EQ/ g extrato
P14.EE	44,7 ± 12,0
G15.EE	79,7 ± 9,6
m_(P14.EE+G15.EE)	75,5 ± 5,1
P15.EE	101,8 ± 4,2
G13.EE	57,4 ± 3,1
m_(P15.EE+G13.EE)	95,5 ± 3,9

Tabela C3: Capacidade de capturar radicais livres de DPPH das misturas com extratos de própolis do Pereiro e do Gerês. O potencial antioxidante foi expresso em valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo estes exibidos na forma média \pm desvio padrão de 3 ou mais réplicas independentes. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.3 e II.3, respetivamente.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
P14.EE	20,3 \pm 0,3
G15.EE	19,7 \pm 8,8
m_(P14.EE+G15.EE)	15,4 \pm 1,5
P15.EE	10,3 \pm 1,7
G13.EE	25,2 \pm 2,5
m_(P15.EE+G13.EE)	15,3 \pm 2,0

Tabela C4: Valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) das misturas de própolis da região do Pereiro e do Gerês contra bactérias *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Escherichia coli*. Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.4 e II.4, respetivamente.

Amostras	Gram-positivas				Gram-negativa
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>
P14.EE	100	—	500	—	—
G15.EE	50	50	>750	>1250	>1250
m_(P14.EE+G15.EE)	50	500	500	1000	1000
P15.EE	500	200	750	>1250	>1250
G13.EE	50	—	200	>2000	>2000
m_(P15.EE+G13.EE)	200	500	750	1000	1500

*— - Sem informação;

**B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *P. acnes* - *Propionibacterium acnes*; *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; *E. coli* - *Escherichia coli*.

Tabela C5: Atividade antifúngica das misturas de extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana foi expressa em termos de valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Para facilidade de análise, incluem-se valores obtidos para cada P.EE e G.EE constituinte da mistura, já apresentados nos Anexos I e II, Tabelas I.5 e II.5, respetivamente.

Amostras	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
P14.EE	750	>750
G15.EE	>1500	1000
m_(P14.EE+G15.EE)	1500	1000
P15.EE	500	500
G13.EE	>2000	>2000
m_(P15.EE+G13.EE)	1500	1500

**S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; *C. albicans* – *Candida albicans*.