

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ENDRIO MARTIN COSTA**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
MARROM**

**BAGÉ**

**2023**

ENDRIO MARTIN COSTA

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
MARROM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Engenharia de Alimentos da Uni-  
versidade Federal do Pampa.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caroline Costa Moraes  
Coorientador: MSc Luciano dos Santos Al-  
meida

BAGÉ

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

C837e Costa, Endrio  
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPO-  
LIS MARRON / Endrio Martin Costa. - Bagé, 2023-  
41p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação) - - Universidade Federal do  
Pampa, , 2023.

"Orientação: Profª Drª Caroline Costa Moraes "

I. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal do Pampa

**ENDRIO MARTIN COSTA**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
MARROM**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal do Pampa,  
como requisito parcial para  
obtenção do Título de Bacharel  
em Engenharia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 18 de julho de 2023.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Caroline Costa Moraes  
Orientador  
UNIPAMPA

---

Msc. Luciano dos Santos Almeida  
Coorientador  
UNIPAMPA

---

Profa. Dra. Catarina Motta de Moura  
UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **CATARINA MOTTA DE MOURA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/07/2023, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CAROLINE COSTA MORAES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/07/2023, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **LUCIANO DOS SANTOS ALMEIDA, Técnico de Laboratório Área - SL-BAGE**, em 27/07/2023, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1189673** e o código CRC **ABAF4545**.

Referência: Processo nº 23100.014263/2023-78 SEI nº 1189673

*Este trabalho é dedicado a minha persistência, que por algum motivo me aguenta.*

*“Few people have the wisdom to prefer  
the criticism that would do them good,  
to the praise that deceives them.”  
(François de La Rochefoucauld,  
Réflexions ou Sentences et Maximes Morales)*

## RESUMO

A própolis é composta por substâncias resinosas, balsâmicas e gomosas advindas de secreções de vegetais, possuindo diversas propriedades bioativas, das quais, destacam-se as propriedades antimicrobianas. Estas propriedades podem estar ligadas a fatores geográficos e sazonais, resultando em uma grande complexidade estrutural da própolis. Contudo, a própolis bruta não é ideal, pois pode apresentar impurezas indesejáveis e prejudiciais ao consumidor, necessitando a aplicação de técnicas para remoção de impurezas que viabilizam o emprego de suas propriedades, todavia, através de técnicas de purificação como a ultrafiltração, os compostos podem ainda atingir níveis mais satisfatórios. Tendo em vista isso, o presente trabalho teve como objetivo estudar diversos métodos de extração dos compostos bioativos da própolis e a purificação de seus constituintes de interesse com o emprego da ultrafiltração. A metodologia utilizada foi pela comparação de extratos aquosos obtidos por técnicas de banho metabólico e ultrassom, caracterização das propriedades antimicrobianas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total, além de aplicação de ultrafiltração e precipitação para purificação. Os extratos obtidos através de banho metabólico à 70 °C durante 60 minutos obtiveram os melhores resultados com de mg 6,28 GAE.g<sup>-1</sup> BS para compostos fenólicos totais e 30,65% para atividade antioxidante total, além de ser capaz de inibir a bactéria *Staphylococcus aureus*, porém não foi capaz de inibir a *Escherichia coli*, enquanto o extrato obtido através de ultrassom à temperatura ambiente durante 45 minutos obteve mg 0,94 GAE.g<sup>-1</sup> para compostos fenólicos totais e mg 4,42 para atividade antioxidante total, entretanto, não foi capaz de inibir ambos os microrganismos, por isso o extrato proveniente do banho metabólico foi adotado para a purificação. Quanto a purificação através de membranas, diversos tamanhos nominais foram utilizados (3kDa, 5kDa, 10kDa, 30kDa), sendo que obtiveram-se resultados para inibição do crescimento microbiano da bactéria gram negativa variando entre 25,2%, 62,4%, 34,9% e 45%, respectivamente, enquanto os resultados da inibição do crescimento da bactéria gram positiva variaram de 33,8%, 0%, 54,1% e 63,9%, respectivamente. A precipitação foi utilizada em faixas de saturação de 20%, 50% e 80%, com resultados de inibição do crescimento microbiano para bactéria gram negativa variando entre 14,43%, 45,12% e 58,87%, contudo para os resultados referentes a inibição do crescimento microbiano a bactéria gram positiva para as faixas de saturação de 20%, 50% e 80%, obteve-se resultados variando entre 32,60%, 43,76% e 40,43%.

**Palavras-chaves:** Própolis. Antimicrobianos. Extração Aquosa



## ABSTRACT

Propolis is composed of resinous, balsamic and gummy substances derived from plant from plant secretions, possessing several bioactive properties, of which, antimicrobial properties stand out. These properties may be linked to geographical and seasonal factors, resulting in seasonal factors, resulting in a great structural complexity of propolis. However, raw propolis is not ideal, as it may present undesirable impurities that are harmful to the consumer, requiring harmful to the consumer, requiring the application of techniques for the removal of impurities that enable the use of its properties, however, through purification techniques such as ultrafiltration, the compounds can still reach more satisfactory levels. In view of this, the present work aimed to to study various methods of extraction of bioactive compounds from propolis and the purification of its constituents of interest using ultrafiltration. A methodology used was the comparison of aqueous extracts obtained by metabolic bath and ultrasound techniques, characterization of the antimicrobial properties, phenolic compounds antimicrobial properties, total phenolic compounds and total antioxidant activity, as well as the application of ultrafiltration and precipitation for purification. The extracts obtained through metabolic bath at 70 °C for 60 minutes obtained the best results with mg 6.28 GAE.g<sup>-1</sup> BS for total phenolic compounds and 30.65% for total antioxidant activity, in addition to being able to inhibit the bacteria *Staphylococcus aureus*, but was not able to inhibit *Escherichia coli*, while the extract obtained through ultrasound at room temperature for 45 minutes obtained mg 0.94 GAE. g<sup>-1</sup> for total phenolic compounds and mg 4.42 for total antioxidant activity, however, it was not able to inhibit both microorganisms, so the extract from the metabolic bath was adopted for purification. As for purification through membranes, several nominal sizes were used (3kDa, 5kDa, 10kDa, 30kDa), and results were obtained for inhibition of microbial growth of gram-negative bacteria ranging from 25.2%, 62.4%, 34.9% and 45%, respectively, while the results of inhibition of growth of gram-positive bacteria ranged from 33.8%, 0%, 54.1% and 63.9%, respectively. Precipitation was used in saturation ranges of 20%, 50% and 80%, with results of inhibition of microbial growth for gram negative bacteria ranging from 14.43%, 45.12% and 58.87%, however for the results referring to the inhibition of microbial growth of gram positive bacteria for the saturation ranges of 20%, 50% and 80%, results ranging from 32.60%, 43.76% and 40.43% were obtained.

**Key-words:** Propolis. Antimicrobials. Aqueous extraction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Própolis marrom <i>in natura</i> . . . . .	17
FIGURA 2 – Própolis verde <i>in natura</i> . . . . .	17
FIGURA 3 – Própolis vermelha <i>in natura</i> . . . . .	18
FIGURA 4 – Representação esquemática das características dos processos de separação por membranas. . . . .	21
FIGURA 5 – Resultados da avaliação para compostos fenólicos totais para os dois métodos de extração testados. . . . .	27
FIGURA 6 – Resultados dos testes para atividade antioxidante total para diferentes métodos de extração. . . . .	28
FIGURA 7 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico com agitação para atividade antioxidante total. . . . .	29
FIGURA 8 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico com agitação para compostos fenólicos totais. . . . .	29
FIGURA 9 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico para atividade antimicrobiana para <i>E. Coli</i> (2). . . . .	30
FIGURA 10 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico para atividade antimicrobiana para <i>S. Aureus</i> (1). . . . .	31
FIGURA 11 – Resultados de inibição microbiana para <i>S. Aureus</i> (3) para diferentes membranas. . . . .	32
FIGURA 12 – Resultados de inibição microbiana para <i>E.Coli</i> (4) para diferentes membranas. . . . .	32
FIGURA 13 – Resultados de inibição microbiana para <i>S. Aureus</i> (3) para diferentes níveis de saturação . . . . .	33
FIGURA 14 – Resultados de inibição microbiana para <i>E.Coli</i> (4) para diferentes níveis de saturação. . . . .	34

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Ensaio de extração de compostos bioativos . . . . .	24
QUADRO 2 – Ensaio de extração utilizando banho metabólico com agitação .	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

**BS** Base Seca

**DPPH** 1,1-difenil-2-picri- Ihdrazil

**E. Coli** *Escherichia coli*

**GAE** Ácido galico

**RPM** Rotações por Minuto

**S. Aureus** *Staphylococcus aureus*

**TSB** Triptone Soy Broth

**UFC** Unidade Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL . . . . .	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS . . . . .	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> . . . . .	<b>16</b>
3.1	A NECESSIDADE DE ADITIVOS . . . . .	16
3.2	PRÓPOLIS . . . . .	16
3.2.1	Extração e caracterização dos compostos bioativos da própolis . . . . .	18
3.3	PURIFICAÇÃO DE BIOATIVOS . . . . .	20
3.3.1	Separação por membranas . . . . .	21
3.3.2	Precipitação . . . . .	22
3.4	PRÓPOLIS PURIFICADA . . . . .	22
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> . . . . .	<b>24</b>
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA . . . . .	24
4.2	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS . . . . .	24
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATOS OBTIDOS . . . . .	25
4.3.1	Compostos fenólicos totais . . . . .	25
4.3.2	Atividade antioxidante total . . . . .	25
4.3.3	Atividade Antimicrobiana . . . . .	25
4.4	PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO . . . . .	26
4.5	PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO . . . . .	26
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA . . . . .	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> . . . . .	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> . . . . .	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS</b> . . . . .	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> . . . . .	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos necessita usufruir de aditivos para garantir a qualidade e segurança dos produtos, porém os aditivos tendem a não serem vistos com bons olhos pelos consumidores. Por isso, há uma crescente demanda por compostos naturais que supram certas necessidades tecnológicas, como propriedades antimicrobianas. Entre as substâncias naturais com essas características, destaca-se a própolis (KRÖCKEL; JIRA; WILD, 2003).

A própolis é uma substância resinosa que possui a função de revestimento nas colmeias e apresenta acentuada ação antimicrobiana. Devido a diversos constituintes tornam sua composição química bastante complexa. Tais propriedades estão relacionadas com características geográficas do local inserido, tal como a espécie de abelhas que a produziram e variedades das flores, assim, as características podem variar consideravelmente devido a fatores como a sazonalidade (AGA *et al.*, 1994).

Além disso, a própolis apresenta propriedades sensoriais peculiares e constituintes que podem trazer aspectos interessantes quando agregados a produtos alimentícios na forma de aditivos ou ingredientes, porém o desafio é desenvolver técnicas que permitam o emprego da própolis e suas propriedades em concentrações elevadas, mas sem inviabilizar os processos devido à complexidade ou altos custos (PEREIRA, 2008).

A própolis vem sendo explorada durante séculos devido a suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes e anti-inflamatória. Estudos relatam que essas propriedades estão relacionadas ao grande potencial biológico da própolis referente a alguns de seus constituintes classificados como ácidos fenólicos, esterres, hidrocarbonetos, álcoois, flavonoides e derivados (MILOJKOVIĆ OPSENICA *et al.*, 2016).

A própolis bruta não é ideal para ser utilizada por indústrias alimentícias, pois podem conter impurezas prejudiciais, sendo necessários métodos de extração para viabilizar a utilização da própolis, reduzindo o teor de impurezas e permitindo a separação de substâncias de interesse, dependendo das condições da extração empregadas (POBIEGA *et al.*, 2019).

Algumas técnicas atreladas a biotecnologia permitem a purificação de substâncias com o intuito de concentrar as moléculas de interesse de determinados compostos de grande complexidade, através da utilização de processos como a ultrafiltração, na qual consiste em uma técnica onde a solução atravessa uma membrana semipermeável para que ocorra a retenção da maior parte das moléculas de interesse e remoção do solvente (LIMA, 2001).

Os compostos naturalmente presentes na própolis podem ser melhor empregados caso sejam submetidos a um processo de purificação, pois a maior parte dos flavonoides são originados de plantas, que apresentam resultados mais satisfatórios quando purificados, sendo as frações dos polifenóis melhores conservadas (UMTHONG *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista o exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo estudar diferentes métodos de extração de compostos bioativos da própolis marrom e purificá-los através das técnicas de ultrafiltração e precipitação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair compostos bioativos da própolis utilizando técnicas de banho metabólico e ultrassom;
- Purificar os extratos de própolis através do emprego de ultrafiltração e precipitação;
- Caracterizar os extratos brutos e purificados quanto à atividade antioxidante total e compostos fenólicos totais;
- Realizar a caracterização do potencial antimicrobiano de extratos brutos e purificados frente a uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma bactéria Gram negativa (*Escherichia coli*);
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos para os diferentes métodos de extrações



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A NECESSIDADE DE ADITIVOS

A indústria de alimentos necessita usufruir de aditivos para garantir a qualidade dos produtos, porém aditivos químicos podem representar um problema de segurança dos alimentos. Assim há uma constante busca por substâncias naturais, na qual são obtidas em grande parte das vezes de óleos essenciais ou extratos de plantas, podendo ser incorporadas nos alimentos ou adicionadas na composição de embalagens. Porém, é necessário que supram as exigências tecnológicas da indústria alimentícia, como possuírem capacidades de inibir ou retardar o crescimento de culturas microbianas que poderiam representar uma ameaça a integridade do alimento e conseqüentemente à saúde do consumidor (KRÖCKEL; JIRA; WILD, 2003; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Algumas substâncias foram descobertas totalmente ao acaso, apenas observando a atividade biológica de extratos de plantas frente a inúmeras doenças. Porém com o avanço da ciência, tornou-se mais comum a presença de métodos sistemáticos, sendo que as diversas substâncias isoladas começaram a passar por modificações em laboratório, assim focando em obter compostos com atividade biológica otimizada, maiores concentrações de determinados compostos bioativos e toxicidade mais branda (PICCIRILLO; AMARAL, 2018).

Algumas civilizações muito antigas, como a egípcia, já demonstravam impulso na busca por substâncias naturais com diversas propriedades bioativas para enfrentar os mais diversos males, como usar o ópio, com uma função hipnótica ou a beladona, como narcótico. Dentre as substâncias naturais usadas há muito tempo, destaque-se a própolis, pois existem relatos do seu uso desde meados de 300 a.C., pois apresenta grande poder bioativo, assim possuindo muitas propriedades terapêuticas, sendo estas bastante almejadas pelos antigos povos (ANDRÉ, 2013)

#### 3.2 PRÓPOLIS

Própolis é composta por substâncias resinosas, balsâmicas e gomosas produzidas por abelhas, sendo proveniente de secreções de vegetais frescos, podendo ser usada para diversas finalidades, principalmente como revestimento, protegendo contra calor, frio, insetos, vento, água e microrganismos (CHANG *et al.*, 2008). As características da própolis são afetadas diretamente por fatores geográficos e sazonais, pois os níveis de seus constituintes estão relacionados a fatores como região, clima, variedade das plantas, época do ano e espécie de abelha produtora, mas, no geral a

composição da própolis é aproximadamente 40- 50% balsâmicos, 20-30% cera, 5-10% óleos essenciais, 1-5% pólen e 5% em compostos orgânicos variados (AGA *et al.*, 1994; KIZILTAS; ERKAN, 2020). A Figura 1 ilustra a própolis marrom em sua forma bruta.

FIGURA 1 – Própolis marrom *in natura*



Fonte: Associação Brasileira de Estudos em Abelhas, 2021.

As condições climáticas brasileiras contribuem para uma grande riqueza da biodiversidade da flora, assim contribuindo para maior amplitude das atividades biológicas da própolis brasileira, na qual puderam ser classificados em 13 grupos distintos, associados a sua composição química e atividades biológicas, no entanto, só três tipos de própolis são identificadas quanto à origem botânica, sendo eles a própolis marrom, originada de diversas culturas de plantas, a própolis verde proveniente do arbusto alecrim-do-campo. A Figura 2 ilustra a própolis verde em sua forma bruta.

FIGURA 2 – Própolis verde *in natura*



Fonte: Emater MG, 2019.

A mais recente descoberta, a própolis vermelha, proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, na qual as abelhas coletam o exsudato vermelho

de cavidades no tronco de *Dalbergia ecastophyllum* causadas por insetos, assim originando a própolis vermelha (SILVA MENDONÇA *et al.*, 2021). A Figura 3 ilustra a própolis vermelha em sua forma bruta.

FIGURA 3 – Própolis vermelha *in natura*



Fonte: Revista do agronegócio, 2021.

A própolis há vários séculos é explorada pela humanidade, pois apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes e anti-inflamatórias, que diversos estudos indicam estarem relacionadas aos grandes potenciais biológicos de alguns de seus constituintes, classificados como ácidos fenólicos, ésteres, hidrocarbonetos, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, ácidos graxos, vitaminas, minerais, álcoois e flavonoides (BATISTA *et al.*, 2012).

### 3.2.1 Extração e caracterização dos compostos bioativos da própolis

A atividade bioativa desejável da própolis deve-se à presença de compostos como os flavonóides e seus derivados (incluindo flavonas, flavonóis, flavanonas e diidroflavonóis), além de compostos fenólicos. Dentre a ação bioativa, destacam-se a atividade antimicrobiana da própolis, que pode estar ligada a mecanismos distintos, seja causando danos nas estruturas e paredes das células, devido à presença dos ácidos benzóicos, cafeicos, cinâmicos e dos flavonóides, ou através da inibição da replicação dos microrganismos, nas quais compostos derivados de flavonoides como flavonona pinocebrina e flavonol galagina, além do éster feniletil, são responsáveis pela ação em cadeias de RNA-polimerase (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2006; MILOJKOVIĆ OPSENICA *et al.*, 2016; UZEL *et al.*, 2005).

Segundo os dados de (CABRAL, 2008) para determinação da atividade antioxidante de frações alcoólicas de extratos da própolis vermelha através de diversos

métodos, obteve-se que a fração contendo hexano apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres (74,4%) em relação a fração de Cloro, devido ao elevado potencial antioxidante dos constituintes presentes, pois a polaridade do substrato não possui influência no método de eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

(BITTENCOURT *et al.*, 2014) realizou estudos medindo a atividade antifúngica da própolis vermelha de Brejo Grande/Sergipe frente a *Candida albicans* através do método de difusão em disco e obteve um halo de inibição de  $13,18 \text{ mm} \pm 2,14$  em 600 g e a concentração fungicida mínima (CFM) foi 647,5 g/mL, pois apresenta níveis de flavonas e flavonóis em torno de 1,8%, sendo esse um dos fatores determinantes para atividade antimicrobiana.

O uso da própolis bruta não é viável, pois apresenta impurezas que podem ser indesejáveis e prejudiciais, dessa forma, faz-se necessário o emprego de certas técnicas que possam viabilizar seu uso, como a extração, que através da afinidade dos solventes, possibilita a separação do meio sólido de substâncias de interesse (POBIEGA *et al.*, 2019).

A eficiência do processo de extração pode ser aprimorada através de operações de redução de tamanho das partículas, como a moagem, assim garantindo maior eficácia nas reações químicas, pois a área de contato do material será maior, aumentando a cinética química. Além disso, a redução de tamanho das partículas possibilita que compostos de interesse entremeados em determinados meios possam ser extraídos com maior facilidade (TADINI, 2015).

A extração é uma operação unitária na qual geralmente ocorre entre dois meios, consistindo na remoção de espécies químicas baseadas na solubilidade. A extração sólido líquido decorre com a separação de um ou mais componentes de uma mistura sólida empregando um solvente líquido, sendo que o solvente responsável pela extração solubiliza a fração sólida, assim formando duas fases, a fase líquida contendo os constituintes de interesses que foram solubilizados e a fase sólida que contém as demais substâncias restantes, contudo, a filtração ainda pode vir a ser utilizada para garantir a separação dos diferentes meios (MATOS, 2015).

(POBIEGA *et al.*, 2019) salientam que os métodos clássicos de extração como a maceração, não são tão eficientes tendo em vista o avanço da tecnologia, pois há a necessidade de um grande tempo de processo ao empregar essa técnica e uso da agitação constante, sendo que técnicas mais eficazes podem melhorar as condições de extração como reduzir o tempo de processo, aumentar o rendimento e diminuir o consumo de solventes. É o caso de extrações assistidas por ultrassom e extrações por fluidos supercríticos.

A extração assistida por ultrassom caracteriza-se pela utilização de ondas mecânicas geradas por transdutores que geram mudanças na estrutura do material, ocasionando uma certa pressão que rompe a sua estrutura, liberando assim os compostos, dessa forma, aumentando a interação com o solvente, pois há aumento da superfície de contato (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

A extração por fluidos supercríticos ocorre com o material sendo envolto em um fluido com condições acima do ponto crítico de temperatura e pressão, através de um cilindro de base porosa, na qual não será possível distinguir entre as fases líquida e gasosa, assim ocorrendo a dissociação dos constituintes, ao fim do ciclo de extração, ocorre a transferência da solução para um separador, sendo que a pressão mantém-se abaixo do ponto crítico, dessa forma, o fluido usado na extração atinge o estado gasoso e o soluto pode ser recuperado (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

As extrações etanólicas dos compostos da própolis são as mais exploradas de diversas formas, embora a extração à base de água possua algumas características interessantes que dificilmente são estudadas, pois os compostos provenientes da extração aquosa possuem maior ação antioxidante, atividade inibitória de certas enzimas quando comparadas as extrações etanólicas (LIMA *et al.*, 2014).

Extratos de própolis alcoólicos e aquosos são utilizados para diversos propósitos entre aditivos e ingredientes para alimentos, fármacos, cosméticos, entre outros. Porém ainda existem várias incógnitas acerca de suas capacidades, devido à sua complexidade estrutural, que dificultam o emprego da própolis em determinados setores, sendo necessário desenvolver técnicas que possibilitem o uso das características peculiares da própolis, através de extratos com concentrações elevadas de compostos, mas que ainda sejam viáveis para aplicação em grandes escalas, nas quais processos complexos e altos custo tendem a serem impraticáveis (KIZILTAS; ERKAN, 2020; PEREIRA, 2008).

### 3.3 PURIFICAÇÃO DE BIOATIVOS

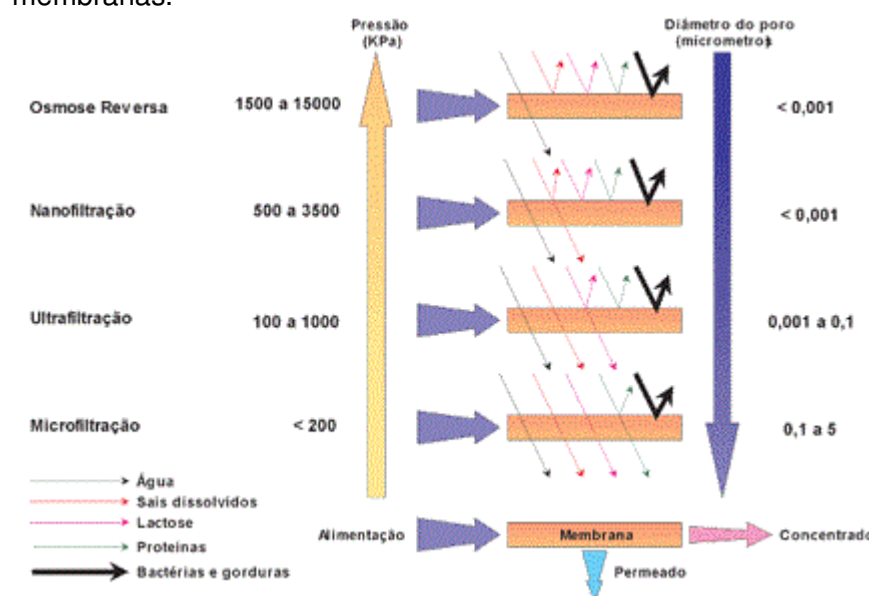
A purificação consiste em isolar uma ou várias moléculas alvo inseridas em um meio complexo. A identificação dos fatores envolvidos no processo de purificação é crucial, conhecendo a aplicação final da molécula alvo, suas características físico-químicas, bem como de suas impurezas, além da correta tomada de decisões sobre as técnicas empregadas, pois a aplicação de técnicas mais sucintas ajudarão a diminuir tempo de processos e custos. Embora não exista processos de purificação de aplicação geral, existem quatro etapas comuns a maioria dos processos de purificação, sendo eles: remoção de insolúveis, extração da molécula alvo ou purificação, purificação e polimento (STEFFENS; BACKES; VALDUGA, 2014).

### 3.3.1 Separação por membranas

Entre os métodos mais comuns de purificação, destaca-se o uso de membranas, na qual, consiste em uma solução sendo filtrada através de uma membrana semipermeável para que ocorra a retenção de grande parte das moléculas de interesse e remoção do solvente, sendo que para o transporte de uma determinada substância pela membrana é necessário haver a ação de uma força motriz. A forma da membrana é determinante para os principais parâmetros responsáveis pela sua capacidade seletiva, pois dessa forma processos que usam membranas porosas, possuem a sua capacidade seletiva ligada ao tamanho das partículas e o tamanho dos poros da membrana, como ocorre em processos de microfiltração, nanofiltração, diálise e ultrafiltração (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

O desenvolvimento de técnicas de separação por membranas possui um espaço vital em tecnologias industriais de diversos setores, sendo empregado em alguns ramos como o farmacêutico, bioquímico e de alimentos, onde possibilita o fracionamento de misturas sensíveis a altas temperaturas. Algumas vantagens dos processos de separação por membranas incluem economia de energia, seletividade, separação de compostos termolábeis e simplicidade de operação e escalonamento (KILIKIAN; PESSOA JR, 2001). A figura 4 esquematiza características de diferentes processos de separação por membranas.

FIGURA 4 – Representação esquemática das características dos processos de separação por membranas.



Fonte:(HESPANHOL; MIERZWA, 2005).

A nanofiltração é um método de separação com membranas, sendo o intermédio entre osmose inversa e ultrafiltração, normalmente usada na separação de solutos

orgânicos que possuem baixo peso molecular e na remoção de sais polivalentes em processos de desmineralização parcial de correntes líquidas (STREIT, 2011).

A microfiltração é um processo de separação com membranas bastante semelhante a filtração clássica, utilizando poros entre 100 e 10000 nm, na qual, possui indicação de uso para retenção de materiais em suspensão e emulsão. Por possuírem os poros relativamente abertos, a pressão exercida como força motriz não necessita ser muito elevada (TRINDADE, 2010).

A ultrafiltração é uma técnica de purificação na qual a substância passa por uma membrana semipermeável através de uma força exercida por centrifugação ou pressão, onde ocorrerá a retenção da maior parte das moléculas de interesse e remoção do solvente, sendo que na maioria das vezes o tamanho dos poros é determinado pelo peso molecular retido, sendo o mínimo de peso molecular de uma partícula que não passará pela membrana (LIMA, 2001).

Através da ultrafiltração é possível realizar o fracionamento/concentração de extratos naturais retirados de plantas, como o extraído da casca de *E.globulus* que possui grande quantidades de compostos, dessa forma também é possível testar esse método em contrapartida aos métodos tradicionais de separação, pois apresenta vantagens como economia de energia, especificidade, além de contribuir para a perspectiva da engenharia sustentável (BAPTISTA, 2013).

### 3.3.2 Precipitação

A precipitação consiste em uma técnica onde ocorre a perturbação de solução proteica, ocasionando em partículas insolúveis de proteínas. A precipitação pode ocorrer através do aumento da concentração de sais (salting-out) ou diminuição da concentração de sais (salting-in) (SCOPES, 1993).

## 3.4 PRÓPOLIS PURIFICADA

Há um enorme interesse em aprimorar as técnicas de extração aquosa de compostos da própolis para obter a mesma qualidade obtida através de extração alcoólica, assim processos de purificação por meio da nanofiltração foram realizados com o objetivo de obter maiores concentrações de flavonoides e compostos fenólicos através de extratos que originalmente não apresentavam níveis muito satisfatórios destes compostos na forma natural (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010).

De acordo com os dados de (CABRAL, 2008), o fracionamento da própolis vermelha em porções hexânica e clorofórmio através de seu extrato alcoólico possibilitou alguns testes de atividade antimicrobiana. Sendo realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), frente a bactérias

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*. A fração com melhores resultados foi purificada e submetida ao isolamento dos compostos através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), na qual, dois compostos foram destacados como os mais determinantes em atividades antimicrobiana e identificados por técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo eles uma isoflavona e uma chalcona.

Não foram encontrados na literatura estudos acerca de extratos da própolis submetida a processo de purificação através da ultrafiltração.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

As amostras de própolis foram obtidas de apicultores do município de Bagé, Rio Grande do Sul. Inicialmente as amostras brutas foram submetidas a remoção manual das impurezas, em seguida ocorreu a higienização com hipoclorito de sódio 1% por 10 min e lavagem em água corrente. Após a drenagem em temperatura ambiente, uma parte da própolis foi liofilizada durante 24 horas à menos 50° C.

### 4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

A própolis foi moída através de um moinho analítico (IKA - A11BS32) com o intuito de facilitar a extração de compostos bioativos. Foi pesado 2 g de própolis moída e adicionados em recipientes de vidro junto a 50 mL de água destilada para solubilização do meio, por conseguinte, as extrações decorrerão através do emprego de duas metodologias, sendo a convencional realizada através de banho metabólico tipo Dubnoff (SL 157 – SOLAB) e a extração pelo método de ultrassom, foi utilizado o sonicador de ponteira ultrassônico (ULTRONIC QR 500 – ECOSONICS), dessa forma, o ajuste de potência ficou em 99% a uma frequência ultrassônica de 20 kHz. Logo após, se dará a remoção das impurezas e ceras do extrato através de filtragem com o auxílio de funil de vidro e filtro de papel, a fim de obter o extrato filtrado.

Conforme os dados de (BENVEGNÚ, 2022), foram definidos diferentes condições de extração dos compostos bioativos para a realização de testes preliminares que foram realizadas conforme o Quadro 1.

QUADRO 1 – Ensaio de extração de compostos bioativos

Ensaio	Método	Temperatura(°C)	Tempo(min)
A	Ultrassom	Ambiente	45
B	Banho Metabólico com agitação	70	45

Fonte: Autor, 2023

Através dos resultados obtidos nos testes preliminares foram definidas novas condições de extração como demonstra o quadro 2:

QUADRO 2 – Ensaio de extração utilizando banho metabólico com agitação

Ensaio	Temperatura(°C)	Tempo(min)	Tratamento
B	70	45	Liofilizado
C	70	60	Liofilizado
D	70	60	Não Liofilizado

Fonte: Autor, 2023

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATOS OBTIDOS

#### 4.3.1 Compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos foi feita seguindo metodologia descrita por (SINGLETON; ROSSI, 1965), através da espectrometria, usando o Folin Ciocalteu, na qual ocorre em reação colorimétrica de oxidação/redução. As análises ocorrem em triplicata e são utilizados 0,5 mL de extrato da amostra e 10 mL de água destilada, adicionados de 1 mL de reagente em um tubo tipo falcon, para posteriormente serem acrescidos 8 mL solução Carbonato de Sódio (7,5% m/v) e armazenados em um local em temperatura ambiente sem a presença de luz por 2 h. A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 760 nm. A construção da curva de calibração decorreu empregando ácido gálico em concentrações variando de 0 a 500 mg/L, com o resultado expresso em mg de GAE.g<sup>-1</sup>. A determinação dos compostos fenólicos foi feita seguindo metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), através da espectrometria, usando o Folin Ciocalteu, na qual ocorre em reação colorimétrica de oxidação/redução. As análises ocorrem em triplicata e são utilizados 0,5 mL de extrato da amostra e 10 mL de água destilada, adicionados de 1 mL de reagente em um recipiente adequado, para posteriormente serem acrescidos 8 mL solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5% m/v) e armazenados em um local em temperatura ambiente sem a presença de luz por 2 h. A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 760 nm. A construção da curva de calibração decorreu empregando ácido gálico em concentrações variando de 0 a 500 mg/L, com o resultado expresso em mg de GAE.g<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia descrita por (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), onde ocorre a desativação do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). As análises ocorrem em triplicata, adicionando 0,2 mL de extrato da amostra em tubos, seguido de 7,8 mL de solução de DPPH. Foi obtida uma solução foi acondicionada por 30 min em um local arejado sem a presença de luz. A determinação da absorbância sucederá por espectrofotometria (UV 755B, EQUILAM, Brasil) com o comprimento de onda do UV-visível a 517 nm. Além disso, sucederá o preparo de um branco analítico para controle, através da substituição do extrato pelo solvente usado no procedimento.

#### 4.3.3 Atividade Antimicrobiana

Quatro bactérias foram utilizadas no estudo, sendo duas bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 12598 [1] e *Staphylococcus aureus* WDCM00032 [3]

) e duas gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229 [2] e *Escherichia coli* 11303-10G [4]). A atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo com o método de macrodiluição em caldo, conforme a Norma M7-A6 (emphMethods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition, 2003). Para tal, as culturas bacterianas, previamente cultivadas em caldo TSB (Tryptone Soy Broth), foram padronizadas até atingirem  $1 \times 10^8$  (UFC)/mL de acordo com a escala Mac Farland e então diluídos para a concentração de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, conforme o método M7-A6 (2003) da instrução normativa do CLSI. Dessa forma foram pipetadas 1 mL de uma alíquota microbiana junto de 1 mL de extrato bruto em 1 tubo estéril, assim são levadas para incubação por 16 h a 35 °C, onde após o período ocorre a análise visual quanto inibição. Pela norma é considerado inibição um agente que impede crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo, em que a ausência de turbidez configura inibição do crescimento microbiano.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO

O ensaio de extração que obtiveram os melhores resultados quanto à caracterização de seus compostos foi submetido a ensaios de ultrafiltração utilizando as membranas de ultrafiltração Vivaspin®, com os seguintes diâmetros nominais, (3kDa, 5kDa, 10kDa, 30kDa), com o intuito de purificar parcialmente o extrato. O extrato de própolis foi adicionado ao tubo de ultrafiltração e levado à centrífuga refrigerada por 30 min, 25 °C, 6500 R.P.M. Posteriormente foi realizada a determinação da atividade de antioxidantes, fenólicos totais e antibacteriana.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Também foi avaliado a purificação do extrato de própolis envolvendo a técnica de precipitação com sulfato de amônio. Três amostras de extrato foram precipitadas com sulfato de amônio até atingirem os valores de 20%, 50% e 80% de saturação respectivamente, partindo de 0% de saturação para todos os extratos, conforme a metodologia descrita por (SCOPES, 1993). O sulfato foi adicionado lentamente ao extrato de própolis, sob agitação magnética. A seguir, o extrato permaneceu overnight sob refrigeração. Após a centrifugação (colocar as condições de centrifugação) o sobrenadante e o precipitado foram separados.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados por meio de análise estatística por meio de média e desvio padrão, e teste de diferença de médias, quando cabível, empregando o software Statistica 14.

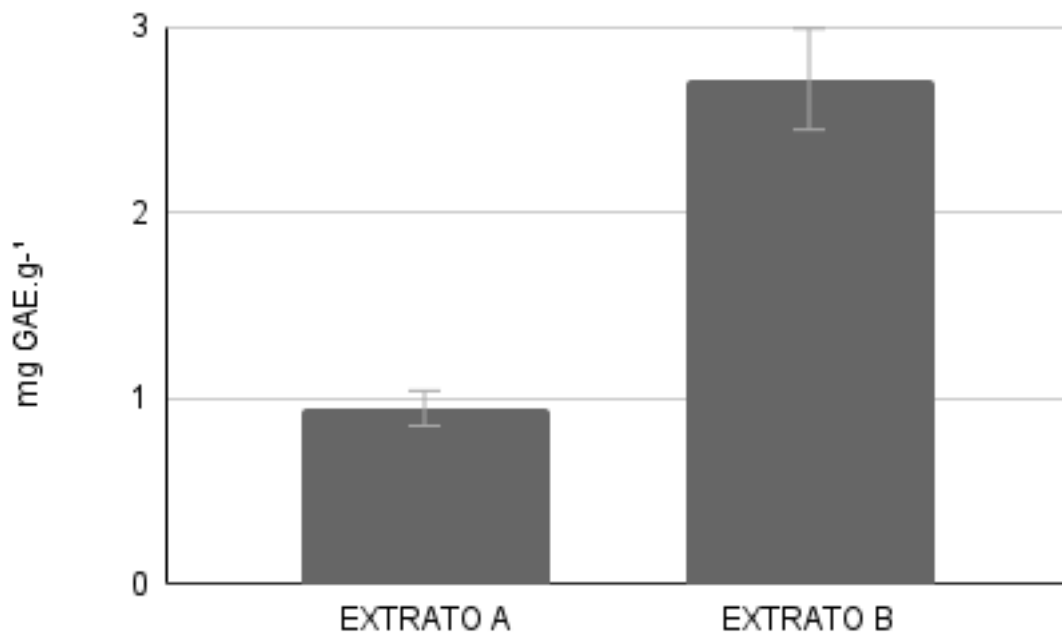
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um estudo da extração dos compostos bioativos da própolis, através de uso de banho metabólico (A) e de ultrassom (B), conforme descrito no Quadro 1.

Após a extração, foram separadas as ceras e o extrato foi submetido à análise de atividade antimicrobiana, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Os resultados para os testes referentes compostos fenólicos totais estão presentes na Figura 5:

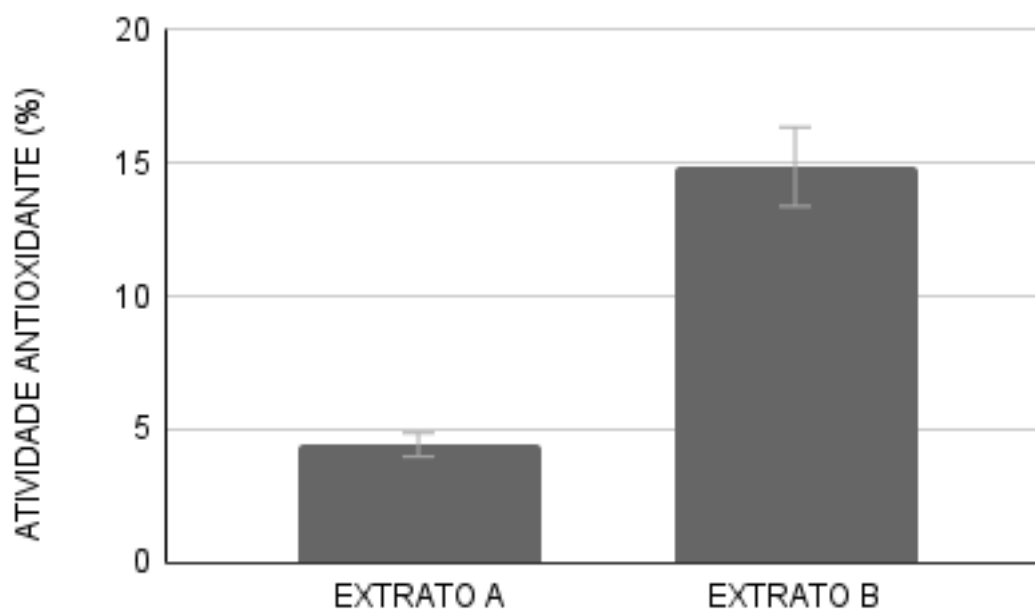
FIGURA 5 – Resultados da avaliação para compostos fenólicos totais para os dois métodos de extração testados.



Fonte: Autor,2023

Atividade antioxidante total dos extratos está presente na Figura 6:

FIGURA 6 – Resultados dos testes para atividade antioxidante total para diferentes métodos de extração.

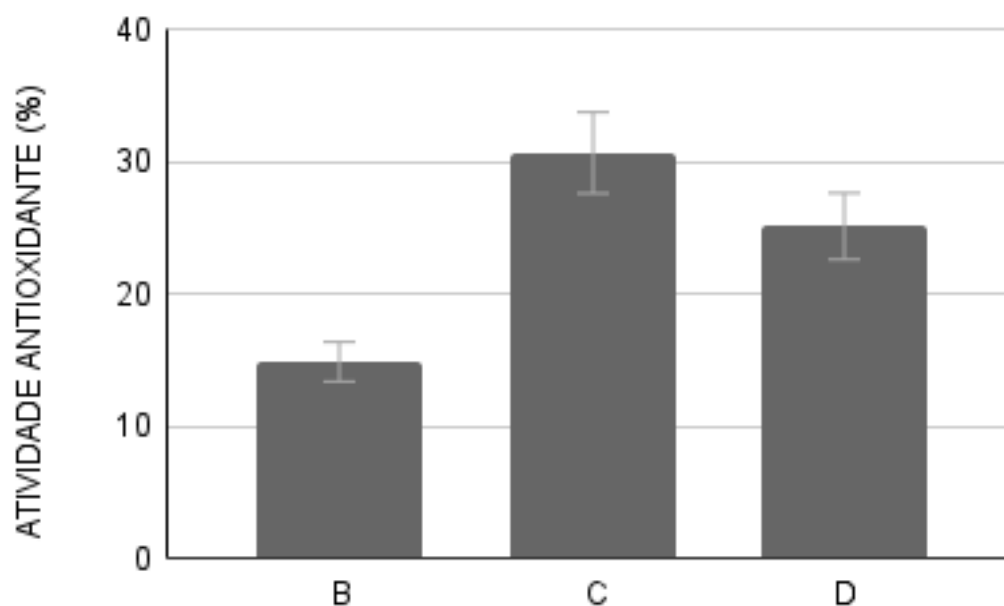


Fonte: Autor,2023

A análise antimicrobiana evidenciou que o extrato B obteve melhores resultados para atividade antimicrobiana em relação aos resultados obtidos para o extrato A, pois para as cepas de *S. Aureus*(1) e *E. Coli*(2) houve menos turbidez nos tubos, indicando maior inibição do crescimento microbiano.

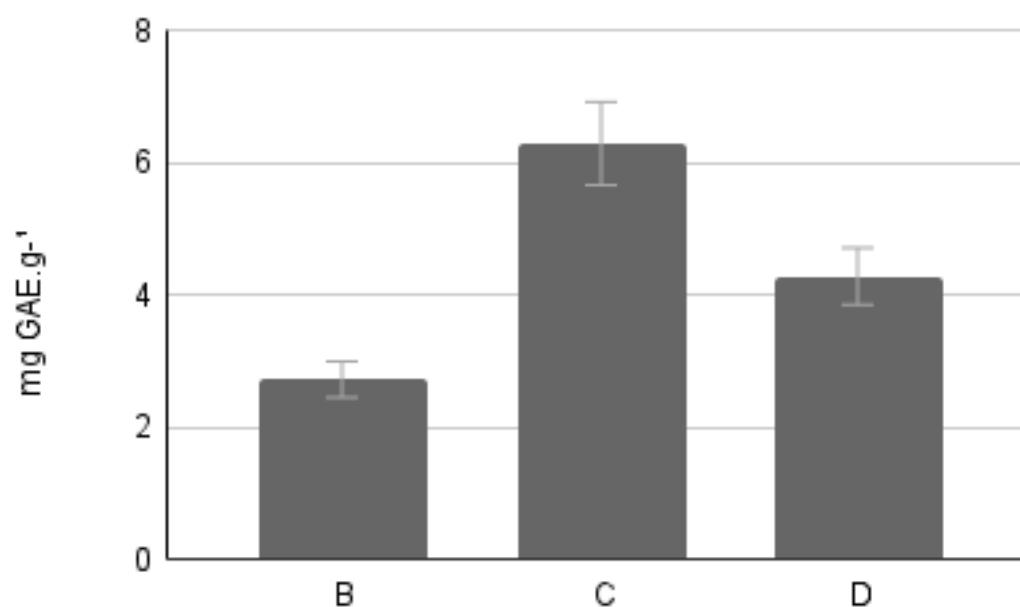
Devido ao fato dos extratos obtidos por banho metabólico com agitação ter apresentado resultados melhores para atividade antimicrobiana, níveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total, foi avaliada mais profundamente a metodologia do banho metabólico com agitação, na qual diferentes condições de extração foram testadas como ressalta a Quadro 2.

FIGURA 7 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico com agitação para atividade antioxidante total.



Fonte: Autor,2023

FIGURA 8 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico com agitação para compostos fenólicos totais.



Fonte: Autor,2023

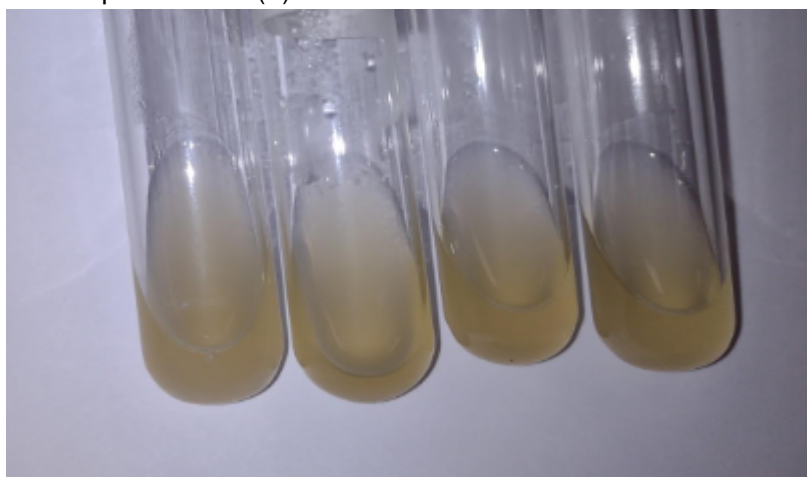
Com relação à atividade antimicrobiana, o extrato C conseguiu inibir completamente o crescimento microbiano de *S. Aureus* (1), portanto o mesmo não foi observado para os extratos B e D, pois apresentaram dificuldades para inibir o crescimento da cepa de *S. Aureus* (1), apresentando leve turbidez no tubo; Entretanto nenhum extrato

foi capaz de inibir o crescimento da *E. Coli*(2),na qual todos os tubos apresentaram turbidez

Os resultados coincidem com estudos realizados por (JUNIOR *et al.*, 2012) na qual indicaram que a ação antimicrobiana da própolis é mais acentuada em bactérias gram positiva, porém como ressalta (AGA *et al.*, 1994) os níveis de constituintes da própolis dependem de fatores geograficos e sazonais, sendo assim as propriedades antimicrobianas da própolis podem diferir de acordo com a origem de obtenção da própolis, como foi observado por (SILVA *et al.*, 2006), onde a própolis proveniente da Paraíba não apresentou ação antimicrobiana frente a uma bactéria gram positiva.

A Figura 9 apresenta a foto do ensaio para atividade antimicrobiana contra *E. Coli*(2), com o extrato C.

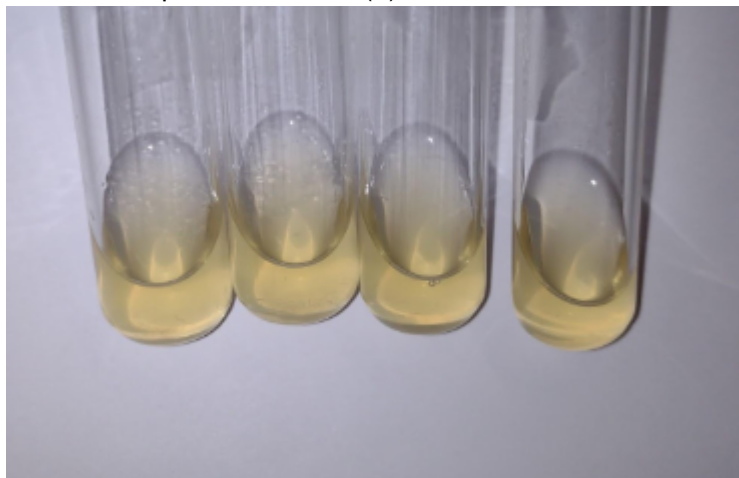
FIGURA 9 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico para atividade antimicrobiana para *E. Coli*(2).



Fonte: Autor,2023

A Figura 10 demonstra o extrato C frente a *S. Aureus* (1)

FIGURA 10 – Resultados dos ensaios de extração com banho metabólico para atividade antimicrobiana para *S. Aureus* (1).



Fonte: Autor,2023

O extrato C apresentou os melhores resultados para atividade antimicrobiana, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total, então optou-se pela purificação do extrato C.

Após a etapa de purificação, tanto o extrato bruto quanto as frações obtidas na purificação foram avaliadas com relação a sua atividade antimicrobiana, considerada nesta pesquisa como a principal resposta.

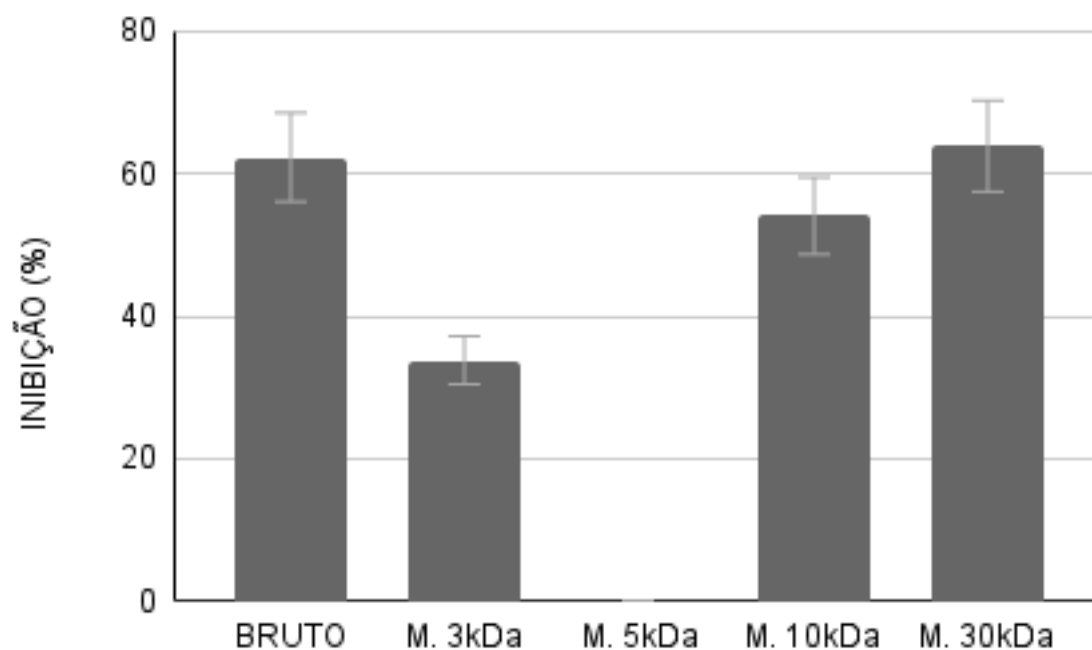
Ao longo do trabalho, observou-se que as cepas bacterianas *S. Aureus* (1) e *E. Coli*(2) vinham apresentando mudança no tempo e padrão de crescimento, e dessa forma, novas cepas foram utilizadas, sendo que a cepa *S. Aureus* (1) foi substituída pela cepa *S. Aureus* (3) e a cepa *E. Coli*(2) foi substituída pela cepa *E. Coli*(4).

Os testes do potencial antimicrobiano do extrato C (banho metanólico com agitação, 60 min, liofilizado) para as cepas *S. Aureus* (3) e *E. Coli*(4). mostraram pouca eficácia para inibir completamente o crescimento microbiano das novas cepas, pois todos os tubos apresentaram muita turbidez

Os resultados para inibição do crescimento microbiano da cepa *S. Aureus* (3) para diferentes condições de purificação por membranas estão dispostos na Figura 11:



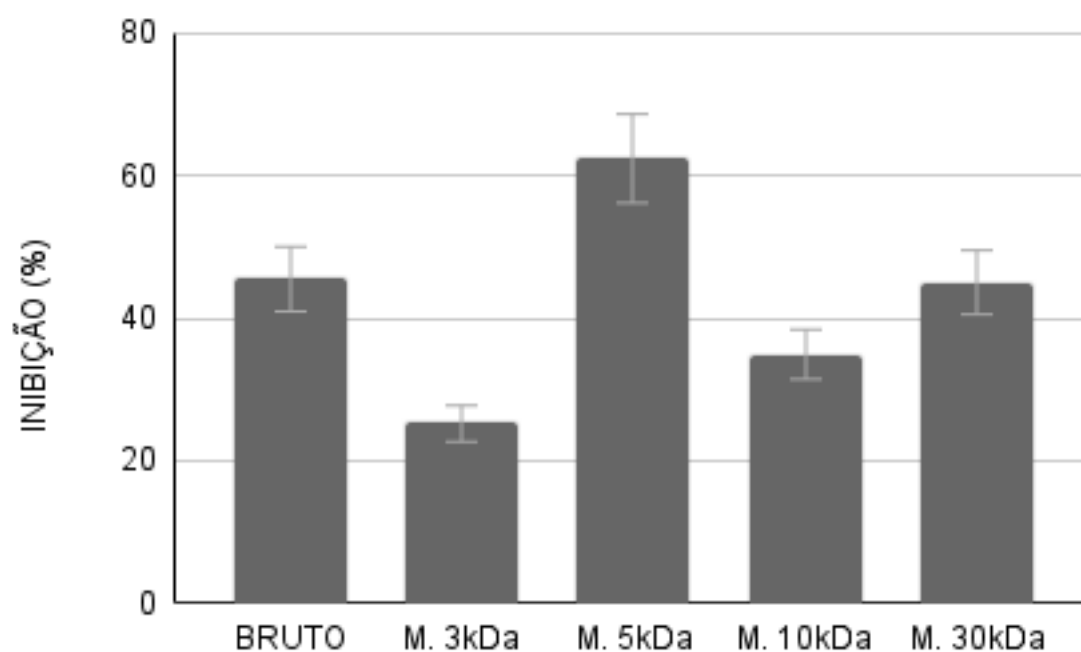
FIGURA 11 – Resultados de inibição microbiana para *S. Aureus* (3) para diferentes membranas.



Fonte: Autor,2023

Os resultados para inibição do crescimento microbiano da cepa de *E.Coli*(4) para diferentes condições de purificação por membranas estão dispostos na Figura 12:

FIGURA 12 – Resultados de inibição microbiana para *E.Coli*(4) para diferentes membranas.

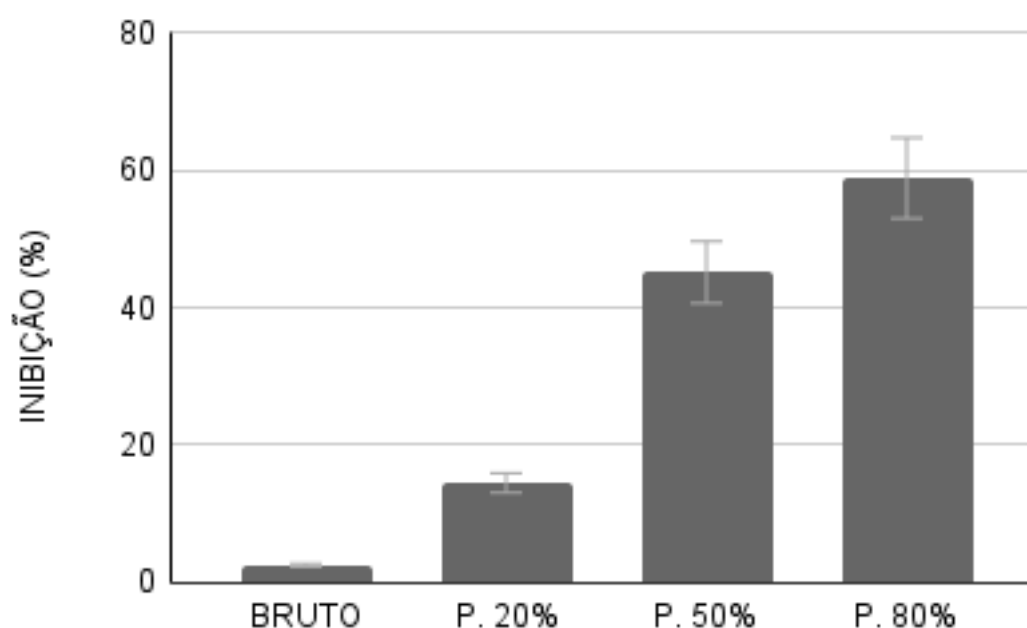


Fonte: Autor,2023

O extrato bruto apresentou resultados muito próximos aos resultados referentes aos extratos purificados para inibição microbiana da cepa de *S. Aureus* (3), ou até mesmo melhores, ou seja, alguns compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana podem ter ficado isolados na fração retida, pois a ultrafiltração pode ser empregada para isolar certas substâncias, os resultados corroboram com (RODRIGUES *et al.*, 2003), onde a ultrafiltração foi utilizada empregando membranas de 10 e 30 kDa para clarificação e remoção da enzima polifenoloxidase do suco de banana. Entre as membranas estudadas obteve a maior redução de atividade enzimática através da membrana de 10 kDa, pelo seu menor peso molecular de corte. (BALDASSO, 2008) também utilizou técnicas de purificação para concentrar proteínas do soro do leite, onde membranas de ultrafiltração de 10kDa com o sistema operado em batelada, associado a diafiltração, obtendo a maior concentração de proteínas no retido.

Os resultados para inibição do crescimento microbiano para *S. Aureus* (3) para diferentes níveis de saturação estão presentes na Figura 13:

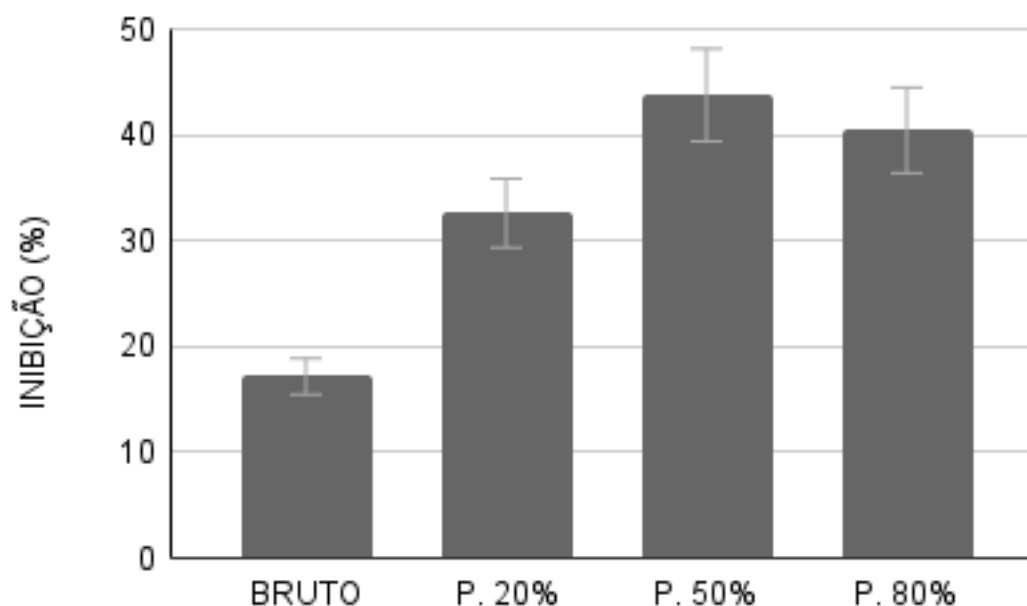
FIGURA 13 – Resultados de inibição microbiana para *S. Aureus* (3) para diferentes níveis de saturação .



Fonte: Autor,2023

Os resultados para inibição do crescimento microbiano para *E.Coli*(4) para diferentes níveis de saturação estão presentes na Figura 14:

FIGURA 14 – Resultados de inibição microbiana para *E.Coli*(4) para diferentes níveis de saturação.



Fonte: Autor,2023

Os melhores resultados obtidos foram para os graus de saturação de 50 e 80%, na qual tiveram diferenças bem expressivas em relação ao extrato bruto, os resultados corroboram com (COSTA; FERNANDES, 2014), que comparou duas técnicas de precipitação, usando acetona gelada e sulfato de amônio, sendo que a precipitação por sulfato de amônio obteve os melhores resultados, destacando-se as frações de 20–50% e 50-75% onde houve maior manutenção da atividade proteolítica.

Apesar de não haver informações sobre a presença de proteínas no extrato de própolis estudado, através da precipitação usando sulfato de amônio foi possível obter resultados promissores em relação ao extrato bruto, mesmo a precipitação consistindo em uma técnica de purificação de proteínas de baixa resolução e aplicação relativamente simples, como explica (KILIKIAN; PESSOA JR, 2001).

## 6 CONCLUSÃO

Dessa forma, foi possível concluir que a extração de compostos da própolis marrom liofilizada através do banho metabólico com agitação à 70°C durante 60 min (C) obteve os melhores resultados para atividade antimicrobiana, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em relação ao extrato obtido por ultrassom, para atividade antimicrobiana foi capaz de inibir o crescimento da *S. Aureus* (1) e os resultados referentes a compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total foram mg 6,28 GAE.g<sup>-1</sup> BS e 30,24%. Quanto as técnicas de purificação, as membranas de 5 kDa obtiveram o melhor resultado para inibição da *E. Coli*(4), com 62,4% de inibição, enquanto para inibição da *S. Aureus*(3), a purificação não foi capaz de apresentar resultados com diferença significativa em relação ao extrato bruto, com 63,9% de inibição para as membranas de 30kDa e 62,3% de inibição para o extrato bruto. Porém a técnica de purificação por precipitação obteve resultados muito promissores, com 50% de saturação sendo o melhor resultado para *E. Coli*(4) com 43,76% de inibição de crescimento microbiano e 80% sendo o melhor resultado para *S. Aureus* com 58,87% de inibição do crescimento microbiano. A própolis possui muito espaço como agente antimicrobiano frente a certas cepas, principalmente quando submetida a processos de purificação como a precipitação, que apesar de ser considerada uma técnica simples, apresentou resultados satisfatórios.

## **7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS**

Como sugestões para futuros trabalhos recomenda-se testar outras técnicas de extração de compostos bioativos e técnicas de purificação, ainda é possível explorar os grupos de compostos bioativos individualmente, a fim de averiguar qual a sua propriedade majoritária. Também é possível estudar a ação da própolis frente a outros microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- AGA, Hajime *et al.* **Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis.** v. 58. [S.l.]: Taylor & Francis, 1994. P. 945–946. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.58.945>. Acesso em: 10 jul 2022.
- ANDRÉ, Bruna Alexandra Gonçalves. **O Arsenal Farmacêutico da Antiguidade Clássica e da Idade Média.** [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4161>. Acesso em: 12 jul 2022.
- APPENDINI, Paola; HOTCHKISS, Joseph H. **Review of antimicrobial food packaging.** v. 3. [S.l.]: Elsevier, 2002. P. 113–126. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856402000127>. Acesso em: 08 jul 2022.
- BALDASSO, Camila. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas.** [S.l.: s.n.], 2008. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/13453>. Acesso em: 11/05/2023.
- BAPTISTA, Maria Eduarda Alves. **Ultrafiltração de extrato de casca de Eucalyptus globulus para recuperação de compostos polifenólicos.** [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/abd7a1fc1817f8b32b649fbb54a0fb10/1?pq-origsite=gscholarcbl=2026366diss=y>. Acesso em: 05 jul 2022.
- BATISTA, Lara Livia Valença *et al.* **Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos.** v. 39. [S.l.]: SciELO Brasil, 2012. P. 515–520. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/GB3JGWnBshXvWTjRCdvD3Yr/?lang=pt>. Acesso em: 10 jul 2022.
- BENVEGNÚ, Isadora Antonov. **Filme biopolimérico utilizando extrato de própolis marrom como agente ativo.** [S.l.]: Universidade Federal do Pampa, 2022. Disponível em: <https://dspace.unipampa.edu.br/handle/rii/7025>. Acesso em: 16 jul 2022.
- BITTENCOURT, Felipe Oliveira *et al.* **Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.** v. 10. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <https://www.scienciaplana.org.br/sp/article/view/1914>. Acesso em: 03 jul 2022.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, CLWT. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. v. 28. [S.l.]: Elsevier, 1995.

P. 25–30. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 19 jul 2022.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. [S.l.: s.n.], 2008.

Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-18112008-111056/pt-br.php>. Acesso em: 05 jul 2022.

CHANG, Roberto *et al.* **Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS**. v. 18. [S.l.]: SciELO Brasil, 2008.

P. 549–556. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/gCYNXgnD8YbNNkG648N4fbR/?lang=en>. Acesso em: 17 jul 2022.

COSTA, HB; FERNANDES, PMB. **Extração, purificação parcial e comparação de duas técnicas de precipitação de enzimas proteolíticas do abacaxizeiro**. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em:

<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/180/1/EXTRACAO-PURIFICACAO-PARCIAL-E-COMPARACAO-DE-DUAS-TECNICAS-DE-PRECIPITACAO-DE-ENZIMAS-PROTEOLITICAS-DO-ABACAXIZEIRO-CD-ANAISsmallpdf.com.pdf>. Acesso em: 10/05/2023.

HABERT, Alberto Cláudio; BORGES, Cristiano Piacsek; NOBREGA, Ronaldo.

Processos de separação por membranas. Editora e-papers, v. 3, 2006.

HESPAHOL, Ivanildo; MIERZWA, José Carlos. *Água na indústria: uso racional e reúso*. Oficina de Textos, 2005.

JUNIOR, Walfrido Bispo *et al.* **Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil**. v. 33. [S.l.: s.n.], 2012. P. 3–10. Disponível em:

<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/4589>. Acesso em: 11/05/2023.

KILIKIAN, Beatriz Vahan; PESSOA JR, Adalberto. Purificação de produtos biotecnológicos. LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W, p. 493–521, 2001.

KIZILTAS, Habip; ERKAN, Cengiz. **The effects of different beehives on propolis production and quality**. v. 41. [S.l.]: SciELO Brasil, 2020. P. 877–883. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cta/a/QftfNVXHV4Bkb779KXpYV8h/?> Acesso em: 03 jul 2022.

KRÖCKEL, Lothar; JIRA, Wolfgang; WILD, Dieter. **Identification of benzalkonium chloride in food additives and its inefficacy against bacteria in minced meat and raw sausage batters.** v. 216. [S.l.]: Springer, 2003. P. 402–406. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-003-0680-9>. Acesso em: 12 jul 2022.

LIMA, Luiza DC *et al.* **Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice.** v. 14. [S.l.]: BioMed Central, 2014. P. 1–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886376/>. Acesso em: 15 jul 2022.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Blucher, 2001.

MATOS, S. P. D. **Operações unitárias - fundamentos, transformações e aplicações dos fenômenos físicos e químicos.** São Paulo: Editora Saraiva, 2015.

MAUL, Aldo Adolar; WASICKY, Roberto; BACCHI, Elfriede Marianne. **Extração por fluido supercrítico.** v. 5. [S.l.]: SciELO Brasil, 1996. P. 185–200. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/6pZbYHtVFRDcB9vYZLfWsKC>. Acesso em: 10 jul 2022.

MELLO, Beatriz Camargo Barros de Silveira; PETRUS, José Carlos Cunha; HUBINGER, Miriam Dupas. **Performance of nanofiltration concentration process in propolis extracts.** v. 30. [S.l.]: SciELO Brasil, 2010. P. 166–172. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/x8w4TmLHLKGGXb4WywBSHyb/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul 2022.

MILOJKOVIĆ OPSENICA, Dušanka *et al.* **TLC fingerprinting and pattern recognition methods in the assessment of authenticity of poplar-type propolis.** v. 54. [S.l.]: Oxford University Press, 2016. P. 1077–1083. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26931733/>. Acesso em: 13 jul 2022.

PEREIRA, DANIELA ALMEIDA. Extração aquosa de própolis e secagem em leito de espuma para uso em alimentos. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,** 2008. Acesso em: 07 jul 2022.

PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. **Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações.** v. 41. [S.l.]: SciELO Brasil, 2018. P. 662–677. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/RtZhvxbSYmcgnTwz6cTHT3v/?lang=pt>. Acesso em: 11 jul 2022.

POBIEGA, Katarzyna *et al.* **Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods.** v. 56. [S.l.]: Springer, 2019. P. 5386–5395. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-04009-9>: :text=Comparison. Acesso em: Acesso em: 05 jul 2022.



- RODRIGUES, Simone Loureiro Campos *et al.* **Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana.** v. 23. [S.l.]: SciELO Brasil, 2003. P. 98–101. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/YxDXxhD8QS68H6c7nNfx9HN/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 12/05/2023.
- SCAZZOCCHIO, F *et al.* **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis.** v. 161. [S.l.]: Urban & Fischer, 2006. P. 327–333. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16427259/>. Acesso em: 09 jul 2022.
- SCOPEs, Robert K. **Protein purification: principles and practice.** [S.l.]: Springer Science & Business Media, 1993.
- SILVA, Rosilene Agra da *et al.* **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil.** v. 36. [S.l.]: SciELO Brasil, 2006. P. 1842–1848. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/5Nxq6fzR4FxNTbjkC5yG8hf/?lang=pt>. Acesso em: 23 de julho de 2023.
- SILVA MENDONÇA, Lavosyer da *et al.* **Seasonality in the volatile oil composition of Green Propolis from the Caatinga Biome.** v. 31. [S.l.]: Springer, 2021. P. 497–501. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43450-021-00186-x>. Acesso em: 12 jul 2022.
- SINGLETON, Vernon L; ROSSI, Joseph A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** v. 16. [S.l.]: Am Soc Enol Viticulture, 1965. P. 144–158. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 02 jul 2022.
- STEFFENS, J; BACKES, GT; VALDUGA, AT. **Processos tecnológicos, biotecnológicos e engenharia de processos em alimentos.** Erechim: EdiFAPES, 2014.
- STREIT, Katia Fernanda. **Estudo da aplicação de processos de separação com membranas no tratamento de efluentes de curtume: Nanofiltração e eletrodialise.** [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/32595>. Acesso em: 06 jul 2022.
- TADINI, C. C. **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos.** Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2015.
- TAKEUCHI, Thais M *et al.* **Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants.** [S.l.]: CRC Press Boca Raton, FL, 2009. P. 137–218. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/284255220\\_LowPressure\\_solvent\\_Extracti](https://www.researchgate.net/publication/284255220_LowPressure_solvent_Extracti). Acesso em: 09 jul 2022.

TRINDADE, Rafael Scheer. **Caracterização de membranas poliméricas aplicadas ao processo de microfiltração**. [S.l.: s.n.], 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/25808>. Acesso em: 15 jul 2022.

UMTHONG, Supawadee *et al.* **In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines**. v. 11. [S.l.]: Springer, 2011. P. 1–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21548933/>. Acesso em: 14 jul 2022.

UZEL, Atac *et al.* **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples**. v. 160. [S.l.]: Elsevier, 2005. P. 189–195. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450130500011X>: :text=The. Acesso em: 06 jul 2022.