

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE PELA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INCORPORAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA

OPTIMIZATION OF GREEN PROPOLIS EXTRACTION BY ANTIFUNGAL ACTIVITY AND INCORPORATION IN CHITOSAN BIOFILM

Tabata Hana Shigihara¹
Elizabeth Figueiredo Pires²
Diego de Assunção Justo³
Juliana Aparecida Mirante da Silva⁴
Ricardo Fiori Zara⁵
Clayton Antunes Martin⁶
Solange Maria Cottica⁷
Tatiana Shioji Tiومان⁸

Resumo: O mercado de própolis brasileiro sofreu grande expansão, levando o setor de beneficiamento a buscar a melhor forma de produzir extratos com atividades biológicas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de própolis verde pela atividade antifúngica e realizar a incorporação em um biofilme de quitosana. Os extratos foram preparados utilizando etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol, de acordo com três planejamentos. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. A partir da CIM, realizou-se a análise de superfície de resposta, para encontrar as condições ótimas de extração para cada planejamento. Os extratos otimizados foram incorporados em biofilmes de quitosana que, posteriormente, foram avaliados quanto à espessura, permeação de vapor de água, solubilidade em água e atividade anti-*Candida*. Verificou-se que todos os extratos testados apresentaram atividade antifúngica contra as três espécies de *Candida*. Destacou-se o extrato obtido com acetona/etanol que apresentou os menores valores de CIM e CFM (0,76 - 2,50 mg/mL). Observou-se que os pontos ótimos de extração de cada planejamento foram as misturas de acetona/isopropanol, acetona/etanol e acetato de etila/isopropanol e os biofilmes incorporados com estes extratos mostraram poucas diferenças de espessura, permeabilidade de vapor e solubilidade em água em relação ao controle. O biofilme contendo extrato obtido por acetona/isopropanol foi o que demonstrou maior atividade anti-*Candida*. Estes resultados mostram a importância da otimização dos processos de extração de própolis para aplicação e desenvolvimento de produtos.

Palavras-chave: extrato bruto; planejamento experimental; concentração inibitória mínima; *Candida*.

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: tabata.hana@gmail.com.

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: elizabethpires@alunos.utfpr.edu.br.

³ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: diego.twd@outlook.com.

⁴ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: juliana_mirante@hotmail.com.

⁵ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: ricardozara@utfpr.edu.br.

⁶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: claytonmartin@utfpr.edu.br.

⁷ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: smcottica@utfpr.edu.br.

⁸ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. E-mail: tatianatiuman@utfpr.edu.br.

Abstract: The Brazilian propolis market has expanded greatly, leading the processing sector to pursue the best way to produce extracts with biological activities. The purpose of this research was to optimize the green propolis extraction by the antifungal activity and perform incorporation into a chitosan biofilm. The extracts were prepared using ethanol, acetone, ethyl acetate and isopropanol according to the three designs. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. From the MIC, the response surface analysis was carried out to find the optimal conditions for the extraction for each design. The optimized extracts were incorporate into chitosan biofilm that were subsequently evaluated for thickness, water vapor permeation, water solubility and anti-*Candida* activity. It was established that all extracts tested showed antifungal activity against the three *Candida* species. The extract obtained with acetone/ethanol stood out because it presented the lowest values of MIC and MFC (0.76 – 2.50 mg/mL). It was observed that the optimal extraction points of each design were the blend of acetone/isopropanol, acetone/ethanol and ethyl acetate/isopropanol yet the biofilms incorporated with these extracts showed few differences in thickness, vapor permeability and water solubility in relation to the control design. The biofilm obtained by acetone/isopropanol displayed the higher activity anti-*Candida*. These results show the importance of optimizing propolis processes for the application and product development.

Key words: crude extract; experimental planning; minimum inhibitory concentration; *Candida*.

Data de submissão: 28.03.2022

Data de aprovação: 01.08.2022

Identificação e disponibilidade:

(<https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/4366>,
<http://dx.doi.org/10.18066/revistaunivap.v28i59.4366>).

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os benefícios de própolis para a saúde humana passaram a ser mais difundidos, por consequência, expandiram-se as formas de comercialização desse produto (Breyer et al., 2016). O mercado brasileiro está em pleno desenvolvimento, de modo que aproximadamente 92 % de toda a própolis consumida no Japão é de origem brasileira e, em termos de produção, o país ocupa o terceiro lugar no ranking mundial com produção de 50 a 150 toneladas por ano (Vidal, 2021). Em contrapartida, o recente setor de produção e extração ainda procura por métodos mais viáveis e efetivos para o beneficiamento dessa matéria-prima.

A composição da própolis depende da vegetação e da região em que cada colmeia é localizada. Nesse contexto, admite-se que esse material apresenta alta variabilidade da proporção de componentes, elementos e propriedades físico-químicas e biológicas específicas (Mariano & Hori, 2019). A partir desse viés, surge a importância de serem realizados estudos que investigam as características do produto levando em consideração a flora local.

O processo de extração consiste na remoção de substâncias pertencentes a composição química do material para um líquido extrator adequado (Simões, 2014). Uma vez que a matéria-prima tem as características conhecidas, torna-se possível

buscar por extrações que proporcionem maiores teores de compostos químicos responsáveis pela atividade de interesse. Para esse fim, a otimização é o meio mais adequado para se obter formulações de maior atividade biológica.

Tem sido crescente a investigação da atividade antifúngica em produtos naturais, uma vez que essa propriedade é capaz de interferir no crescimento das células fúngicas, inibindo-as (Sforcin et al., 2001). Em se tratando do mercado de produtos naturais, outro importante foco de estudo é o biofilme, que é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos que atua como barreira a fatores como umidade e gases, tendo uma função de proteção (Dos Santos, 2003). Estes extratos naturais podem conferir ou potencializar as atividades biológicas dos biofilmes quando incorporados em sua formulação.

A quitosana é um biopolímero linear que pode ser obtida a partir de crustáceos ou da biomassa de fungos filamentosos, oferecendo a vantagem do uso na obtenção de biomateriais de melhor relação custo/benefício em comparação com os seus semelhantes existentes no mercado (Spin Neto et al., 2008). Dentre os vários biomateriais de quitosana, encontra-se o biofilme. Um biomaterial de fácil produção e um vasto campo de aplicabilidade, como a indústria alimentícia, médica e farmacêutica.

Sabe-se que a própolis e a quitosana são substâncias que apresentam ação comprovada contra bactérias e fungos, além disso, ambas as substâncias são de origem natural, atóxicas e biodegradáveis (Costa, 2015). Nessa perspectiva, a presente pesquisa buscou encontrar as melhores condições de extração de própolis utilizando isopropanol, acetona, acetato de etila e etanol, utilizando como parâmetro de avaliação, a atividade antimicrobiana. Em uma segunda etapa, visou-se incorporar os extratos otimizados em biofilmes de quitosana com a finalidade de verificar a influência dos extratos no bioproduto desenvolvido.

2 METODOLOGIA

2.1 EXTRATO DE PRÓPOLIS

A amostra de própolis verde foi cedida pela empresa Apis Global, sendo pertencente ao lote 001/19 e coletada no município de Caxambú, localizado no sul do estado de Minas Gerais. O laudo das análises de controle de qualidade foi fornecido e continha as seguintes análises: determinação do teor de cinzas, umidade, cera, impurezas mecânicas, fenólicos, flavonóides e solubilidade em álcool.

Os extratos foram obtidos utilizando-se quatro solventes orgânicos como líquidos extratores, sendo estes empregados tanto isolados como em variadas misturas de 2 ou 3 componentes, sempre em iguais proporções (1:1; 1:1:1). Os 13 extratos foram agrupados em 3 planejamentos de caráter simplex-centróide, levando em consideração os solventes presentes nas misturas realizadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento simplex-centróide para a preparação dos extratos de própolis verde. Os solventes utilizados são puros ou em iguais proporções.

Planejamento	Extratos	Abreviações
A	Isopropanol	I
	Acetona	AC
	Acetato de etila	A
	Acetato de etila + acetona	AAC
	Acetato de etila + isopropanol	AI
	Acetona + isopropanol	ACI
	Acetato de etila + Acetona + Isopropanol	AACI
B	Acetona	AC
	Etanol	E
	Isopropanol	I
	Acetona + etanol	ACE
	Acetona + isopropanol	ACI
	Etanol + isopropanol	EI
C	Etanol + acetona + isopropanol	EACI
	Acetato de etila	A
	Etanol	E
	Isopropanol	I
	Acetato de etila + etanol	AE
	Acetato de etila + isopropanol	AI
	Etanol + isopropanol	EI
Etanol + acetato de etila + isopropanol	EAI	

Fonte: Os autores, 2021.

Com o preparo em triplicata, foi pesado $1,000 \pm 0,0010$ g de própolis verde e homogeneizado com 25 mL do solvente ou da mistura extratora e colocado em incubadora de agitação orbital a 200 rpm e 40 °C, por 24 h.

Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado utilizando-se evaporador rotativo. O extrato concentrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, que foi completado com o volume da mistura de solventes extratores ou solvente puro. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar de 10 mL a -18 °C.

Para a realização das análises, o extrato concentrado foi submetido à secagem preliminar em capela de exaustão por 20 minutos, seguido de nitrogênio comprimido. As soluções dos extratos foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, utilizando 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e caldo *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, tamponado com 0,165 mol/L de solução tampão ácido-3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS).

2.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

As culturas das leveduras *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida glabrata* ATCC 2001 e *Candida tropicalis* ATCC 28707 foram ativadas em caldo *Sabouraud*. As suspensões das culturas foram preparadas em solução salina 0,9 % (m/v) de acordo com a escala 0,5 de *McFarland* (10^6 células/mL). Por fim, a suspensão de leveduras foi diluída em caldo RPMI até concentração de 5×10^4 células/mL.

A CIM para leveduras foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a norma M27-A2 do NCCLS (2002). Em microplacas estéreis de 96 poços, acrescentou-se 100 µL de meio RPMI 1640, tamponado com MOPS em todos os poços. Na sequência, foi feita a adição de 100 µL da solução com os extratos de própolis a 10 mg/mL na linha A. Nos poços das linhas sequenciais foram realizadas diluições seriadas com razão 1:2 até a linha G. Assim, foi possível avaliar 7 concentrações de extrato de própolis: 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,08 mg/mL. A linha H foi utilizada para controle do crescimento microbiano, dessa forma, não foi acrescido extrato nestes poços.

Na sequência, 10 µL dos inóculos fúngicos previamente padronizados (5×10^4 células/mL) foram acrescidos em cada poço. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h em estufa.

A CIM foi determinada através da menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico (ausência de turvação). Enquanto para a CFM, foi realizado o subcultivo em Ágar *Sabouraud* dextrose com cloranfenicol (SDC) dos poços que não apresentaram turvação, juntamente com o controle positivo.

Para confirmar a leitura da CIM foram acrescidos 10 µL de solução de cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio a 0,5 % (m/v) em cada um dos poços. As microplacas foram novamente incubadas por 3 h a 35 °C. O cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio é uma substância incolor na sua forma oxidada e quando reduzido por microrganismos sintetiza o formazano, composto capaz de conferir a coloração rosa. Dessa forma, foi considerado que os poços que não apresentaram a coloração rosa, de fato, havia a inibição do crescimento microbiano (NCCLS, 2002).

Foram avaliadas também a CIM e CFM do DMSO e quitosana, além da nistatina como controle positivo. As amostras foram analisadas em triplicata e com repetições dos testes em momentos distintos.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a conclusão da etapa de otimização do extrato de própolis, os estudos foram conduzidos utilizando o software *Statistica*®, versão 12.0. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 0,05. Foram analisados os seguintes parâmetros: a composição do solvente extrator utilizada no planejamento experimental *simplex*-centróide (Tabela 1), a análise de variância dos resultados, a modelagem e construção dos gráficos de superfície de resposta e a aplicação das funções de desejabilidade para determinar a composição das misturas extratoras que resultam no menor valor de CIM.

2.4 BIOFILME DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO DE PRÓPOLIS

Após a determinação da composição do solvente extrator que resultou na minimização dos valores de CIM para as leveduras estudadas, os extratos foram incorporados no biofilme. Ou seja, foram utilizados três diferentes extratos, cada um representando a melhor condição de extração de cada planejamento. Foram produzidos também biofilmes contendo nistatina em DMSO (1 mg/mL) como controle positivo (C+) e sem nenhuma substância incorporada como controle negativo (C-),

O biofilme de quitosana foi produzido seguindo a técnica de *casting*, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica (SF). As SF foram preparadas com 2 % de quitosana em ácido acético (0,5 mol/L). Para a melhor plasticidade, acrescentou-se 0,5 % de ácido oleico. O pH da SF foi ajustado e, nesse estágio, adicionaram-se

os extratos a serem avaliados na concentração de 1 %. A SF foi então submetida ao aquecimento de 50 °C sob agitação constante por 25 minutos. Após esse processo, 20 mL da SF foram aplicados em placas de teflon e levadas à secagem em estufa a 40 °C por 16 h (Araújo, 2014; Galindo, 2017).

A avaliação visual das condições morfológicas macroscópicas foi realizada para todos os filmes obtidos, como a presença de bolhas, rachaduras ou separação de fases. Utilizando um paquímetro foram medidos cinco pontos aleatórios do biofilme e calculou-se a média aritmética dos valores para determinar a espessura.

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada através do método gravimétrico padrão E96/E96M com modificações. Em pequenas placas de Petri foi adicionada sílica gel dessecante, previamente ativada em estufa por 3 h a 60 °C. Posteriormente, as amostras dos biofilmes foram seladas na parte superior das placas com distância de aproximadamente 6 mm entre a sílica gel e o biofilme. Esse sistema foi colocado em dessecador contendo solução de cloreto de cálcio 10 % (m/v) e mantido em estufa a 25 °C. Em intervalo de tempo padronizado (24 h), foram feitas 5 pesagens para obter o ganho de massa da sílica, a fim de determinar a razão de transferência de vapor de água através do biofilme para o meio dessecante (Limberger, 2017). Utilizou-se a equação (01) para calcular a transmissão de vapor de água (TVA) e a equação (02) para calcular a permeabilidade ao vapor de água (ASTM, 2002).

$$TVA = \frac{M}{t \cdot A} \quad (1)$$

$$PVA = \frac{(TVA \times e)}{ps \times (UR1 - UR2)} \quad (2)$$

Onde, PVA= Permeabilidade ao vapor e água ($\text{g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{kPa}^{-1}$); e= Espessura média do corpo de prova (m); ps= Pressão de saturação de vapor a temperatura do ensaio (Pa); UR1= Umidade relativa dentro do dessecador (75 %); UR2= Umidade relativa dentro da placa (0 %); TVA= Taxa de transmissão ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$); m= Ganho de massa de água (g); t= tempo (h) e A= Área de permeação (m^2).

Para avaliar a solubilidade em água, biofilmes de 2 cm^2 secos em estufa a 105 °C, foram pesados e colocados em erlenmeyers contendo 50 mL de água destilada. O sistema foi submetido a agitação de 140 rpm a 25 °C por 24 h e, novamente, foram secos em estufa a 105 °C por 24 h. Após encontrar a massa seca final, foi calculada a solubilidade em água pela equação (03) (Galindo, 2017).

$$SOL = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde m_i = massa seca inicial (g); m_f = massa seca final (g); e SOL= solubilidade em água (%).

A verificação da atividade antifúngica, contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de todos os biofilmes produzidos, foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo da norma M27-A2 da NCCLS (2002) com modificações. Inicialmente, os biofilmes foram cortados em quadrados de 1 cm e 0,5 cm de lado, perfazendo 1 cm^2 e 0,25 cm^2 . As amostras foram esterilizadas por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar vertical por 30 minutos (15 minutos cada lado). Em tubos de ensaio foram adicionados 3 mL da suspensão de leveduras, reproduzindo as mesmas

concentrações celulares empregadas anteriormente nos testes de CIM e CFM (5×10^3 células/mL) e adicionados os biofilmes esterilizados. Os tubos foram incubados a 35 °C, durante por 24 h. O resultado foi obtido por meio da comparação visual da quantidade de crescimento (turvação) nos tubos contendo as amostras em relação ao tubo controle de crescimento celular (sem nenhum biofilme).

Dos tubos que não apresentaram turvação e do tubo de controle de crescimento celular foram realizados subcultivos em placas com ágar SDC e após 24 h de incubação a 35 °C foi verificado o crescimento de colônias. Quando não foi observado crescimento celular, concluiu-se que o biofilme apresentou atividade fungicida. Já para os casos de presença de colônias, pode-se inferir que o biofilme apresentou atividade fungistática (NCCLS, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Conforme laudo de controle de qualidade fornecido pela empresa, primeiramente foi possível verificar se a amostra se enquadrava nos parâmetros exigidos. A umidade e o teor de cinzas afetam a qualidade do produto e por meio destas avaliações podem ser indicadas as condições de armazenamento ou até mesmo identificar possíveis fraudes (Brasil, 2001). Além disso, o teor de compostos fenólicos e flavonoides influenciam diretamente na atividade biológica da própolis (Costa, 2015).

Os parâmetros analisados da própolis foram comparados com os limites estabelecidos na Portaria nº. 025 de 31 de julho de 2000 da Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Foi possível observar que a amostra de própolis estava dentro de todos os limites estabelecidos quanto ao percentual de umidade (5,9 %), ceras (17 %), cinzas (2,3 %), impureza mecânica (26 %), fenólicos (8,2 %), flavonoides (2,4 %) e solubilidade em etanol (70,2 %).

Foram testadas sete concentrações dos extratos obtidos e todos os extratos testados apresentaram ação antifúngica contra as três espécies de *Candida* utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em mg/mL dos extratos de própolis preparados de acordo com o planejamento experimental.

Planejamento	Extrato	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
A	I	2,50	2,50	3,33	4,58	2,08	2,92
	AC	3,75	3,75	1,87	1,87	1,46	1,46
	A	2,92	2,92	2,92	4,17	2,08	2,29
	AA	2,29	5,20	1,44	1,44	2,50	2,50
	AI	2,50	2,5	1,25	1,46	1,25	1,46
	ACI	2,50	3,54	1,46	1,88	1,25	3,75
	AAI	5,00	>5,00	2,5	>5,00	5,00	>5,00
	AC	3,75	3,75	1,87	1,87	1,46	1,46
B	E	2,50	3,33	2,50	2,92	2,50	2,50
	I	2,50	2,50	3,33	4,58	2,08	2,92
	ACE	2,50	2,50	0,76	0,76	1,25	1,46
	ACI	2,50	3,54	1,46	1,88	1,25	3,75
	EI	4,58	4,58	1,25	1,87	3,33	2,29
	EAI	5,00	>5,00	3,75	>5,00	5,00	>5,00

	A	2,92	2,92	2,92	4,17	2,08	2,29
	E	2,50	3,33	2,50	2,92	2,50	2,50
	I	2,50	2,5	3,33	4,58	2,08	2,92
C	AE	2,50	2,50	0,76	0,76	1,25	1,46
	AI	2,50	2,50	1,25	1,46	1,25	1,46
	EI	4,58	4,58	1,25	1,87	3,33	2,29
	EAI	5,00	>5,00	3,75	>5,00	5,00	>5,00

Fonte: Os autores, 2021.

A literatura acerca dos extratos de própolis é predominantemente composta por solventes extratores hidroalcoólicos, havendo uma lacuna de informações a respeito da capacidade de extração das substâncias biologicamente ativas por demais solventes orgânicos. Em uma visão geral, dos solventes testados que apresentaram menores concentrações de CIM e CFM foram da mistura de acetona + etanol variando de 0,76 a 2,50 mg/mL. Os baixos valores de CIM e CFM obtidos pela mistura de acetona + etanol podem ser atribuídos às diferentes características químicas dos solventes utilizados na extração. A acetona é um solvente polar aprótico, enquanto o etanol é polar prótico. Dessa forma, as interações estabelecidas durante a extração ocorrem com compostos distintos, conferindo a extração de uma maior quantidade de substâncias de interesse (Perez, 2018).

Os resultados de CIM e CFM foram menores para os extratos obtidos com acetona 100 % (1,46 a 3,75 mg/mL) quando comparados ao etanol 100 % (2,50 a 3,33 mg/mL), sugerindo maiores estudos utilizando a acetona como um solvente eficiente na extração de compostos antifúngicos de interesse. Notou-se nos dois experimentos reproduzidos, a repetição e proximidade dos resultados para as triplicatas das amostras dos extratos testados. Assim, fica assegurado que o método realizado foi capaz de extrair os compostos que apresentam a atividade antimicrobiana em todas as repetições.

Quanto aos demais solventes empregados, a mistura de isopropanol + acetato de etila apresentou atividade antifúngica mais próxima dos resultados da acetona + etanol, uma faixa de 1,25 a 2,50 mg/mL, reafirmando o bom potencial de extração quando utilizam-se solventes combinados.

Os testes de CIM utilizando DMSO e quitosana apontaram que nas concentrações utilizadas nos testes, estas substâncias não apresentaram atividade antimicrobiana contra as leveduras testadas. Para a atividade antifúngica do DMSO foram utilizadas concentrações $\leq 100 \mu\text{L/mL}$ (concentração usada na diluição do extrato seco de própolis) e para a quitosana, $\leq 20 \text{ mg/mL}$ (concentração correspondente a usada na SF). Assim, verificou-se que esses compostos não interferiram na determinação da CIM dos extratos de própolis. Já a nistatina testada apresentou resultado de CIM de 0,03 mg/mL e CFM 0,06 mg/mL.

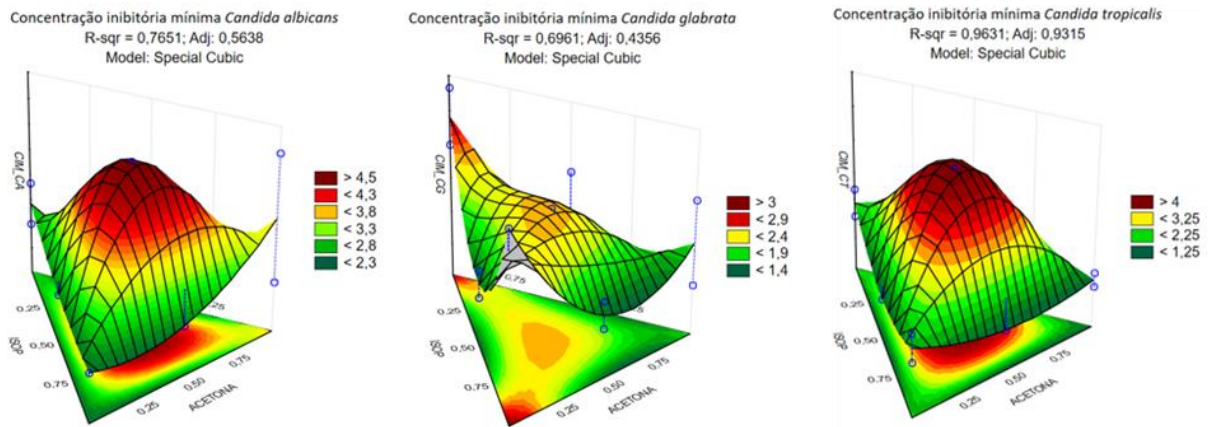
3.2 OTIMIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE

Por meio da Análise de Superfície de Resposta (ASR), primeiramente, foram obtidas as melhores proporções dos solventes extratores (etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol) para cada espécie de *Candida* em cada um dos planejamentos A, B e C separadamente.

Como é possível visualizar nos gráficos da Figura 1, a região mais esverdeada indica menor valor da CIM, ou seja, a região de localização do ponto ótimo dos solventes do extrato pela CIM. Portanto, no planejamento A, para a espécie *C. albicans*, observa-se que é o aumento da fração de isopropanol nas misturas binárias acetato de etila + isopropanol e acetona + isopropanol que atua diminuindo os valores

de CIM, que alcança o menor valor para o extrato obtido com isopropanol 100 %. Para *C. glabrata* os menores valores de CIM ocorrem para as misturas binárias de acetona + isopropanol e acetato de etila + isopropanol. Por fim, *C. tropicalis* apresentou os valores baixos de CIM nas regiões das misturas binárias de proporção semelhante de acetona + isopropanol e acetato de etila + isopropanol.

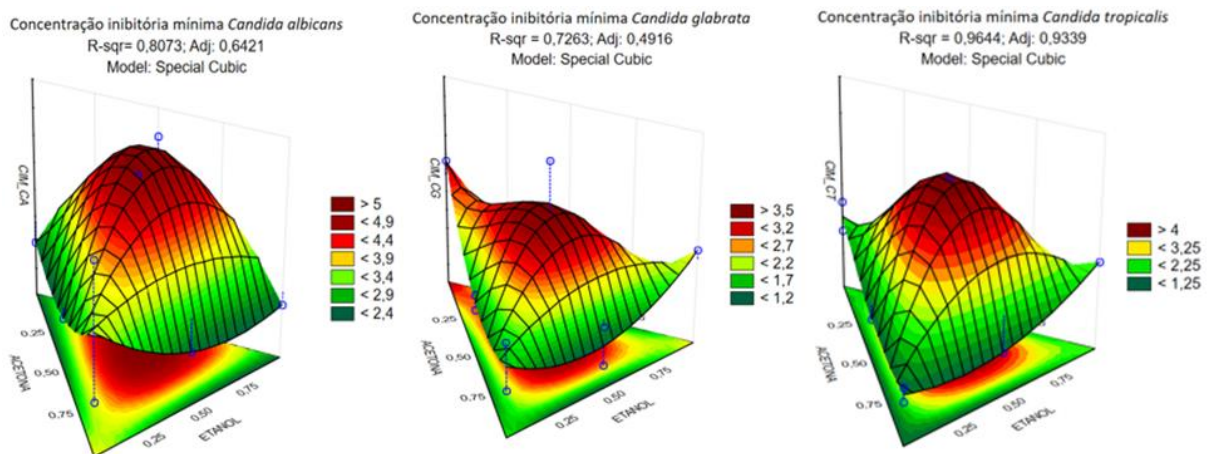
Figura 1 - Análise de Superfície de Resposta da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis verde preparados no planejamento A, para *Candida albicans* (CA), *Candida glabrata* (CG) e *Candida tropicalis* (CT). O planejamento A utilizou os solventes acetato de etila, acetona e isopropanol .



Fonte: Os autores, 2021.

Para o planejamento B (Figura 2), a mistura de acetona + etanol apresentou baixos valores de CIM contra *C. albicans*, sendo obtido resultado semelhante para a extração realizada com etanol 100 %. Na ASR da *C. glabrata*, os melhores resultados encontram-se na mistura binária de acetona + etanol com o menor valor de CIM localizado entre 75% acetona e 25 % de etanol. Para *C. tropicalis*, mais uma vez, os menores valores de CIM ocorrem para as misturas de acetona + etanol e acetona + isopropanol, cujos resultados foram próximos para acetona 100%.

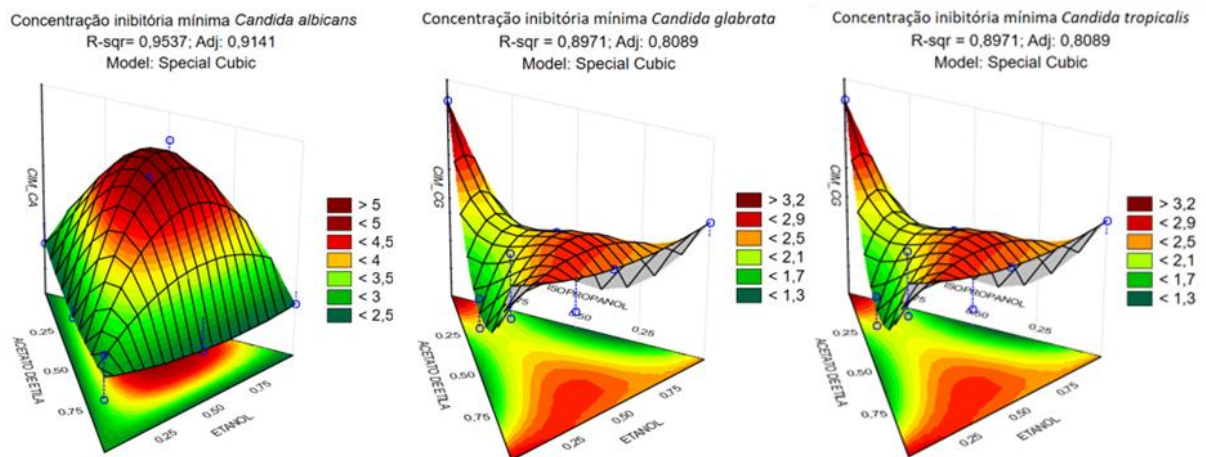
Figura 2 - Análise de Superfície de Resposta da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis verde preparados no planejamento B, para *Candida albicans* (CA), *Candida glabrata* (CG) e *Candida tropicalis* (CT). O planejamento A utilizou os solventes acetona, etanol e isopropanol .



Fonte: Os autores, 2021.

No planejamento C (Figura 3), apenas *C. albicans* foi sensível às menores CIMs para o extrato contendo acetato de etila + etanol, tendo resultados próximos para o extrato com etanol 100 %. As espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis*, por sua vez, apresentaram gráficos semelhantes, com os menores valores de CIM para a mistura de acetato de etila + isopropanol 1:1.

Figura 3 – Análise de Superfície de Resposta da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis verde preparados no planejamento C, para *Candida albicans* (CA), *Candida glabrata* (CG) e *Candida tropicalis* (CT). O planejamento A utilizou os solventes acetato de etila, etanol e isopropanol.



Fonte: Os autores, 2021.

Esses resultados foram aplicados à equação de desejabilidade global, a fim de encontrar estatisticamente a melhor condição de extração, a partir da minimização da CIM, considerando o mesmo grau de importância para todas as espécies testadas.

As misturas de solventes orgânicos como líquidos extratores apresentaram melhores resultados do que os solventes isolados e foram determinadas como condições ótimas de extração nos três planejamentos. Estes resultados já eram esperados, devido aos valores obtidos na CIM e CFM. Ademais, sabe-se que na composição da própolis estão presentes compostos com potenciais bioativos variados que dependem da sua solubilidade e da constante dielétrica do solvente para que ocorra a extração (Volpi & Bergonzini, 2006). Nesse sentido, é mais provável que sejam extraídos uma maior quantidade e variedade de compostos distintos utilizando uma combinação de solventes (Shahidi & Naczki, 1995).

As proporções determinadas pela ASR foram semelhantes às concentrações já testadas anteriormente. Além disso, os valores teóricos de CIM, gerados pela ASR, foram próximos aos valores de CIM obtidos experimentalmente (Tabela 3). Ou seja, os dados analisados apresentaram resultados condizentes, justificando os bons valores de ajuste (R-sqr) do modelo estatístico empregado.

Tabela 3 – Extratos de própolis verde otimizados por análise de superfície de resposta de acordo com os planejamentos experimentais A, B e C, valores teóricos estimados de CIM (concentração inibitória mínima) para cada extrato e valores experimentais de CIM obtidos.

Planejamento	Extrato otimizado	CIM esperada (mL/mg)	CIM experimental (mL/mg)
A	Acetona + isopropanol (ACI)	2,54 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
		1,41 para <i>C. glabrata</i>	1,46 para <i>C. glabrata</i>
		1,23 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>
B	Acetona + etanol (ACE)	2,50 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
		1,14 para <i>C. glabrata</i>	0,76 para <i>C. glabrata</i>
		1,25 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>
C	Acetato de etila + isopropanol (AI)	2,54 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
		1,45 para <i>C. glabrata</i>	1,25 para <i>C. glabrata</i>
		1,25 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>

Fonte: Os autores, 2021.

A acetona mais uma vez se destacou nos resultados, estando presente em 2 dos 3 extratos otimizados, bem como o isopropanol que embora não tenha desempenhado as melhores atividades na CIM e CFM isoladamente, se mostrou eficaz quando combinado com outros solventes. Esses resultados abrem margem para a investigação mais profunda do potencial extrativo dos solventes citados em relação à própolis.

3.3 BIOFILMES DE QUITOSANA INCORPORADOS COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Os extratos resultantes da otimização foram incorporados à formulação do biofilme de quitosana para avaliar suas influências em relação à CIM e algumas características físico-químicas quando combinados com a quitosana. Dessa forma, foram produzidos filmes, incorporando separadamente, os extratos de acetona + isopropanol (ACI), acetona + etanol (ACE) e acetato de etila + isopropanol (AI). Além disso, foram elaborados biofilmes sem nenhum extrato incorporado para o controle negativo (C-) e com nistatina incorporada para o controle positivo (C+).

Os biofilmes foram produzidos com sucesso pela técnica de casting. Em se tratando dos aspectos visuais, foi observada a coloração branca no controle negativo, enquanto o controle positivo exibiu tons amarelados. Ambos resultaram em uma película homogênea, de superfície lisa e opaca. Já os filmes contendo os extratos incorporados demonstraram coloração verde, também de nuances opacas e superfície lisa. Os filmes com ACI e AI apresentaram homogeneidade, mas em contrapartida, no filme com ACE, notaram-se pequenos pontos de cor verde mais intensa.

De acordo com Jiménez et al. (2012), para impedir problemas mecânicos e de conservação, o biofilme deve ter a espessura mais homogênea possível. Por isso, a espessura dos biofilmes é um parâmetro de controle fundamental. Apesar disso, na técnica de *casting* é difícil haver alta uniformidade de espessura em decorrência ao processo de secagem e evaporação do solvente (Sobral, 1999). Os resultados das características físico-químicas avaliadas do biofilme, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da espessura, permeabilidade de vapor de água (PVA) e solubilidade dos biofilmes, expressos em média e desvio padrão.

Biofilme	Espessura (mm)	PVA (g/diam ² kPa)	Solubilidade (%)
C+	0,18 ± 0,01	16,41 ± 0,97	30,44 ± 1,16
C-	0,18 ± 0,01	11,57 ± 1,12	27,62 ± 1,30
ACI	0,25 ± 0,01	12,63 ± 0,46	27,60 ± 1,43
ACE	0,16 ± 0,00	16,96 ± 1,15	27,72 ± 0,70
AI	0,23 ± 0,01	14,65 ± 1,04	28,73 ± 0,76

Fonte: Os autores, 2021.

A respeito da espessura, notou-se que os extratos ACI e AI aumentaram a espessura do filme. Este comportamento também foi observado em estudos de biofilmes de quitosana com óleos essenciais incorporados (Galindo, 2017).

Os fatores externos como temperatura, pressão e umidade relativa influenciam diretamente na PVA, por isso, o experimento foi reproduzido em condições externas padronizadas. No entanto, fatores físico-químicos também interferem nessa característica. Dentre as amostras de biofilme testadas, o filme com o extrato ACE incorporado apresentou maior resultado, seguido do filme C+ e esses mesmos biofilmes apresentaram anteriormente valores mais baixos de espessura. Como a PVA se trata da quantidade de vapor de água que consegue adentrar as placas seladas com o biofilme, espessuras menores permitem a permeação do vapor de modo mais fácil, pois a barreira a ser ultrapassada é menor (Wolf, 2007).

Os valores de PVA determinados são próximos aos exibidos por Nascimento et al. (2013) que desenvolveu experimentos com biofilmes de quitosana com argila na composição. O autor chegou a 10,29 g/diam²kPa para o biofilme apenas com quitosana e 13,2 g/diam²kPa para o filme com argila incorporada que foram resultados próximos aos obtidos nesse trabalho.

Já para a solubilidade, houve uma pequena variação de 27,60 a 30,44 %, indicando baixa solubilidade em água. O filme apresentou comportamento hidrofílico com toda a água absorvida resultando na expansão do material. Os valores encontrados compactuam com a solubilidade de 30,92 %, determinada por Hafsa et al. (2016) que também relatou o inchaço do filme. Já os autores Zaman et al. (2018) e Nascimento et al. (2013) encontraram solubilidades ainda mais baixas, 21,17 % para filme de 1,5 % (m/v) de quitosana e 12,5 % para filme de 2 % (m/v) de quitosana, respectivamente.

Para verificar a eficácia antifúngica dos biofilmes produzidos foram reproduzidas macrodiluições nas mesmas condições da microdiluição, mas dessa vez, testando fragmentos de biofilme de 1,0 cm² e 0,25 cm². Os resultados estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos biofilmes utilizando a técnica de macrodiluição. Os filmes foram testados contra as leveduras *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* e os resultados são expressos como positivo (+) e negativo (-) para atividade antimicrobiana.

Área do filme (cm ²)	Biofilme	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
1	C+	-	+	+
	C-	-	-	-
	ACI	-	+	+
	ACE	-	+	+
	AI	-	-	+
0,25	C+	-	+	+
	C-	-	-	-
	ACI	-	+	+
	ACE	-	+	-
	AI	-	-	+

Fonte: Os autores, 2021.

O biofilme incorporado com extrato ACI possibilitou a liberação do extrato no meio de cultura e inibiu o crescimento de *C. glabrata* e *C. tropicalis* quando testado com 1,0 e 0,25 cm². Já o biofilme contendo ACE também apresentou atividade antifúngica para essas duas espécies quando testado com 1,0 cm², enquanto que com 0,25 cm² sua eficácia foi comprovada apenas para *C. glabrata*. O biofilme com AI foi o único a demonstrar atividade apenas para espécie *C. tropicalis*. No entanto, manteve sua atividade mesmo utilizando uma fração menor do biofilme.

Nenhum dos biofilmes testados inibiu o crescimento da *C. albicans*. Mesmo sendo de prévio conhecimento que essa espécie tem maior resistência antifúngica (Rosseto et al., 2016), pode-se atribuir esse comportamento à liberação dos compostos pelo biofilme, uma vez que as moléculas de quitosana podem envolver o ativo durante a incorporação e podem restringir a sua difusão para o meio em quantidade necessária para inibir a *C. albicans* (Lamim, 2006). Para verificar as causas desse fato, são necessários estudos adicionais.

Em todas as placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol estriadas com o conteúdo dos tubos que apresentaram atividade antimicrobiana ocorreu o crescimento de poucas colônias de *Candida sp.* Assim, fica determinada, que nas condições avaliadas, a atividade antimicrobiana dos biofilmes testados é de caráter inibitório e não fungicida.

4 CONCLUSÃO

As propriedades da própolis já são bastante conhecidas na área de produtos naturais. Diante disso, nos últimos anos, as pesquisas científicas relacionadas a investigação e comprovação destas propriedades estão se intensificando.

Neste estudo, foi possível verificar que em relação aos solventes utilizados para o preparo dos extratos de própolis, as misturas de acetona + isopropanol (ACI do planejamento A); acetona + etanol (ACE do planejamento B) e acetato de etila + isopropanol (AI do planejamento C) apresentaram as melhores CIM e CFM com o mesmo nível de prioridade para todas as espécies de *Candida* testadas. Desta forma, a produção dos biofilmes ocorreu com a incorporação desses extratos separadamente.

Os biofilmes testados demonstraram que a adição dos extratos de própolis verde ou nistatina à fórmula não teve influência expressiva na solubilidade em água,

enquanto a permeação de vapor de água sofreu pouco aumento, quando comparados com o controle negativo.

Por fim, constatou-se a atividade inibitória dos biofilmes com extratos orgânicos de própolis verde frente a *C. tropicalis* e a *C. glabrata*, enfatizando a viabilidade de uso desses biomateriais como barreira de proteção e inibição de microrganismos patogênicos. Entre os biofilmes testados, o que teve a mistura de acetona + isopropanol (ACI) incorporada, demonstrou os melhores resultados de atividade antifúngica, agindo contra *C. tropicalis* e *C. glabrata* com 1,0 cm² e 0,25 cm². Esses resultados possibilitam uma nova gama de investigações científicas relacionadas ao desenvolvimento de bioprodutos à base de quitosana e extratos de própolis.

REFERÊNCIAS

- Araújo, G. K. P. (2014). *Desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis*. [Trabalho de Conclusão de Curso Universidade Tecnológica Federal do Paraná]. RIUT <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/6545>
- ASTM Standard D882-02. (2002). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting Annual book of ASTM standards*. ASTM International.
- Brasil. Ministério da Agricultura. (2001). Instrução Normativa nº 3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- Breyer, H.F.E.; Breyer, E.D.H.; Cella, I. (2016). *Produção e beneficiamento da própolis (Boletim técnico, 138)*. https://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/apicultura/acervo/BD138-producao-beneficiamento-propolis.pdf
- Costa, B. (2015). *Síntese, caracterização e efeito inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na aderência e no biofilme maduro de Streptococcus mutans*. Universidade Federal da Paraíba.
- Dos Santos, C. R., Arcenio, F., Carvalho, E. S., Lúcio, E. M. R. A., Araújo, G. L., Teixeira, L. A., Sharapin, N. & Rocha, L. (2003). Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 71-74. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300027>
- Galindo, M. V. (2017). *Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo*. [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná]. RIUT <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12393>
- Hafsa, J., ali Smach, M., Khedher, M. R. B., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 356-364. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.050>

- Jimenez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058-2076.
- Lamim, R. (2006). *Quitosana e N-carboximetilquitosana: desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas*. [Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Itajaí].
- Limberger, M. B. C. (2017). *Desenvolvimento de filme polimérico combinado a ingrediente com propriedades antioxidantes aplicados em maçãs*. [Trabalho de Conclusão de Curso, Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná].
- Mariano, M. M., & Hori, J. I. (2019). O potencial terapêutico da própolis verde Brasileira. *e-Revista Facitec*, 10(1). <http://periodicos.estacio.br/index.php/e-revistafacitec/article/view/6219>
- Nascimento, S. D., de Oliveira, T. A., dos Santos, F. K. G., Aroucha, E. M. M., & de Lima Leite, R. H. (2013). Efeito da adição de argila nas propriedades de biofilme de quitosana. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(1), 44.
<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2208/2274>
- NCCLS. (2002). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada (2a.ed)*. Norma M27-A2 do NCCLS.
http://www7.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPAS1M38-A.pdf
- Perez, N. (2018). *Investigação da influência do solvente nas transições eletrônicas e na liberação de CO de carboxilatostrinucleares de rutênio*. [Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo].
- Rosseto, H. C., Oliveira, K. I., Tobaldini-Valerio, F. K., Toledo, L. A. S., De Francisco, L. M. B., Svidzinski, T. I. E. & Bruschi, M. L. (2016). Atividade antifúngica do extrato do subproduto da própolis frente a espécies de *Candida* sp. *Anais do II Congresso Paranaense de Microbiologia, Simpósio Sul Americano de Microbiologia Ambiental*. UEL
- Sforcin, J. M., Fernandes Júnior, A., Lopes, C. A. M., Funari, S. R. C., & Bankova, V. (2001). Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7, 139-144..
<https://doi.org/10.1590/S0104-79302001000100009>
- Shahidi, F. & Naczki, M. (1995). *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Technomic Publishing.
- Simões, L. S. (2014). *Extração e caracterização de oleorresina de Capsicum obtida a partir de pimentas malagueta (Capsicum frutescens) e dedo-de-moça (Capsicum baccatum var. pendulum)*. Universidade Federal de Viçosa.

- Sobral, P. J. A. (1999). Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. *Ciência & Engenharia*, 8(1), 60-67.
- Spin Neto, R., Pavone, C., Freitas, R. D., Marcantonio, R. A. C., & Marcantonio Jr, E. (2008). Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37(2), 155-161.
- Vidal, M. F. (2021). Potencial da produção de própolis no Nordeste. *Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil*, 6(153). https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/728/1/2021_CDS_153.pdf
- Volpi, N. & Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC- electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42(3), 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.017>
- Wolf, K. (2007). *Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno*. [Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas].
- Zaman, N.B.K; Lin, N.K. & Phing, P.L. (2018). Chitosan film incorporated with *Garcinia atroviridis* for the packaging of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Animal Science and Veterinary*, 42(6), 666-675. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426019918>