

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODÔLFO ELLESON DOS SANTOS ARRUDA

**EFEITO DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E TRIPANOSSOMICIDA DE EXTRATOS
BRUTOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

MACEIÓ-AL

2019

RODÔLFO ELLESON DOS SANTOS ARRUDA

**EFEITO DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E TRIPANOSSOMICIDA DE EXTRATOS
BRUTOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Escola de Enfermagem e Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento.

MACEIÓ-AL

2019

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

A779e Arruda, Rodôlfo Elleson dos Santos.

Efeito da sazonalidade na composição química e atividades antimicrobiana, antioxidante e tripanossomicida de extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas / Rodôlfo Elleson dos Santos Arruda. - 2019.

92 f. : il.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 79-92.

1. Própolis - Alagoas. 2. Flavonoides. 3. Compostos fenólicos. 4. Anti-infecciosos. 5. Antioxidantes. 6. Tripanossomicidas. I. Título.

CDU: 615.3:638.135

RODÔLFO ELLESON DOS SANTOS ARRUDA

**EFEITO DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E TRIPANOSSOMICIDA DE EXTRATOS
BRUTOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Escola de Enfermagem e Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pela comissão julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Ticiano Gomes do Nascimento

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

(Presidente)

Sâmia Andrcia S. da Silva

Prof.^a Dr.^a Sâmia Andrcia Souza da Silva

(Examinadora Interna)

Daniela Santos Anunciação

Prof.^a Dr.^a Daniela Santos Anunciação

(Examinadora externa)

Adilson Rodrigues Sabino

Prof. Dr. Adilson Rodrigues Sabino

(Examinador externo)

Aprovado em: 29 de novembro de 2018

Local de defesa: Universidade Federal de Alagoas

RESUMO

A própolis é uma substância complexa e é composta de substâncias como: flavonoides, esteróides, ácidos fenólicos, gutiferas, entre outros compostos. O interesse em relação a este produto de origem natural é oriundo do potencial farmacológico que ela possui, por exemplo, antibacteriano, antifúngica, cicatrizante, anticancerígeno, anti-HIV, antioxidante. No Brasil a própolis vermelha foi classificada como o décimo terceiro grupo e a própolis vermelha de Alagoas é produzida por abelhas da espécie *Apis mellífera* e sua origem botânica é a planta *Dalbergia ecastophyllum*. Diante da existência da necessidade de padronização dos bioprodutos oriundo da PVA, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características da própolis vermelha de Alagoas durante estudo de sazonalidade, através de ensaios químico-biológicos usando os métodos de determinação de: fenóis totais, atividade antioxidante, atividade anti-tripanosossoma e atividade antimicrobiana coletadas em três apiários de Alagoas. As amostras foram coletadas mensalmente nos apiários Ilha do Porto, Primavera e Paripueira, localizados nos municípios de Marechal Deodoro, dois primeiros, e Paripueira, respectivamente. Os ensaios de fenóis totais e flavonoides totais pelas metodologias de: UV-vis, LC-DAD e LC-MS, demonstraram variabilidade da concentração ao longo do ciclo de 12 meses com picos de concentração máximo nos meses de julho e agosto, setembro e novembro para flavonoides e picos de concentração máximo entre novembro e março para gutiferas. Pode-se observar através da atividade antioxidante e da concentração inibitória mínima (CIM) uma relação inversa com a concentração de flavonoides, em que altos valores de IC₅₀ (51.0 µg/mL) da atividade antioxidante e altos valores de CIM (210 µg/mL) foram observados nos meses de menor concentração de flavonoides. Todas as amostras mostraram atividade contra tripomastigotas, possuindo eficiência frente a esse patógeno. Os dados de correlação multivariada demonstraram correlação entre os 4 métodos analíticos utilizados para quantificação de flavonoides com correlação de Pearson maior que 60%. Correlação multivariada também demonstrada entre concentração de flavonoides e a sazonalidade. Gutiferas são mais concentradas no extrato quando a incidência solar é maior que 2000 kJ/m² e flavonoides foram mais intensos nos meses de chuvas com intensidade maior que 260 mm de chuvas com umidade relativa acima de 78%. A produção de fenóis, flavonoides, e gutiferas é dependente da sazonalidade climática.

Palavras-chave: Própolis vermelha de Alagoas, flavonoides, ácido fenólicos.

ABSTRACT

Propolis is a complex substance and is composed of substances such as: flavonoids, steroids, phenolic acids, guttiferones, among other compounds. Interest in this product of natural origin comes from the pharmacological potential that it possesses, for example, antibacterial, antifungal, healing, anticancer, anti-HIV, antioxidant. In Brazil the red propolis was classified as the thirteenth group and the red propolis of Alagoas is produced by bees of the *Apis mellifera* species and its botanical origin is the *Dalbergia ecastophyllum* plant. Given the existence of the need for standardization of bioproducts from PVA, the objective of this work was to evaluate the characteristics of the red propolis of Alagoas during a seasonal study, through chemical-biological tests using the methods of determination of: total phenols, antioxidant activity, anti-trypanosome activity and antimicrobial activity collected in three apiaries of Alagoas. Samples were collected monthly in the apiary islands of Porto, Primavera and Paripueira, located in the municipalities of Marechal Deodoro, first two, and Paripueira, respectively. The total phenolics and total flavonoids tests by UV-vis, LC-DAD and LC-MS showed a variability of the concentration over the 12-month cycle with peaks of maximum concentration in the months of July and August, September and November for flavonoids and peaks of maximum concentration between November and March for guttiferones. An inverse relationship with the flavonoid concentration can be observed through antioxidant activity and minimal inhibitory concentration (MIC), in which high IC₅₀ (51.0 µg / mL) of the antioxidant activity and high MIC values (210 µg / mL) were observed in the months of lower concentration of flavonoids. All samples showed activity against trypomastigotes, having efficiency against this pathogen. The multivariate correlation data showed a correlation between the 4 analytical methods used for quantification of flavonoids with Pearson correlation greater than 60%. Multivariate correlation was also demonstrated between flavonoid concentration and seasonality. Guttiferones are more concentrated in the extract when the solar incidence is higher than 2000 kJ / m² and flavonoids were more intense in the months of rains with intensity greater than 260 mm of rainfall with relative humidity above 78%. The production of phenols, flavonoids, and guttiferones is dependent on climatic seasonality.

Key words: Red propolis of Alagoas, flavonoids and phenolic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonoides.	18
Figura 2: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.	27
Figura 3: Reação radicalar de redução do DPPH por uma espécie antioxidante (AH).	28
Figura 4: Reação química da redução da resazurina em resarufina, com mudança de cor.	29
Figura 5: Perfil cromatográfico das tinturas de própolis vermelhas na concentração de 1,0 mg/mL. Padrões analíticos: (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido cafeico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina (7) liquiritigenina, (8) quercetina, (9) luteolina, (10) isoliquiritigenina, (11) formononetina, (12) pinocembrina, (13) biochanina A e (14) crisina.	39
Figura 6: Perfil cromatográfico da própolis do apiário Ilha do Porto (A) e própolis Primavera (B) da própolis vermelha utilizando LC/Orbitrap/ESI/FTMS.	40
Figura 7: Determinação da concentração de flavonoides usando HPLC/UV/DAD para biomarcadores específicos. (A) e (B) apiário Ilha do Porto, (C) e (D) apiário Primavera, (E) e (F) apiário Paripueira.	44
Figura 8: Determinação da concentração de flavonoides usando LC/ESI/Orbitrap/FTMS para biomarcadores específicos. (A) e (B) Ilha do Porto, (C) e (D).	46
Figura 9: Determinação de gutiferas usando LC/Orbitrap/FTMS: (A) Ilha do Porto, (B) Primavera e (C) Paripueira.	47
Figura 10: Perfil sazonal de flavonoides (A.1, B.1, C.1) e fenóis totais (A.2, B.2, C.2) de extratos brutos de PVA dos apiários (Ilha do Porto: A, Primavera: B, Paripueira: C).	51
Figura 11: Perfil de atividade antioxidante e IC ₅₀ do apiário Ilha do Porto durante ciclo de 12 meses de sazonalidade.	53
Figura 12: Perfil de atividade antioxidante e IC ₅₀ do apiário Paripueira durante ciclo de 12 meses de sazonalidade.	53

- Figura 13: Perfil de atividade antioxidante e IC₅₀ do apiário Primavera durante 54 ciclo de 12 meses de sazonalidade.
- Figura 14: Correlação entre IC₅₀ do método DPPH e concentrações de 56 flavonoides e gutiferas E para a própolis A (A) e própolis C (B). Correlação de Pearson entre IC₅₀ do método DPPH e formononetina (C), flavonoides totais (D), gutiferas E (E) e soma da concentração total de compostos fenólicos (F) usando concentrações dos dados de LC-Orbitrap-FTMS.
- Figura 15: Comparação entre os métodos de fenóis totais, UV-Vis, LC-DAD E 63 LC-MS em relação ao apiário Ilha do Porto (A) e concentração normalizada (B).
- Figura 16: Correlação em matrizes dos métodos de fenóis totais, UV-Vis, LC- 64 DAD e LC-MS do apiário Ilha do Porto.
- Figura 17: Comparação entre os métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS 65 em relação ao apiário Paripueira(A) e concentração normalizada (B).
- Figura 18: Correlação em matrizes dos métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD e 66 LC-MS do apiário Paripueira.
- Figura 19: Comparação entre os métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS 67 em relação aos flavonoides do apiário Primavera(A) e concentração normalizada (B).
- Figura 20: Correlação em matrizes dos métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD e 68 LC-MS do apiário Primavera.
- Figura 21: Comparação entre os métodos de fenóis totais, UV-Vis, LC-DAD E 69 LC-MS em relação à concentração de flavonoides e gutiferas do apiário Ilha do Porto (A) e concentração normalizada (B).
- Figura 22: Comparação entre os métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS 70 em relação a concentração de flavonoides e gutiferas do apiário Paripueira (A) e concentração normalizada (B).
- Figura 23: Comparação entre os métodos de fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS 71 em relação à concentração de flavonoides e gutiferas do apiário Primavera (A) e concentração normalizada (B).
- Figura 24: Variação na concentração de gutiferas em relação à luz solar e 72 temperatura.

Figura 25:	Variação na concentração de gutiferonas em relação à radiação solar e intensidade das chuvas.	73
Figura 26:	Variação da concentração de flavonoides em relação à umidade relativa e intensidade das chuvas.	74
Figura 27:	Variação da concentração de flavonoides em relação à radiação solar e intensidade de chuvas.	75
Figura 28:	Análise de PCA e análise de correlação PLS-DA para concentração inibitória mínima de <i>Staphylococcus aureus</i> e concentração de flavonoides comparando própolis vermelha Ilha do Porto (A), Primavera (B) e Paripueira (C).	76
Figura 29:	Análise de PCA e análise de correlação PLS-DA para concentração inibitória mínima de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e concentração de flavonoides comparando própolis vermelha Ilha do Porto (A), Primavera (B) e Paripueira (C).	77

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Classificação da própolis brasileira.	17
Tabela 2: Marcadores identificados na própolis vermelha brasileira em tinturas utilizando LC/ESI/FTMS/Orbitrap.	41
Tabela 3: Concentração Inibitória (IC ₅₀) do extrato de própolis vermelho brasileiro contra o radical DPPH durante o estudo de sazonalidade (março/2011 a fevereiro/2012).	55
Tabela 4: Inibição do crescimento (%) do <i>Trypanossoma brucei brucei</i> S0247 frente ao extrato bruto da própolis durante o estudo de sazonalidade (março/2011 – fevereiro/2012).	58
Tabela 5: Atividade antimicrobiana da própolis A (Ilha do Porto) contra <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	59
Tabela 6: Atividade antimicrobiana da própolis B (Primavera) contra <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	60
Tabela 7: Atividade antimicrobiana da própolis C (Paripueira) contra <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	60
Tabela 8: Atividade antimicrobiana da própolis A (Ilha do Porto) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	61
Tabela 9: Atividade antimicrobiana da própolis B (Primavera) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	61
Tabela 10: Atividade antimicrobiana da própolis C (Paripueira) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.	62
Tabela 11: Correlação de Pearson do apiário Ilha do Porto.	64
Tabela 12: Correlação de Pearson do apiário Paripueira.	66

QUADROS

	Pág.
Quadro 1: Exemplos de estruturas isoladas da própolis vermelha.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

• ABS	Absorbância
• ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
• CDKS	Cyclin dependent kinases/ Cinases dependentes de ciclina
• CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ High Performance Liquid Chromatography
• CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
• CIM	Concentração Inibitória Mínima
• COX	Ciclo-Oxigenase
• DCBEN	2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano
• DDA	Diode array
• DHCA	Ácido 3,5-Diprenil-4-Hidroxicinâmico
• DNA	Ácido Desoxirribonucleico
• DPB	2,2-Dimetil-6-carboxietenil-8-Prenil-2H-1-Benzopirano
• DPPH	2,2- Difenil-1-Picril-Hidrazila
• DMSO	Dimetilsufóxido
• ESI	Electrospray ionization
• FTMS	Fourier-Transform Mass Spectrometry
• LC	Liquid Chromatography
• LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
• LC/UV/DAD	Liquid Chromatography with UV/Diode Array Detection
• HIV	Human Immunodeficiency Virus
• HMI-9	Ivitrogen
• IC	Inhibitory concentration
• THA	Tripanossomíase Africana
• PCA	Principal Components Analysis
• PLS-DA	Projection to Latent Structures Discriminant Analysis

- PM Peso Molecular
- PVA Própolis Vermelha de Alagoas
- UV-vis Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Própolis - Generalidades.....	17
2.2 Tipos de própolis	17
2.3 Composição química da própolis	19
2.4 Própolis vermelha de Alagoas (PVA)	22
2.5 Atividades biológicas	22
2.5.1 Atividade antimicrobiana	23
2.5.2 Atividade tripanossomicida	24
2.6 Sazonalidade	26
2.7 Método para quantificação de fenóis totais	27
2.8 Método de avaliação da capacidade antioxidante pelo uso de radical DPPH	28
2.9 Método de determinação da atividade tripanossomicida por alamar blue.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Reagentes químicos e biológicos.....	32
4.2 Coleta das amostras de própolis vermelha	32
4.4 Ensaio químicos	33
4.4.1 Determinação da atividade antioxidante com DPPH	33
4.4.2 Determinação de flavonoides por análise em UV-Vis	34
4.4.3 Determinação de fenóis totais.....	35
4.4.4 Determinação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida (LC)	35
4.5 Ensaio biológicos	37

4.5.1 Determinação da atividade tripanossomicida	37
4.5.2 Teste de atividade antimicrobiana contra cepas gram positivos e gram negativas ..	37
4.6 Correlação de dados experimentais usando estatística multivariada.....	38
4.7 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Identificação de marcadores da própolis vermelha por LC-UV e LC/Orbitrap/FTMS..	40
5.2. Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios LC-UV e LC-MS	44
5.3 Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios químicos	49
5.3.1 Determinação de flavonoides e fenóis totais nos extratos de própolis vermelha	49
5.3.2 Capacidade antioxidante dos extratos de PVA estudo de sazonalidade	53
5.4. Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios biológicos	58
5.4.1 Ensaio tripanossomicida	58
5.5. Estudos de correlação multivariada	63
5.5.1 Estudo de correlação multivariada entre métodos analíticos de quantificação de flavonoides	63
5.5.2 Estudo de correlação multivariada entre métodos analíticos de quantificação de flavonoides e gutiferas.....	69
5.5.3. Estudo de correlação multivariada-químico e meteorológico durante estudo de sazonalidade.....	73
5.5.4 Estudo de correlação multivariada entre ensaios químicos e microbiológicos	76
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa, que as abelhas (*Apis mellifera*) produzem a partir dos exsudatos de várias plantas que cercam o apiário. A própolis é regularmente composta de 50 % de resina (contendo flavonoides e ácidos fenólicos), 30 % de cera, 10 % de óleos essenciais, 5 % de pólen e 5% de outros compostos orgânicos, incluindo aminoácidos, vitaminas e minerais. As abelhas usam a própolis para o benefício da colméia, como proteção contra chuva, vento e umidade (BUENO-SILVA et al., 2013).

Os tipos de própolis são caracterizados em função do ambiente onde estão inseridas, sendo influenciadas pelo clima, região geográfica, temperatura, vegetação, entre outros fatores. No Brasil eram catalogadas doze tipos de própolis, algumas destas como a verde, presente na região sudeste; já a própolis vermelha foi catalogada como o décimo terceiro grupo existente no país, presente na região nordeste, principalmente nos estados de Alagoas, Paraíba, Bahia e Pernambuco, possuindo origem botânica na planta *Dalbergia ecastophyllum* (FRANCHIN et al., 2018).

Obter informações sobre a composição da própolis vermelha de Alagoas torna-se cada vez mais necessária, visto que esse produto natural ganhou alta visibilidade e importância frente à economia do estado, exigindo que a padronização lote a lote seja imprescindível para as indústrias farmacêutica e alimentícia, resultando em ganho não só para o consumidor, mas também para o pequeno, médio e grande produtor. Neste sentido a importância para o estudo de sazonalidade está vinculada ao controle de qualidade da matéria prima, pois a partir da mesma consegue-se observar a variação de compostos bioativos e, consequentemente, minimizar essa variabilidade na composição química do produto final, mantendo sua qualidade nutracêutica, bem como, seus efeitos biológicos e terapêuticos deste bioproduto.

Com base nestas premissas, o objetivo desse trabalho foi realizar estudo de sazonalidade da própolis vermelha de Alagoas produzidas em 3 apiários monitorado pela composição química, atividade antioxidante, ação tripanossomicida e atividade antimicrobiana, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012. Monitoramento de compostos fenólicos foi realizado por diferentes técnicas analíticas e monitoramento da atividade biológica através de ensaios microbiológico e tripanossomicida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Própolis - Generalidades

O significado da palavra própolis vem do grego, *Pro* “em defesa” e *Polis* “cidade”, proteção da colméia (RAMOS; MIRANDA, 2007). A própolis é um produto proveniente das abelhas que coletam resinas de diversas partes da planta, tais como: brotos das folhas, pólen, ramos e posteriormente adicionam saliva a ela. Diversas espécies de abelhas conseguem produzir esse material, entre elas a *Apis mellifera*. Na colméia, esse produto possui inúmeras funções, como a reparação de danos ou rachaduras, dessa forma protegendo contra a entrada de micro-organismos. Além disso, relaciona-se com as propriedades mecânicas, assim utilizada tanto na construção, quanto na adaptação da colméia e ainda garante um ambiente asséptico (FUNARI; FERRO, 2006). Outro uso é a mumificação de insetos mortos, evitando a contaminação da colméia por sua decomposição (BONAMIGO et al., 2017).

A utilização desta resina por humanos é algo bastante antigo. Durante séculos este composto resinoso vem sendo empregado como remédio popular em várias regiões do planeta, principalmente por sua atividade antimicrobiana, já evidenciada nas colméias (OMAR et al., 2016). O uso da própolis já era descrita nos povos da antiguidade, os egípcios também utilizavam a própolis para embalsamar os mortos (OSÉS et al., 2016; DANTAS-SILVA et al., 2017). Os gregos denominavam a própolis como “cola de abelha”, e reconheciam suas propriedades medicinais, utilizando-a como antisséptico e cicatrizante (DANTA-SILVA et al., 2017). Durante a guerra os soldados romanos utilizavam com frequência a própolis, como medicamento de emergência em suas feridas. Com isso seu uso foi se disseminado cada vez mais, e durante os séculos XVII e XX tornou-se o remédio mais popular na Europa (BRIDI et al., 2015).

A composição química da própolis está relacionada diretamente com o ecossistema onde o apiário está inserido, ou seja, a biodiversidade da região que as abelhas retiram as substâncias para a sua produção. Portanto, os componentes que estarão presentes na própolis, são característicos à composição do material vegetal coletado da sua região (CABRAL et al., 2009).

2.2 Tipos de própolis

A própolis era classificada em 12 grupos, essa divisão é baseada nas características

físico químicas, e em relação à sua localização, cinco grupos estão na região sul, um na região sudeste e seis no nordeste do Brasil. Dentre alguns exemplos estão a própolis do grupo 3, sendo catalogada como resina do botão floral de *Populus* (*Salicaceae*). Já as origens botânicas das própolis dos grupos 6 e 12, são a *Hyptis divaricata* (*Lamiaceae*) e *Baccharis dracunculifolia* (*Asteracea*), respectivamente, tabela 1 (PARK et al., 2006).

Há alguns anos foi catalogada um novo tipo de própolis no Brasil, a própolis vermelha, oriunda dos manguezais do litoral e das margens de rios no Nordeste (Park et al., 2002). Cujas origens botânicas foram identificadas como sendo resina da espécie *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo de bugio” (SILVA et al., 2006).

Tabela 1- Classificação da própolis brasileira.

Própolis	Cor	Origem geográfica	Origem botânica	Composição química	Referência
Grupo 1	Amarelo	Sul (RS)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 2	Castanho claro	Sul (RS)	-	-	PARK et al., 2002; SILVA 2008
Grupo 3	Castanho escuro	Sul (PR)	<i>Populus alba</i>	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 4	Castanho claro	Sul (PR)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 5	Marrom esverdeado	Sul (PR)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 6	Marrom avermelhado	Nordeste (BA)	<i>Hyptis divaricata</i>	Ésteres de ácido compostos aromáticos, os graxos, Terpenos, flavonoides	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 7	Marrom esverdeado	Nordeste (BA)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 8	Castanho escuro	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 9	Amarelo	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA 2008
Grupo 10	Amarelo escuro	Nordeste (CE)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 11	Amarelo	Nordeste (PI)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 12	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste (MG, SP)	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, Alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos.	PARK, 2004 e 2002; FUNARI e FERRO, 2006; MARCUCCI, 2007; BANKOVA, 2000; SOUSA, 2007
Grupo 13	Vermelha	Nordeste (AL,	<i>Dalbergia</i>	Flavonoides: pinocem-	SILVA et al., 2008;

BA, PB)	<i>ecastophillum</i>	brina, Formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros); Ácido: fenólico (ácido felúrico), Gutiferonas	Daugusch et al., 2007; SIQUEIRA,
---------	----------------------	---	----------------------------------

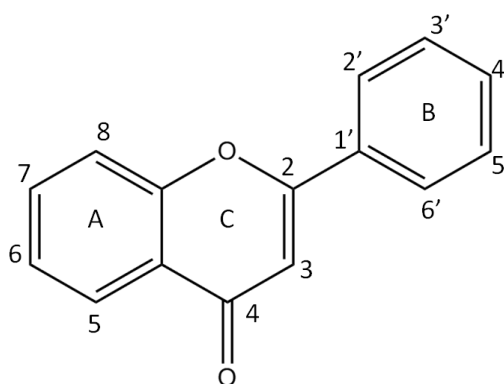
2.3 Composição química da própolis

A própolis é considerada um dos produtos mais heterogêneos produzidos por fontes naturais e pesquisas mostram que mais de 300 componentes estão presentes em diferentes tipos de própolis. Dentre esses compostos já identificados, observa-se a presença de ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, aldeídos aromáticos, alcoóis, diterpenos, sesquiterpenos, vitaminas, minerais, lignanas, aminoácidos e ácidos graxos (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013).

Dentre os compostos presentes nesse produto de origem natural, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, pois ações terapêuticas são atribuídas a eles (FUNARI; FERRO, 2006). Os flavonoides são definidos como compostos fenólicos, que possuem origem de plantas, que atuam em variados processos fisiológicos, por exemplo, na absorção de vitaminas, cicatrização, dentre outras funções (BARBOSA, 2009). Na figura 1, fica explicitado a estrutura geral desta classe.

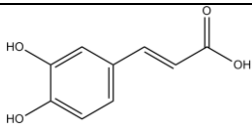
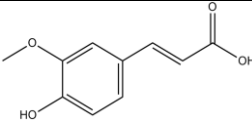
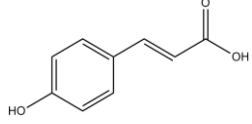
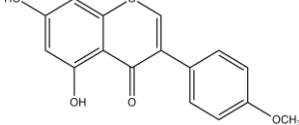
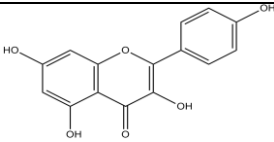
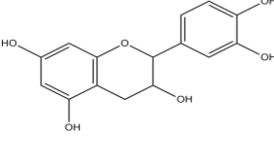
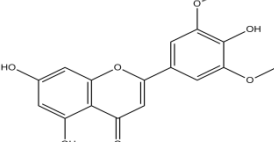
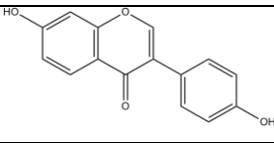
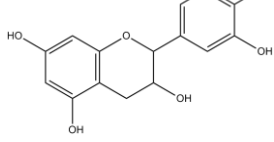
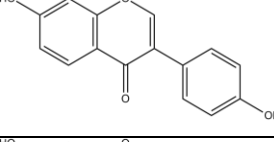
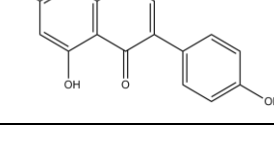
Flavonoides representam mais de 60% da composição da própolis vermelha brasileira, como: flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (REGUEIRA NETO et al., 2017).

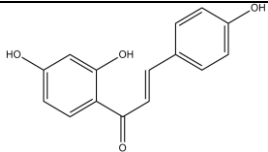
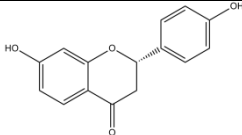
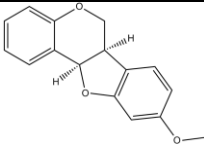
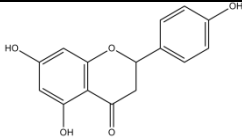
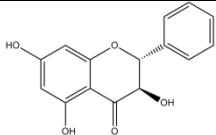
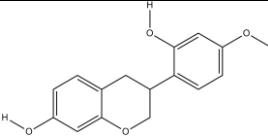
Figura 1- Núcleo fundamental dos flavonoides



Fonte: SIMÕES, 2007.

Quadro 1- Exemplos de estruturas isoladas da própolis vermelha.

Estrutura	Nome
	Ácido caféico
	Ácido ferúlico
	Ácido p-cumárico
	Biochanina A
	Kampferol
	Catequina
	Crisina
	Daidzeína
	Epicatequina
	Formononetina
	Genisteína

	Isoliquiritigenina
	Liquiritigenina
	Medicarpina
	Narigenina
	Pinombaquisina
	Vestitol

FONTE: DE MENDONÇA, 2015.

Os ácidos fenólicos são identificados por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e ainda um ou mais grupamentos hidroxílicos ou metoxílicos, dessa forma conferindo características antioxidantes, a organismos, e alimentos, possuindo um potencial de uso para tratamento de enfermidades como: como câncer, doenças vasculares, entre outras (BRAVO, 1998). Dividem-se em três grupos principais, existindo diferenças significativas entre eles. O primeiro e o mais simples encontrado na natureza é o ácido benzóico e derivados, que possuem sete átomos de carbono. Os ácidos cinâmicos formam o segundo grupo, e em sua estrutura estão contidas as cumarinas e nove átomos de carbono, que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico. Os ácidos fenólicos podem apresentar-se tanto em sua forma natural, ligados entre si ou com outros compostos (SOARES, 2002).

2.4 Própolis vermelha de Alagoas (PVA)

A própolis vermelha foi classificada como um novo tipo de própolis brasileira, o tipo 13 (SILVA et al., 2007), possuindo origem botânica na *Dalbergia ecastophillum*, conhecida como “rabo de bugio”, responsável por sua coloração avermelhada. Esse tipo de própolis se assemelha à própolis encontrada em Cuba e Venezuela, as quais possuem origem botânica na *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata*, respectivamente. Essas similaridades estão relacionadas à presença de isoflavonas e benzofenonas isopreniladas. A própolis encontrada em Maceió-AL foi a primeira evidenciada com essas características.

Alencar et al., (2007) conseguiu identificar quatro isoflavonas presentes na composição da própolis vermelha, até então não encontradas nos outros 12 grupos de própolis, dentre estas isoflavonas estão a dihidroxisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona. As pesquisas realizadas por Cabral et al., 2009, não conseguiram quantificar a grande maioria das substâncias usadas como padrão nas demais própolis, como ácido cinâmico, encontrada na própolis verde, assim demonstrando uma composição única da própolis vermelha, ratificando o que foi mostrado por Alencar et al., 2007.

A própolis vermelha de Alagoas possui um perfil fitoquímico semelhante à própolis encontrada em uma região de Cuba chamada de Pinar Del Rio, mas se diferenciando, pois esta não possui benzofenona. Em contrapartida, a própolis de Pinar Del rio possui isoflavonas e os pterocarpanos, como medicarpina e hemoterocapina, dessa forma assemelha-se a PVA (PICCINELLI et al., 2005).

TRUSHEVA et al. (2006) evidenciou a presença de isoflavonoides e pterocarpanos em própolis vermelha. Estes compostos, como medicarpina, são característicos da família Leguminosae. Diversos isoflavonoides foram identificados em *Dalbergia ecastophillum*, confirmando que esta espécie é a origem botânica da resina para a produção de própolis vermelha brasileira (AWALE, et al., 2005).

2.5 Atividades biológicas

A própolis vem sendo utilizada em várias áreas da medicina, por possuir diversas ações terapêuticas já comprovadas, como atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, anti-HIV, anti-carcinogênica, anti-inflamatórias, dentre outras (SILVA et al., 2006; PARK et al., 2002).

A atividade anti-inflamatória também é característica da própolis vermelha de Alagoas e estudos apontam que essa característica está ligada aos flavonoides e esses compostos podem inibir a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase, dessa forma inibindo o processo inflamatório (NETTO et al., 2013). Bueno-Silva et al., (2013) confirmaram essa ação da PVA em sua pesquisa, pois demonstrou atividade inibitória contra a migração de neutrófilos a uma dose de 10 mg/kg. É importante notar que o extrato de própolis é tão efetivo quanto o padrão-ouro dexametasona a 10 mg/kg na prevenção da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, demonstrando que possui um notável potencial anti-inflamatório que deve ser explorado no futuro.

Demir et al. (2016) mostrou que a própolis turca tem efeito carcinogênico, uma vez que extrato etanólico da própolis bloqueou o ciclo celular de células cerebrais em ratos na fase G0/G1 em uma concentração dependente. Esse achado é significativo, pois as células não alcançaram a próxima fase S envolvendo proteína e síntese de DNA. Tanto a própolis quanto seus constituintes, tais como crisina, quercetina e éster fenílico do ácido cafeico (CAPE), pode induzir ao ciclo celular em diferentes estágios dele, dependendo do tipo de célula cancerígena, aumentando os níveis de progressão do ciclo celular dos inibidores ou reduzindo os níveis de ciclinas e CDKs.

Outra ação muito importante que está relacionada com os compostos fenólicos é a atividade antioxidante, que está diretamente ligada à sua estrutura e propriedade redutora. Essas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007).

2.5.1 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana desse produto deve-se muito provavelmente por dois mecanismos de ação: um deles relacionado à inibição da RNA-polimerase bacteriana e ao outro causando danos funcionais e estruturais, por agirem na membrana e na parede celular do microrganismo, confirmando esse processo por meio da própolis de Anatólia na Turquia. Possuindo ação mais eficiente frente a cepas de bactérias gram-positivas do que em cepas gram-negativas (LUSTOSA et al., 2008).

Sforcin et al., 2000, por meio de sua pesquisa, pôde verificar própolis verde, coletada na Seção de Apicultura da Escola de Medicina Veterinária da UNESP, que *Stafilococcus aureus* são suscetíveis a baixas concentrações de extratos etanólicos de e por

outro lado, bactérias gram negativas foram inibidas em altas concentrações. tanto a CIM de 90%, quanto a de 50% de cepas, sendo estudadas em diferentes estações do ano. O CIM 90% de própolis contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi de cerca de 5,70%, enquanto *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* eram mais resistentes.

Além da própolis brasileira, a qual estudos confirmaram efeitos contra cepas bacterianas, a própolis sérvia comprovou que amostras de própolis com certa combinação de compostos fenólicos predominantes como: galangina, crisina e pinocembrina; são muito eficazes contra bactérias gram positivas e gram negativas. Em relação as Gram positivas as mais sensíveis foram a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus Aureus* as cepas apresentaram valores de CIM de 0.1 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.3 µg/mL e 0.5 µg/mL, respectivamente (RISTIVOJEVIC et al., 2016).

A estrutura da parede celular das bactérias gram positivas, com participação predominante de peptidoglicano, permite que moléculas hidrofóbicas penetrem nas células e atuem na parede, bem como na membrana celular e dentro do citoplasma. A parede celular das bactérias gram-negativas é mais complexo com menos peptidoglicano e com membrana externa composta de dupla camada de fosfolípidos ligados à membrana interna por lipopolissacarídeos (NAZZARO et al., 2013). A membrana externa é quase impermeável às moléculas hidrofóbicas, embora algumas possam percorrer lentamente as porinas (NIKAIDO, 1996). Os compostos fenólicos geralmente mostram atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas. Seu efeito depende da concentração; em baixa concentração podem interferir com enzimas de produção de energia e em maior concentração **podem** desnaturar proteínas (TIWARI et al., 2009).

2.5.2 Atividade tripanossomicida

Estudos mostram que o extrato etanólico da própolis verde possui atividade *in vitro* para a inibição do desenvolvimento de três formas de *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença grave e de alta incidência em vários países da América Latina. As medidas de ID₅₀/24h, por exemplo, foram 102.7 ± 3.8, 90.4 ± 2.4 e 25.4 ± 2.5 µg/mL para amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente (HIGASHI; CASTRO, 1994). Algumas características definem essa doença como: possuir uma fase aguda com parasitemia detectável e outra com uma longa duração e assintomática. Dois sistemas estão diretamente relacionados com essa doença, como o sistema imunitário que está envolvido na persistência do parasita e o sistema linfóide que é um alvo possível desse

patógeno (DANTAS et al., 2006). Para que ocorra a prevenção da transmissão transfusional desta doença, recomenda-se o uso do cristal de violeta em áreas endêmicas. O problema do seu uso está relacionado à intolerância por parte dos pacientes e alguns estudos apontam para uma possibilidade de causar câncer (MARCUCCI et al., 2001).

Dantas et al.,(2006) mostraram,em sua pesquisa, que o uso da própolis do sudeste da Bulgária em ratos infectados interferiu nas propriedades básicas das células imunitárias durante a infecção por *Tripanossoma cruzi*, levando à uma diminuição no nível da parasitemia. A administração do extrato da própolis bulgára fez-se por via oral e variou-se a dose em relação ao peso dos ratos infectados com *Tripanossoma cruzi*.O extrato etanólico utilizado não se mostrou tóxico aos animais, mesmo com o uso de altas dosagens, com destaque a concentração de 50 mg/kg de extrato etanólico por peso corporal. O tratamento com esse tipo de propolis em solução etanólica, mostrou uma diminuição na massa do baço e modulou a reação inflamatória. Nenhuma diferença importante foi detectada ao comparar a sobrevivência dos animais. A diminuição no peso corporal dos ratos tratados com todas as doses do extrato foi semelhante aos de ratos infectados não tratados. Assim, investigações adicionais do efeito da própolis sobre a produção de citocinas, sobre a atividade de processos regulatórios, na infecção por *Trypanossoma cruzi* e estudos a longo prazo, são necessários para testar se este produto pode ser considerado como um potencial imunomodulador natural, influenciando diferentes fases das respostas imunes.

A própolis por ser um produto com uma rica composição, é utilizada em estudos que buscam a efetividade não só contra o *Tripanossoma cruzi*, mas para as variações de patologias relacionadas ao *Tripanossoma sp*, pois esse produto de origem natural possui atividade antiparasitária. Como descrito por Gressler et al.,(2012) a terapia atual de infecções por *Trypanosoma evansi* não é eficaz para a grande maioria dos animais com parasitemia recidivante e sinais clínicos.Faz anos que a atenção está sendo focada na atividade antiparasitária da própolis. Tal estudo avaliou a susceptibilidade do *Trypanosoma evansi* frente a extratos de própolis do Rio Grande Sul *in vitro* e *in vivo*. E os resultados foram satisfatórios, todas as tripomastigotas foram mortas após 1 h de incubação com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato. In vivo, as concentrações de 100, 200, 300 e 400 mg kg⁻¹ administrados por via oral durante 10 dias consecutivos não mostraram efeitos curativos, e os ratos morreram da doença. No entanto, ratos tratados com as duas maiores concentrações de extrato de própolis (300 e 400 mg kg⁻¹) mostraram maior longevidade que os outros grupos, baseado nesses dados o *Trypanosoma evansi* se mostrou susceptível ao extratos de própolis.

2.6 Sazonalidade

Com relação à variação sazonal, quando se observa a diminuição de alguns componentes, como os ácidos fenólicos, essa diminuição é acompanhada pelo aumento de outras classes, como, os ácidos diterpenóides. Assim sendo, espera-se que dependendo da época do ano, atividades biológicas relacionadas a eles, estejam ligados à sua presença ou a sua ausência (NUNES et al., 2009).

A sazonalidade está relacionada com as características que um determinado bioproduto apresenta, em um período estabelecido, sendo importantes novas pesquisas relacionadas a esse tópico, pois para que ocorra o desenvolvimento de bioprodutos, a manutenção do perfil químico efetivo deve ser mantida durante todo o período de coleta. Ela tem papel importante na atividade de coleta, produção e comercialização da própolis. Os perfis sazonais estão relacionados com diversos fatores como: umidade relativa, luminosidade, intensidade das chuvas, temperatura, pressão atmosférica, velocidade dos ventos, ponto de orvalho, dentre outros fatores (INOUE et al., 2007).

A pesquisa de Nunes et al. (2009), mostrou que a própolis vermelha de Pernambuco manteve o mesmo perfil fitoquímico entre os meses de coleta (fevereiro, junho e outubro), apresentando terpenos e derivados fenólicos como metabolitos secundários em maior concentração, além de açúcares.

Isla et al. (2009) estudaram a sazonalidade da própolis Argentina e conseguiram observar a variação de compostos e atividades, assim mostrou que os melhores meses de coleta foram os de outubro à dezembro. Essas propriedades funcionais da própolis Argentina a dependem de seus constituintes químicos, que tem relação direta com a estação do ano, geografia e fontes vegetais, sendo assim, as regiões do Noroeste, Oeste e Sul da Argentina possuem propriedades biológicas diferentes. Além disto, a metodologia usada para coleta que nessas regiões são a raspagem e malha de fio, interferem nas variações sazonais.

Valência et al.(2012) conseguiram resultados que mostram mudança de concentração de compostos não apenas nas própolis do continente sul americano; em sua pesquisa com a própolis mexicana da região de sonora, os autores detectaram aumento nos compostos fenólicos e flavonoides no verão (junho de 2008 até setembro de 2008) e outono (setembro de 2008 até dezembro de 2008), quando comparados a primavera (março de 2008 até junho de 2008) e inverno (dezembro de 2008 até março de 2009).

No Brasil, estudos apontam que as amostras de própolis de Minas Gerais, em termo de composição e propriedades físicas, desviam-se do padrão verde usual sendo relativamente

comuns no sudeste do Brasil. Aparentemente, em amostras de propolis de alecrim (*Baccharis dracunculifolia*), há um gradiente com quantidades inversamente proporcionais de triterpenoides e fenólicos, uma vez que a maioria das amostras são caracterizadas por grandes quantidades de compostos fenólicos e baixo conteúdo de triterpenoides. O padrão de alecrim característico é duro e escuro verde, com grandes quantidades de compostos fenólicos e pequenas quantidades de triterpenoides, ou nenhum. Aumentando as quantidades de triterpenoides e, conseqüentemente, diminuindo aqueles de compostos fenólicos, amostras progressivamente tornam-se macias, escuras, engorduradas e pegajosas, ou creme e em pó. Padrões como o descrito são incomum e representam extremos, caracterizados por grandes quantidades de triterpenoides e ausência de fenólicos (TEIXEIRA et al., 2010).

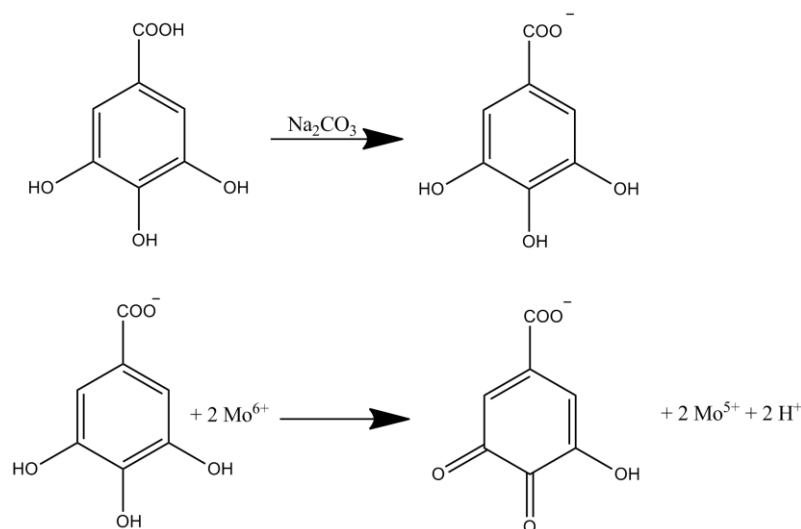
2.7 Método para quantificação de fenóis totais

Estudos para a quantificação de fenóis totais são feitos desde o início do século XX. Folin e Denis em 1912 publicaram trabalhos, que se baseavam no uso de substâncias com estrutura fosfotúngstica-fosfomolibdica como reagente cromogênico. Essa reação é simples, pois ocorre uma oxirredução na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, ao mesmo tempo em que reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico e essa reação resultará um produto de coloração azul por parte da solução. Em 1927 Folin e Ciocalteu, melhoraram o reagente Folin-Denis, pois conseguiram diminuir a precipitação, que ocorria na reação e tornou mais sensível a sua redução pelos fenóis (RIO, 1996).

A quantificação dos compostos fenólicos totais pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos fenólicos presentes na amostra a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) em meio alcalino, como mostrado na equação abaixo. Quando esses óxidos são formados, a coloração azul é predominante, dessa forma podem ser medidos no comprimento de onda de 720nm, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (CRUZ, 2008).

Como descrito por Oliveira; Valentim; Goulart (2009), foi mostrada a desprotonação de compostos fenólicos, em relação ao ácido gálico, em meio básico, por isso é justificável o uso do carbonato de sódio na reação, dessa forma irá gerar os ânions fenolatos, como na figura 2. Como resultado dessa reação, ocorrerá uma oxirredução entre o reagente Folin e o íon fenolato, na qual o molibdênio, que está presente no reagente Folin, sofrerá redução e a coloração da solução será modificada do amarelo para o azul, como mostrado na figura 3.

Figura 2- Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.

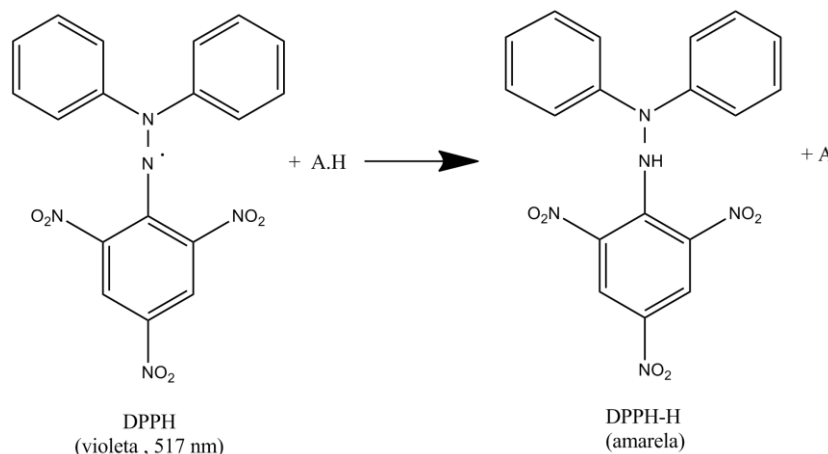


Fonte: OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART, 2009.

2.8 Método de avaliação da capacidade antioxidante pelo uso de radical DPPH

Alguns métodos são usados para a avaliação da atividade antioxidante em extratos, um dos mais usados, utiliza o reagente DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila). Esse método se baseia na avaliação da atividade sequestradora desse radical livre. O DPPH é reduzido à difenil-picril-hidrazina, que ocorre por ação de uma espécie radicalar ou um antioxidante, dessa forma acontecendo um desaparecimento da absorção, sendo assim monitora-se o decréscimo da absorbância de diversas soluções, a diminuição que ocorre é calculada em relação ao consumo do radical livre DPPH (Figura 3). A partir dos resultados obtidos, calcula-se a capacidade antioxidante em porcentagem, a mesma corresponde à quantidade de DPPH que foi consumida pelo antioxidante. Para que ocorra o decréscimo na concentração inicial do reagente em 50%, uma certa quantidade do antioxidante é necessária, sendo chamada de concentração inibitória (IC_{50}). O consumo de DPPH é diretamente proporcional à atividade antioxidante e inversamente proporcional a IC_{50} (SOUZA et al., 2007).

Figura 3- Reação radicalar de redução do DPPH[•] por uma espécie antioxidante (AH).



Fonte: Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007.

Atividades antioxidantes são dependentes de estruturas de compostos fenólicos. Por exemplo, assumindo padrões idênticos de hidroxila e substituição de metoxila, ácidos hidroxicinnâmicos são mais eficazes do que os ácidos hidroxibenzóicos. Além disso, a atividade antioxidante de derivados de ácido fenólico depende das características da cadeia lateral do propano e hidroxilas fenólicas. Assim, aspectos estruturais são importantes na determinação da atividade antioxidante, que torna o assunto da atividade antioxidante muito complexo para ser explicado apenas em termos de quantidade de compostos fenólicos (TEIXEIRA et al., 2010).

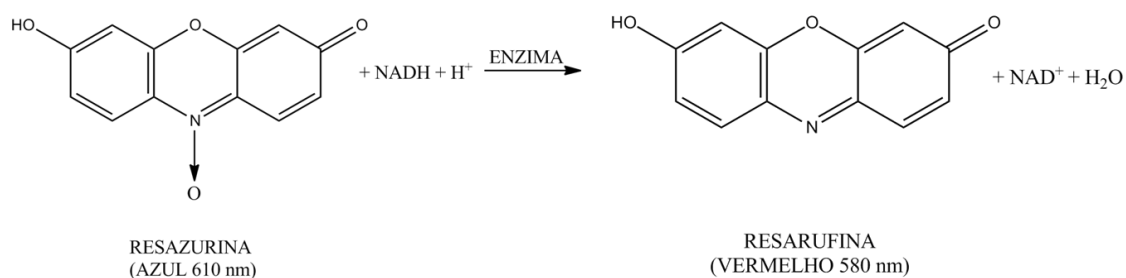
2.9 Método de determinação da atividade tripanossomicida por alamar blue

O reagente Alamar Blue baseia-se no princípio de redução do reagente não fluorescente (resazurina) a um composto fluorescente (resarufina), pela redução intracelular em ambiente de células vivas ao longo do tempo (MUNSHI; TWINNING; DAHL, 2014).

O ensaio Alamar Blue é projetado para medir quantitativamente a proliferação de células animais, bactérias e fungos. O bioensaio também pode ser utilizado para estabelecer a citotoxicidade relativa de agentes de diferentes classes químicas. Utilizando o indicador REDOX resazurina (forma oxidada), é possível espectrofotometricamente medir a proliferação celular. A resazurina é azul e não fluorescente, enquanto a resarufina (forma reduzida) é vermelha e altamente fluorescente (figura 4). Assim, pode-se medir as mudanças do corante no meio intracelular por meio da técnica fluorescência, modificações no número dos metabólitos ativos das células podem ser detectados (BONNIER et al., 2015).

O indicador também tem sido empregado em ensaios de sensibilidade aos fármacos por cultura adaptada das formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Alamar Blue não é tóxico para as células, mesmo durante longos tempos de incubação. O ensaio Alamar Blue permite um método simples, reprodutível e de confiança para triagem de drogas leishmanicidas. (MIKUS; STERVERDING, 1999).

Figura 4- Reação química da redução da resazurina em resarufina, com mudança de cor.



Fonte: MUNSHI; TWINING; DAHL, 2014.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudo de sazonalidade da própolis vermelha de Alagoas produzidas em 3 apiários monitorado pela composição química, atividade antioxidante, ação tripanossomicida e atividade antimicrobiana, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaios químicos de determinação de flavonoides e compostos fenólicos por espectroscopia no UV-vis durante o monitoramento sazonal;
- Efetuar estudos da determinação da composição química dos principais compostos fenólicos usando LC-UV-DAD e LC-MS/MS durante monitoramento sazonal;
- Estudar a capacidade antioxidante dos extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas durante ciclo de 12 meses nos diferentes apiários;
- Proceder estudos de atividade tripanossomicida dos extratos brutos de diferentes apiários durante monitoramento sazonal;
- Executar estudos de atividade antimicrobiana dos extratos brutos de diferentes apiários durante ciclo de 12 meses dos diferentes apiários;
- Proceder estudos de correlação estatística multivariada com os dados químicos-biológicos-meteorológicos durante monitoramento sazonal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes químicos e biológicos

Os padrões analíticos ácido cafeíco, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, crisina, catequina, biochanina A, daidzeína, dalbergina, formononetina, genisteína, galangina, isoliquiritigenina, narigenina, pinobanquisina, pinocembrina, kaempferol, quercetina, luteolina, foram adquiridos na Sigma-aldrich (St. Louis, EUA), a liquiritigenina e a epicatequina foram adquiridos na Extrasynthese® (Lyon Nord, França). Os padrões laboratoriais gutiferona E (mistura isomérica) e a gutiferona B foram isolados e identificados no Laboratório de Análises Farmacêuticas no Instituto de Farmácia e Ciências Biomédicas da Universidade de Strathclyde em Glasgow/UK (SIPBS/Glasgow/UK).

Foi utilizada a forma tripomastigota do *Trypanosoma brucei brucei* S427. O meio de cultura para análise da atividade tripanossomicida foi o HMI-9 (Invitrogen®, Nova York, EUA). Suramina foi utilizado como controle positivo, DMSO e resazurina (Alamar Blue), foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Reagentes analíticos: etanol, dihidrogênio fosfato de potássio, ácido fórmico e metanol grau HPLC foram comprados da J. T. Baker (Mallinckrodt, México), acetonitrila grau HPLC foi comprado da Fisher Scientific (Leicestershire, UK) e água Mili-Q foi produzida no laboratório.

4.2 Coleta das amostras de própolis vermelha

Esta pesquisa foi autorizada previamente pela agência regulatória para controle de Patrimônio genético brasileiro e conservação da biodiversidade para acesso e transporte (Número de documento de autorização 010124/2012-8 e pode ser acessado em <http://www.cnpq.br/documents/10157/e7fec3ea-f4cd-4832-9cc0-4adcf789ab51>).

A própolis vermelha (30g) foi coletada entre os meses de março de 2011 a fevereiro de 2012 perfazendo um ciclo de 12 meses. O apiário Ilha do Porto (Marechal Deodoro- AL) (Própolis A) com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 44.555', latitude oeste: 35° 52.080' e altura de 18,1 metros; O apiário Primavera (Marechal Deodoro- AL) (Própolis B) com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 42.258', latitude oeste: 35° 54.391' e altura de 35,5 metros e o apiário Paripueira (Própolis C) com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 26.448', latitude oeste: 35° 31.710' e altura de 4,7 metros. Os dados meteorológicos da intensidade da chuva, luz solar, umidade, temperatura, pressão, velocidade do vento foram

adquiridos no Instituto Nacional de Meteorologia do governo brasileiro no local (www.inmet.gov.br), a fim de correlacionar os dados químicos e biológicos com dados meteorológicos.

Já para a identificação dos marcadores da própolis vermelha, coletou-se em abril de 2011, de Marechal Deodoro -Alagoas, Brasil, no apiário Ilha do Porto com coordenadas geográficas da latitude sul : 9 ° 44,555', latitude oeste: 35 ° 52,080' e a altura de 18,1 m e Apiário Primavera (Própolis B) com coordenadas geográficas da latitude sul : 9 ° 42,258', a latitude oeste: 35 ° 54,391' e a altura de 35,5 m.

4.3 Preparação das amostras

Uma quantidade de 10 g de própolis vermelha dos três apiários estudados foi usada para extrair os constituintes ativos usando, o método maceração exaustiva com solução hidroalcoólica (80% a etanol), três extrações de 150 mL foram realizadas. E no final de 3 ciclos de extração com renovação do solvente, os extratos foram concentrados por rotaevaporador (Fisatom, Brasil), transferido para frascos tipo ampicilina e deixados por 3 dias sobre a estufa aquecida a 45°C para completa secagem do extrato bruto de própolis vermelha. Uma quantidade de 5 a 7 gramas de extrato bruto de própolis foi obtido para as 36 amostras. A massa seca foi estocada em freezer a -20°C, até o momento das análises. A massa de 100 mg foi exatamente pesada e solubilizada em etanol, diluído e submetido para desenvolvimento de métodos, validação e quantificação em métodos LC-UV-DAD e LC-Orbitrap-FT-MS/MS.

4.4 Ensaio químicos

4.4.1 Determinação da atividade antioxidante com DPPH

Pesou-se em um béquer 0,0039 g de DPPH em uma balança analítica da marca Shimadzu®, modelo AY220, adicionou-se 3 mL de etanol absoluto no béquer e levou-se ao ultrassom por 5 minutos, para que solubilizasse. Posteriormente, transferiu-se para um balão de 100 mL e o volume foi completado com etanol absoluto, dessa forma possuindo uma solução de DPPH de concentração 0,1 mM (SILVA et al.,2008).

As soluções estoques dos extratos brutos produzidos nos três apiários e coletados mensalmente no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, foram obtidas pela solubilização de 0,1000 g do extrato bruto com etanol em balão volumétrico de 10 mL. A partir dessa solução estoque retiraram-se alíquotas de 5, 15, 30, 60, 180 e 400 µL e adicionou-

se 2 mL de DPPH, completando o volume com etanol absoluto em balão volumétrico de 5 mL. Obtendo-se as concentrações finais de 1, 3, 6, 12, 36 e 80 µg/mL.

Para a obtenção da absorbância das soluções, usou-se um espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu®, modelo UV-mini 1240, no modo fotometria em um comprimento de onda de 520 nm. A partir desses resultados, conseguiu-se avaliar a atividade antioxidante através da seguinte equação:

Equação 1- Expressão para determinação da atividade antioxidante

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{100 - ((Ab \text{ amostra} - Ab \text{ branco}) \times 100)}{Ab \text{ controle}}$$

Onde: Ab amostra = absorbância da solução DPPH (amostras); Ab branco = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH; Ab controle = absorbância da solução referência de DPPH (etanol).

4.4.2 Determinação de flavonoides por análise em UV-Vis

Para a curva de calibração da catequina, usou-se uma solução estoque de 500 µg/mL e fizeram-se diluições de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 e 10 µg/mL. Essas amostras foram lidas em 280 nm no espectrofotômetro UV-vis.

Usou-se uma balança analítica da marca Shimadzu®, modelo AX200, para pesar em triplicata 100 mg de extrato bruto de própolis vermelha, posteriormente solubilizou-se em etanol 96°GL e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, possuindo assim uma concentração final de 10.000 µg/mL. Em seguida, foi retirado uma alíquota de 50 µL das amostras (meses do ano) solubilizadas e adicionadas a um balão volumétrico de 10 mL, obtendo uma concentração de 50 µg/mL, sendo essa última concentração analisada em UV-Vis.

O cálculo da concentração de flavonoides pelo método de leitura direta em UV-Vis foi obtido a partir da curva de calibração do padrão de catequina na faixa de concentração entre 1 a 20 µg/mL, a qual foi previamente validada com dados de precisão intermediária, exatidão e linearidade. Os dados foram expressos em mg de catequina por 100 mg de extrato de própolis vermelha pelo valor médio encontrado.

4.4.3 Determinação de fenóis totais

a) Preparação da curva de calibração do ácido gálico

Inicialmente duas diluições foram feitas para a obtenção da solução estoque final do ácido gálico:

1º Diluição: Pesou-se 0,0100g do padrão e solubilizou-se em água destilada em um balão volumétrico de 10 mL, concentração final de 1000 µg/mL.

2º Diluição (solução estoque): Retirou-se 1 mL, dessa solução, solubilizou-se em água destilada em um balão volumétrico, concentração de 100 µg/mL. A esta solução adicionou-se 250 µL de Folin-Ciocalteu, 6 mL de água destilada (1 minuto em agitação) e 1 mL de carbonato de sódio 20% (30 segundos sob agitação), o volume foi completado com água destilada.

Para a construção da curva de calibração do ácido gálico, usaram-se as concentrações de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL 10 µg/mL, 12,5 µg/mL, 15 µg/mL e 17,5 µg/mL. A leitura em UV-vis foi realizada em comprimento de 750 nm.

b) Obtenção do perfil fenólico dos extratos brutos

As soluções estoques mensais dos três apiários foram obtidas da seguinte maneira (duplicata):

1º Passo: Solubilização de 0,1000 g do extrato bruto com etanol em balão volumétrico de 10 mL.

2º Passo: Retirou-se alíquotas da solução estoque de 250 µL, 350 µL, 500 µL, 650 µL e 750 µL.

3º Passo: Adicionou-se 0,25 mL de Folin-Ciocalteu + 6 mL de água destilada (agitando por 1 minuto).

4º Passo: Acrescentou-se 1 mL de carbonato de cálcio a 20% (agitando por 30 segundos).

5º Passo: Obtendo-se as concentrações de 25 µg/mL, 35 µg/mL, 50 µg/mL, 65 µg/mL e 75 µg/mL.

4.4.4 Determinação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida (LC)

a) Análise de flavonoides por LC-DAD-UV

A identificação dos marcadores da própolis vermelha nas tinturas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos

(HPLC/DAD) (Shimadzu, Tóquio, Japão). As tinturas de própolis foram preparadas em uma concentração de 100 mg/mL usando etanol como solvente e depois diluído para uma concentração de 1,0 mg/mL.

A fase móvel consistiu em um sistema gradiente: 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (A) e metanol grau HPLC (B). A separação foi obtida usando uma coluna C₁₈ Phenomenex, equipada com uma coluna C₁₈ phenomenex security guard e mantida a uma temperatura de 33°C. A taxa de fluxo foi de 0,80 mL/min.

O sistema gradiente foi programado para: 30% do solvente B no intervalo entre 0 e 7 min, 40% do solvente B em 15 min, 45% de solvente B em 30 min, 60% do solvente B em 40 min, 80% do solvente B em 50 min, 90% do solvente B em 60 min, e então o solvente B foi reduzido para 30% em 65 min e permaneceu nesta condição isocrática por 70 min. As amostras foram introduzidas no HPLC usando injetor Rheodyne com um volume de injeção de 20 µL.

Os padrões analíticos foram pesados (10 mg), solubilizados com metanol grau HPLC para obter concentração de 1000 µg/mL. Em seguida, foram diluídos para concentrações de 15,0 µg/mL; 12,5 µg/mL; 10,0 µg/mL; 7,5 µg/mL e 5,0 µg/mL e diretamente injetados no LC-DAD-UV. Os extratos brutos de própolis vermelha (100 mg) foram solubilizados em etanol absoluto e diluídos para concentração de 250µg/mL e diretamente injetados no LC-DAD-UV.

b) Análise de flavonoides e gutiferonas por LC/Orbitrap/FTMS

O LC/Orbitrap/FTMS foi usado nas seguintes condições: a coluna C₁₈ do ACE® como fase estacionária e taxa de fluxo de 300 µL/min.

A fase móvel consistiu de um sistema gradiente: 0,1% de ácido fórmico em água(A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) (V/V). A coluna foi eluída em modo gradiente da seguinte forma: 0 min 30% de B, 6 min 45% de B, 10 min 60% de B, 14 min 75% de B, 18 min 90% de B, 22 min 100% de B, 22-47 min 100% de B, e diminuiu para 30% de B em 52 min, então realizada a 30% de B em 52-58 min. O FTMS foi definido para adquirir íons em um modo negativo com uma tensão da agulha de 4,0 kV e bainha (50) e auxiliares (10) fluxos de gás e unidades arbitrárias. O instrumento foi programando para detectar os íons, no modo fullscan, no intervalo de 50 a 1200 nm. Um volume de 10 µL foi injetado no LC/ESI/FTMS/Orbitrap.

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Determinação da atividade tripanossomicida

Usou-se para o teste de atividade tripanossomicida usando a espécie *Trypanosoma brucei brucei* S247 (forma tripomastigota) na concentração do parasita de 3×10^4 células/mL. As amostras dos extratos brutos dos três apiários (Própolis A, Própolis B e Própolis C) nas concentrações de 10 e 20 µg/mL foram desafiadas contra o *Trypanosoma brucei brucei* S247.

A Suramina (Sigma-aldrich) foi usada como controle positivo e preparou-se usando 10µM (diluição de 1:100 (HMI-9) diluído em série de 1:1 (em modelo de diluição), isto é, nas concentrações de 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 0.625 µM e 0,008 µM.

Os extratos brutos de própolis vermelha foram pesados (10mg/mL) em DMSO. As amostras de extrato bruto 200 µg/mL das soluções-teste, foram preparadas em coluna 2 por pipetagem de 10 µL da solução estoque (10mg/mL) e adicionou 190 µL do meio HMI-9 (Invitrogen®) em cada poço, ou 20 µL da solução estoque (10 mg/mL) e adicionou 180 µL do meio HMI-9 (Invitrogen) em cada poço. As concentrações finais do extrato bruto de própolis vermelha em cada poço foram de 20 e 10µg/mL, respectivamente.

Posteriormente, 100 µL do meio HMI-9 contendo extrato bruto de própolis vermelha foi pipetado nos poços e uma série de diluições de 1:1 foram realizadas usando uma pipeta multicanal. Adicionou-se 100µL de meio HMI-9 contendo tripanossoma com carga de parasita 3×10^4 células/mL em cada poço e incubou-se a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por 48 horas.

Depois desse tempo adicionou-se 20 µL de Alamar Blue e incubou-se sob as condições anteriores já mencionadas por mais 24 horas. A concentração foi determinada pelo método de fluorescência com o Wallac Victor microplacas. O comprimento de onda da excitação foi de 530 nm e da emissão de 590 nm foi ajustado para quantificação.

4.5.2 Teste de atividade antimicrobiana contra cepas gram positivos e gram negativas

O teste de atividade antimicrobiana (AAM) foi realizado utilizando ensaio de microdiluição de caldo em microplacas de 96 poços, contendo 100 µL/poço de caldo Muller Hinton, seguindo o procedimento descrito por CLSI (CLSI, 2006), com algumas modificações. Uma solução de reserva preparada a 10 mg/mL utilizando etanol 96 °GLfoi diluída com tampão de fosfato (pH 7,4) no caldo Muller Hinton. As diluições em série (na proporção de 3:4; V:V) foram preparadas em concentrações variando entre 66 µg/mL e 500

µg/mL, em microplacas. Foram adicionadas alíquotas (30 µL) de suspensão bacteriana (cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) aos poços contendo 100 µL de meio de caldo Muller Hinton com diferentes concentrações de extrato bruto de própolis vermelha. Os resultados foram observados após a adição de 40 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) e reincubação a 36°C por 2 horas. A diluição em série de etanol a 96°GL em caldo Muller Hinton foi realizada como controle negativo. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração de extrato bruto de própolis vermelha que inibiu o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

4.6 Correlação de dados experimentais usando estatística multivariada

A análise multivariada foi estabelecida entre as concentrações de flavonoides e concentração de gutiferas e dados meteorológicos (umidade relativa /%, intensidade da chuva/mm, radiação solar/kJm², temperatura/K) obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET.gov.br). gráficos de superfície de resposta usando o software Statistica, versão 13.0.

As correlações comparativas multivariadas entre os métodos químico, UV-visível e cromatográfico foram expressas usando gráficos Matrix Scatter e, a correlação de Pearson usando a versão Software ORIGIN 8.0 foi aplicada. O mesmo método foi utilizado para estabelecer correlação multivariada entre os dados de LC-Orbitrap-FTMS (isoliquiritigenina, formononetina, soma dos flavonoides totais, gutiferona E em concentrações isoméricas da mistura) e IC₅₀ do método DPPH para todos os meses do estudo de sazonalidade da própolis A e própolis C.

A análise de correlações entre a concentração de compostos fenólicos nos meses com crescimento de microrganismos foi estabelecida usando as estatísticas multivariadas PCA-X e PLS-DA, através do software SIMCA P, versão 12.0. Foi realizada uma matriz 36 x 12 (36 amostras da sazonalidade da própolis A, própolis B, própolis C e 12 variáveis importantes do estudo de sazonalidade usando dados LC/Orbitrap/FTMS). As variáveis importantes foram definidas como: 36 amostras de sazonalidade (componente primário), concentração de isoliquiritigenina (componente 2), concentração de formononetina (componente 3), concentração da soma dos flavonoides (componente 4), concentração de gutiferona E (componente 5), além das oito concentrações de CIM testadas (componente 6) 500 µg/mL, (componente 7) 375 µg/mL, (componente 8) 280 µg/mL, (componente 9) 210 µg/mL, (componente 10) 158 µg/mL, (componente 11) 118 µg/mL, (componente 12) 88µg/mL e (componente 13) 66 µg/mL. Esta matriz foi utilizada para avaliar a correlação

entre cada concentração de compostos fenólicos e sua influência nos resultados de CIM em *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*. O resultado da inibição do crescimento do microrganismo recebeu a notação 1 e os resultados de crescimento do microrganismo receberam a notação 0. Outras análises de correlação foram estabelecidas entre algumas concentrações específicas de flavonoides a partir de dados de LCMS e análise de outliers em gráficos de PCA.

4.7 Análises estatísticas

Os ensaios de determinação de flavonoides totais usando análise direta em UV-vis, fenóis totais, atividade antioxidante foram realizados em triplicata e expressos graficamente por meio de média e desvio padrão utilizando o software graphpad Prisma versão 5.0.

Os ensaios de determinação de flavonoides individuais (métodos HPLC/DAD/UV-Vis e LC/Orbitrap/FTMS) e determinação de gutiferonas (LC/Orbitrap/FTMS) foram expressos graficamente por meio de média de ensaio em duplicata utilizando o software graphpad Prisma versão 5.0.

Os ensaios de atividade tripanossomicida e MIC foram expressos como resultado médio em duplicata.

Correlações comparativas multivariada entre métodos químicos e cromatográficos foram normalizados e expressos em gráfico de matriz (Matrix Scatter) e correlação de Pearson utilizando software Origin versão 8.0 foi aplicada.

Correlações inversas multivariadas foram estabelecidas entre as variações de concentrações de flavonoides e CIM de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram estabelecidas utilizando OPLS-DA obtidos do software Simca P, versão 12.0

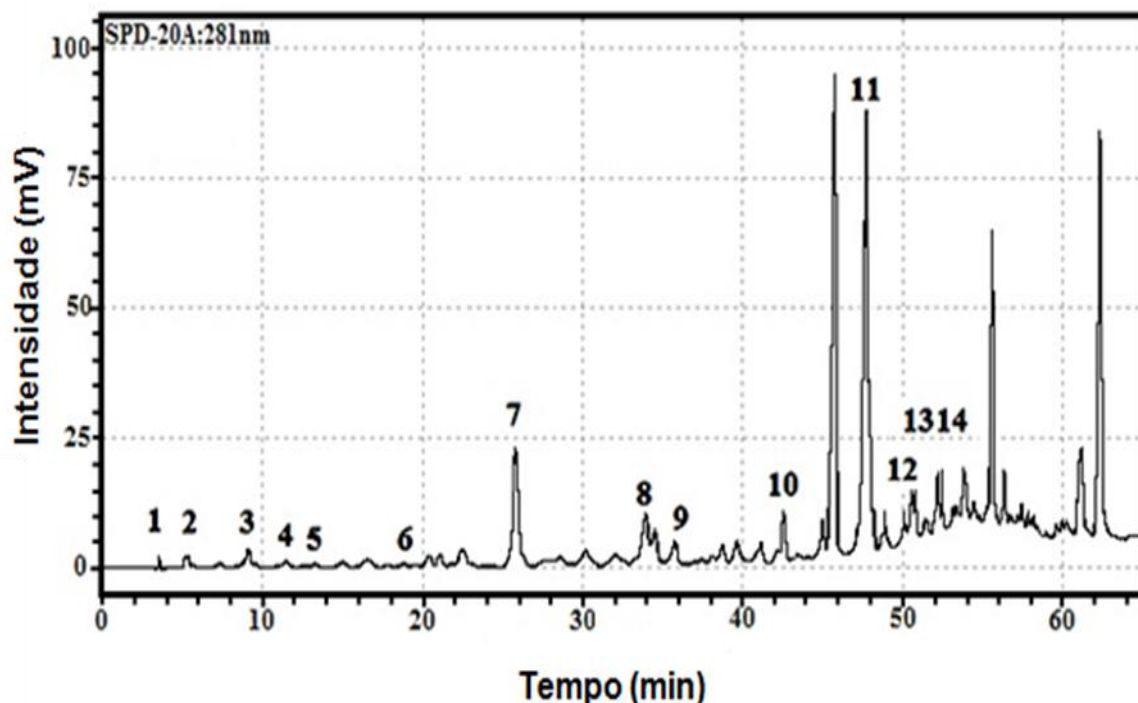
Correlação multivariada foi estabelecida entre as variações de concentrações de flavonoides e dados meteorológicos obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET.gov.br) através de gráficos de superfície utilizando o software Statistica, versão 13.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de marcadores da própolis vermelha por LC-UV e LC/Orbitrap/FTMS

O método HPLC-UV apresentou sinais no cromatograma do extrato de própolis vermelha, demonstrando a complexidade das análises para esta matéria prima apicêutica, mas foi possível obter uma resolução relativa entre os picos utilizando o método cromatográfico proposto e fez ajustes no método gradiente LC/ESI/Orbitrap/FTMS, método baseado nesta primeira metodologia. A análise de HPLC-UV demonstrou a presença de ácidos fenólicos, flavanonas, flavonas, chalconas e isoflavonas na composição de extratos e da tintura da própolis vermelha de Alagoas (Figura 5). Por meio da comparação dos padrões com a tintura da própolis vermelha a uma concentração de 1,0 mg/mL, foi possível a indentificação dos picos cromatográficos.

Figura 5- Perfil cromatográfico da tintura de própolis vermelha do apiário Ilha do Porto na concentração de 1,0 mg / mL. Os flavonoides foram identificados usando padrões analíticos: (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido cafeico, (4) ácido p-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina (7) liquiritigenina, (8) quercetina, (9) luteolina, (10) isoliquiritigenina, (11) formononetina, (12) pinocembrina, (13) biocanina A e (14) crisina.



Os mesmos extratos brutos foram usados para preparar as tinturas A e B da própolis vermelha, que foram então injetadas em LC-ESI-FTMS-Orbitrap (Figura 6). A confirmação

da presença de isoflavonoides (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A), chalconas (iso-liquiritigenina), flavanonas (liquiritigenina, pinocembrina e naringenina), pterocarpanos (medicarpina), flavonas (galangina) e ácidos fenólicos na própolis vermelha foram realizadas pela detecção do íon usando o modo negativo do LC-ESI-FTMS-Orbitrap e as fórmulas foram geradas usando o software Xcalibur da Thermo Fisher Scientific® (Tabela 2). Outras classes de compostos menos estudados também foram detectados na própolis vermelha. Na faixa de 24 a 50 min, terpenos, propolonas e gutiferonas, foram detectados na própolis vermelha. Há um interesse particular nas gutiferonas devido ao seu potencial antibacteriano, antileishmania, atividades anti-HIV e tumoral ou neoplásico (DE MEDONÇA et al., 2015). A gutiferona E foi identificada como um composto importante (PM 602,8) e fórmulas ($C_{38}H_{50}O_6$) em um tempo de retenção de 32,9 min, durante a análise das tinturas A e B (Tabela 2).

Figura 6- Perfil cromatográficotintura de própolis vermelha Ilha do Porto (A) e tintura de própolis vermelha Primavera (B) utilizando LC/Orbitrap/ESI/FTMS.

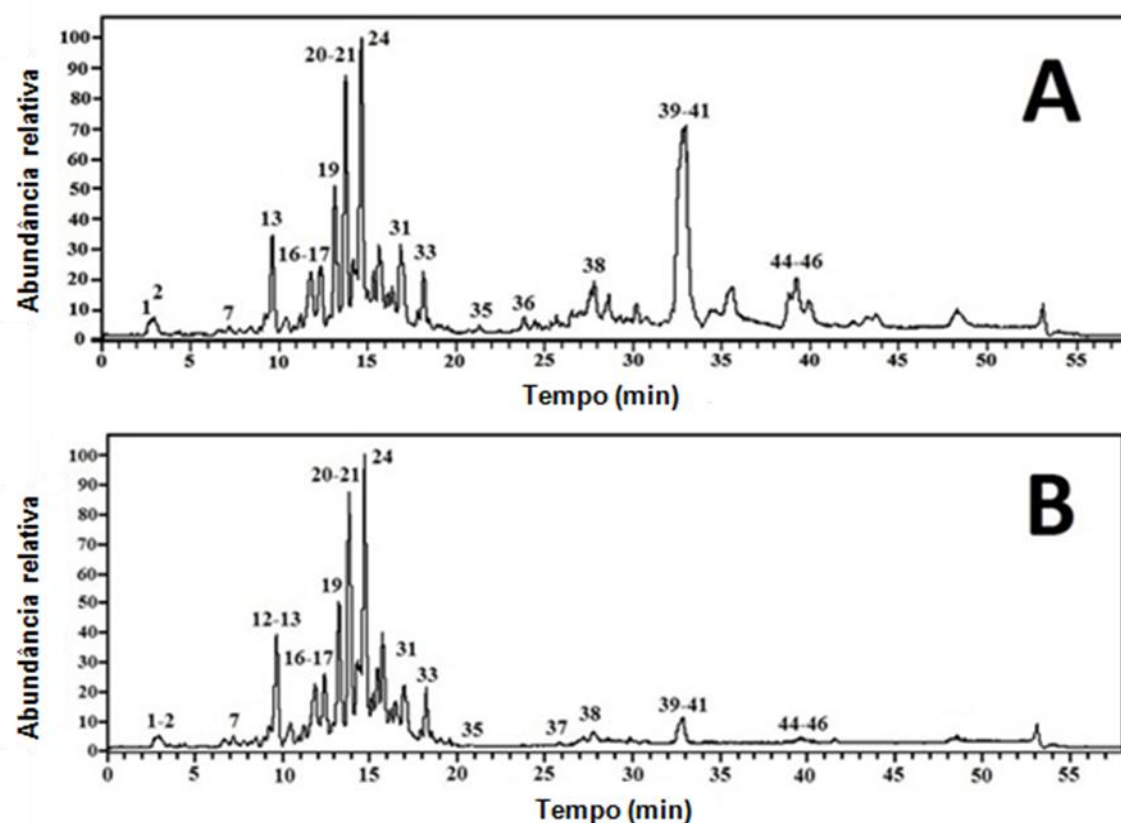


Tabela2- Marcadores identificados na própolis vermelha de Alagoas em tinturas utilizando LC/ESI/FTMS/Orbitrap.

PICO	TR (min.)	[M-H] ⁺ (m/z)	MW	FÓRMULA	COMPOSTO
1	2.95	179.0556	180.16	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido caféico
2	2.98	193.0502	194.18	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ácido ferúlico
3	3.00	178.0556	179.05	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido umbélico
4	3.04	163.0243	164.16	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido p-cumarico
5	3.10	475.1232	476.43	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	7-O-glucopyranosyl-4'-hydroxy-5-methoxy isoflavona
6	4.50	461.1023	462.40	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	6-Methoxiluteolina 7-ramnosideo
7	7.05	269.0811	270.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Genisteína
8	7.35	285.0395	286.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Kaempferol
9	8.04	289.0711	290.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina
10	8.28	287.0553	288.25	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	Dalbergina
11	8.83	289.0711	290.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatequina
12	8.95	253.0499	254.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Daidzeína
13	9.70	255.0654	256.27	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Liquiritigenina
14	10.5	283.0384	284.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	2'-Hidroxiformononetina
15	11.3	331.0810	332.30	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	Evernicacido
16-17	11.9	271.0602	272.25	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Narigenina / Pinobanksina
18	12.4	285.0758	286.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Calicosina
19	13.4	255.0654	256.27	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Isoliquiritigenina
20-21	13.77	267.0655	268.28	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetina / Isoformononetina
22	14.2	269.0812	270.28	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	4,4'-dihidroxi-2-methoxichalcona
23	14.2	269.0812	270.32	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(7S)-dalbergifenol
24	14.66	271.0603	272.29	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	Vestitol
25	15.10	269.0813	270.28	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Pinostrobrina
26	15.10	269.0813	270.27	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Medicarpina
27	16.2	271.0607	272.29	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	2',6'-dihidroxi-4'-methoxidihidrochalcona
28	16.2	283.0657	284.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Thevetiaflavona
29	16.42	283.0603	284.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Biochanina A
30	16.73	253.0865	254.25	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Crisina
31	16.87	255.1019	256.27	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrina
32	17.0	539.1699	540.56	C ₃₂ H ₂₈ O ₈	3',4'-di-O-benzil-7-O-(2-hidroxietil)-3-O-metilquercetina
33	18.2	285.1131	286.32	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	(3S)-7-O-metilvestitol
34	18.2	285.1131	286.32	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	7,3'-Dihidroxi-4'-methoxi-8-metilflavono
35	21.4	425.1603	426.71	C ₃₀ H ₅₀ O	Cicloartenol / α-amirina / β-amirina

36	23.6	533.2906	534.69	C ₃₃ H ₄₂ O ₆	Hiperibone H
37	25.5	617.3480	618.82	C ₃₈ H ₅₀ O ₇	16-hidroxitutiferona K
38	27.3	511.1383	512.50	C ₃₀ H ₂₄ O ₈	Rhuschalcona V
39	32.80	601.3533	602.80	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	Gutiferona F
40	32.88	601.3533	602.80	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	Xantoquimol
41	32.90	601.3533	602.80	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	Gutiferona E
42	34.10	347.2233	348.52	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	Ácido Anacárdico
43	34.50	509.2744	510.59	C ₂₇ H ₃₈ O ₃	ÁcidoMacassarico
44	39.24	669.4355	670.917	C ₄₃ H ₅₈ O ₆	Gutiferona C
45	39.24	669.4355	670.917	C ₄₃ H ₅₈ O ₆	Gutiferona D
46	39.24	669.4355	670.917	C ₄₃ H ₅₈ O ₆	Gutiferona B

TR: Tempo de retenção (min), MW: Peso molecular.

Utilizando LC/ESI/Orbitrap/FTMS, foi possível observar similaridades entre as tinturas A e B no tempo de retenção de 2,0 a 22,0 min, que corresponde ao tempo de retenção de ácidos fenólicos e isoflavonoides. Entretanto, diferenças foram observadas nas menores intensidades dos picos de 24,0 a 50,0 min e principalmente para o pico em 32,9 min (identificado como gutiferona E) a qual foi detectada em ambas as tinturas. Tanto o método de CLAE- UV, quanto o LC/ESI/Orbitrap/FTMS foram ferramentas úteis na caracterização química dos extratos de própolis vermelha. O LC/ESI/Orbitrap/FTMS é considerado uma técnica moderna para triagem fitoquímica, porque é um detector universal para identificar diferentes compostos com uma grande variedade de massa. Além disso, o LC/ESI/Orbitrap/FTMS é considerado um detector específico para identificar diferentes marcadores de própolis, independente das classes de metabólitos secundários e é uma técnica de escolha para fins de triagem rápida, pois o modo Orbitrap é usado para íons concentrados, mantendo a análise mais sensível e robusta, enquanto detecta centenas de compostos em apenas uma análise. Então, esta técnica é escolhida para analisar o perfil químico e estabelecer uma impressão digital de amostras complexas, como alimentos funcionais, fitoquímicos, apicêuticos e outros (ZHANG et al., 2014).

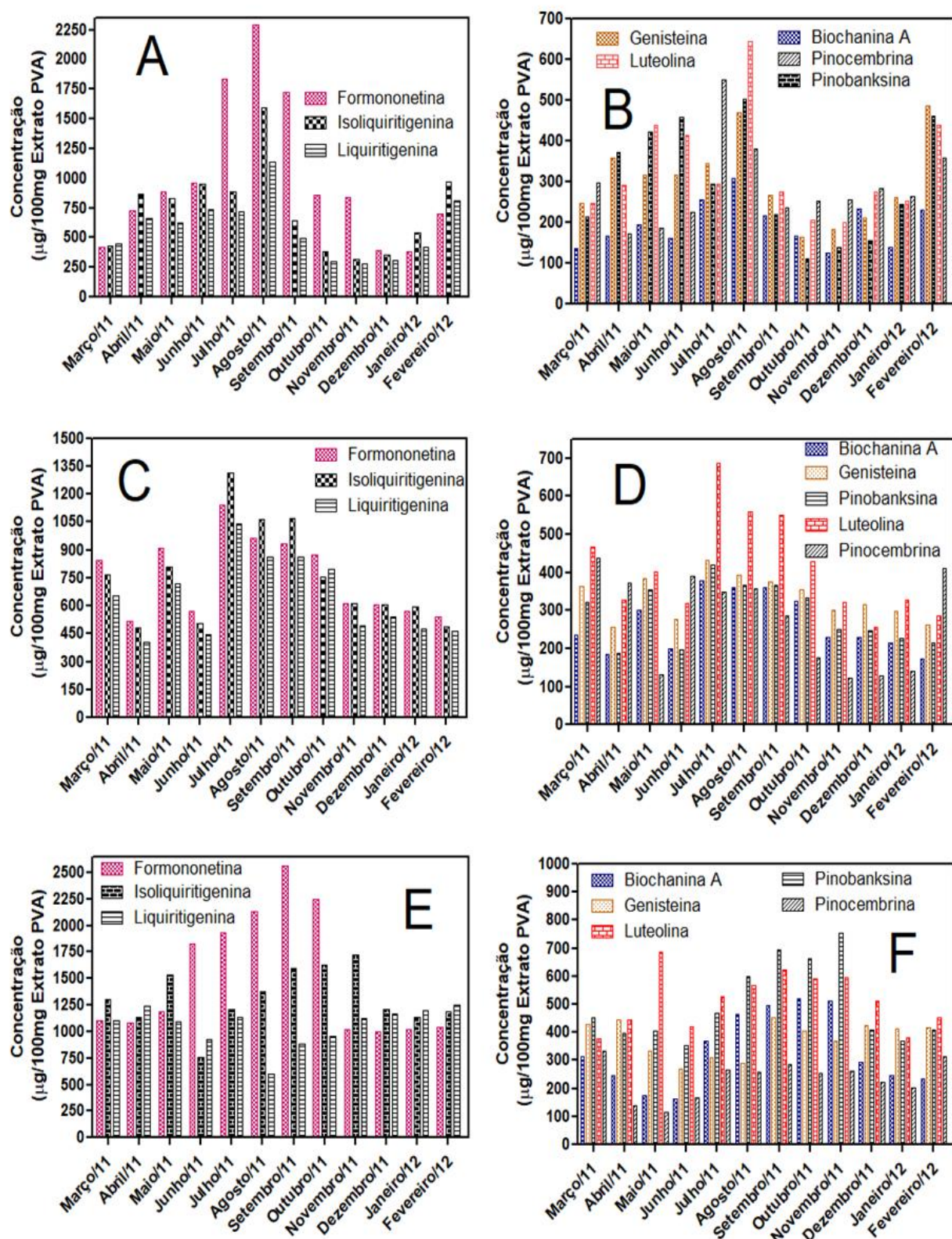
Os dados de sazonalidade obtidos usando os métodos LC-UV-DAD e LC/ESI/Orbitrap/FTMS têm demonstrado perfil sazonal semelhante aos métodos clássicos UV-vis e Folin-Ciocalteu. Apesar do mesmo perfil sazonal obtido pelos 2 métodos cromatográficos, observou-se uma superestimativa na concentração dos flavonoides quando realizou-se a determinação pelo método LC-UV-DAD. Isso foi observado devido a alguns problemas de coeluição durante as corridas analíticas.

5.2. Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios LC-UV e LC-MS

A partir desta metodologia, pode-se observar que dependendo do flavonóide, ocorrerá variação durante todo o ano nos três apiários estudados. O apiário Ilha do Porto demonstrou picos de concentração de formononetina nos meses de julho, agosto e setembro (figura 7 A), igualmente ao apiário primavera, que mesmo possuindo uma quantidade menor dos biomarcadores, conseguiu manter uma maior constância. Diferentemente dos dois apiários citados anteriormente, o apiário Paripueira apresentou uma maior quantidade de meses, onde ocorreram maiores valores nas concentrações do biomarcador formononetina, como evidenciado na figura 7 C.

Já em relação à presença dos flavonóides genisteína, luteolina, biochanina A, pinocembrina e pinobanksina, fica claro valores máximos nas estações do ano como outono e inverno, este aumento na concentração dos flavonoides coincide com o período da incidência de intensas chuvas no estado de Alagoas situado na região nordeste do Brasil e teve uma forte correlação com os dados meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia do governo Brasileiro (www.inmet.gov.br), como mostrado nos anexos 5,6 e 7..

Figura 7- Determinação da concentração de flavonoides usando HPLC-UV-DAD para biomarcadores específicos. (A) e (B) apiário Ilha doPorto, (C) e (D) apiário Paripueira, (E) e (F) apiário Primavera.

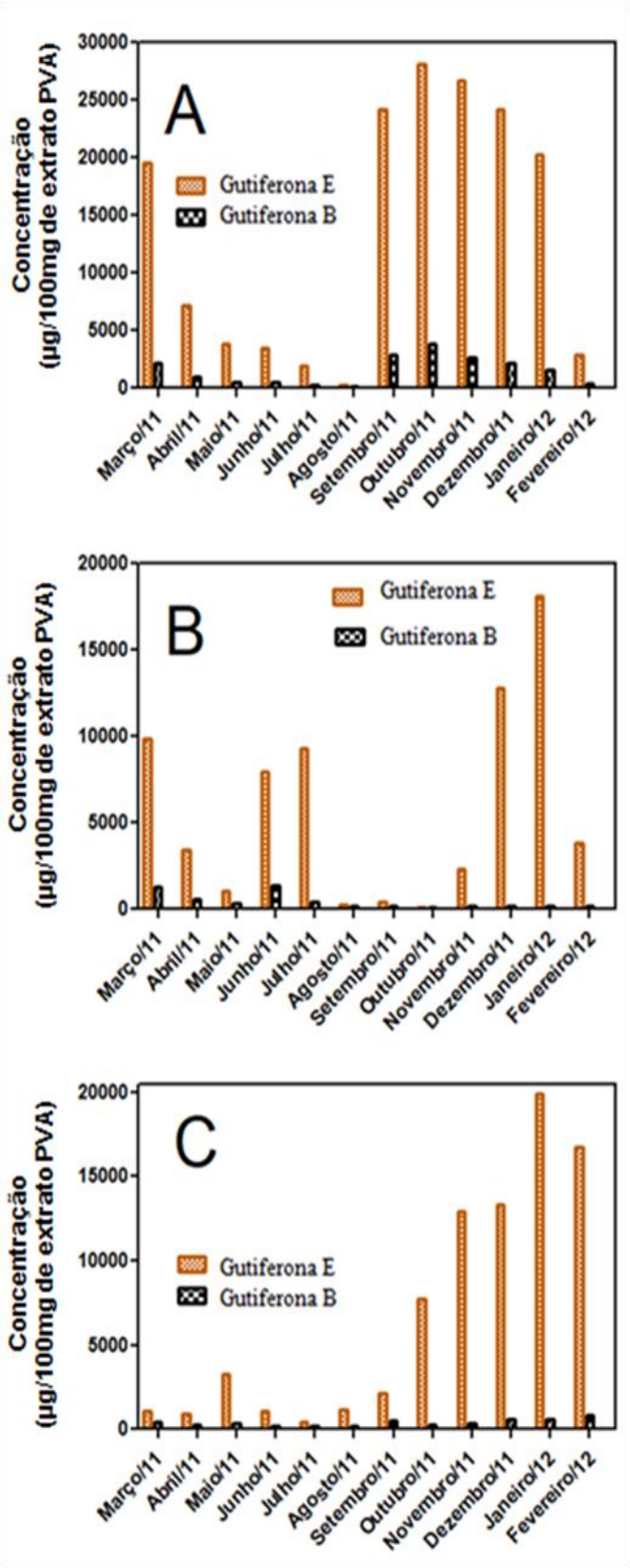


Já pela metodologia LC/ESI/Orbitrap/FTMS, o apiário Ilha do Porto mostrou que os meses de abril até agosto, conseguiram manter elevadas concentrações nos flavonoides (formononetina, isoliquiritigenina, biocanina A), figura 8 A; mantendo esse mesmo perfil quando se observa os flavonoides (pinocembrina, daidzeína e galangina), além de mostrar que nos meses de setembro a janeiro ocorreu um aumento das gutiferas em sua composição, figura 9 A. Diferentemente do apiário Ilha do Porto, o apiário Paripueira conseguiu manter a concentração dos flavonoides majoritários durante praticamente todo o período do estudo, como observado na Figura 8 E, para os flavonoides minoritários ocorreu uma elevação nos meses de julho, agosto setembro e outubro. Além de mostrar uma elevação das gutiferas nos meses de outubro a fevereiro, figura 9 C.

Figura 8- Determinação da concentração de flavonoides usando LC/ESI/Orbitrap/FTMS para biomarcadores específicos. (A) e (B) apiário Ilha do Porto, (C) e (D) apiário Paripueira, (E) (F) apiário Primavera.



Figura 9- Determinação de gutiferonas usando LC/ESI/Orbitrap/FTMS: (A) Ilha do Porto, (B) Primavera e (C) Paripueira.



5.3 Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios químicos

5.3.1 Determinação de flavonoides e fenóis totais nos extratos de própolis vermelha

As abelhas da espécie melíferas, que produzem própolis vermelha, já foram relatadas em três continentes: África (Nigéria), Ásia (Arábia Saudita) e América (Brasil, Cuba, México e Venezuela) (SADDIQ & MOHAMED, 2016). A própolis vermelha encontrada nesses locais tem suas próprias particularidades em relação à composição química. Essas características específicas estão associadas com a localização geográfica onde a própolis vermelha é produzida. As condições edafoclimáticas e a fonte botânica são fatores importantes, que podem afetar a composição da própolis (SILVA et al., 2015).

A PVA é um caso atípico em relação à presença de isoflavonoides. É possível encontrar muitas classes de metabólitos secundários, como flavanas (catequina) e isoflavanas (vestitol) presentes na própolis vermelha, sem absorção na região visível e compostos que possuem baixa reatividade com reagentes específicos, como o cloreto de alumínio nas reações clássicas para a determinação de flavonoides totais. Assim, a espectrofotometria UV é usada para testar o conteúdo da totalidade de flavonoides, a qual foi baseada na leitura direta em um comprimento de onda específico, sem a presença de reações químicas quelantes e/ou reagentes de derivatização (REGUEIRA et al., 2017).

Em estudos anteriores, a tintura, extratos brutos, extrato de clorofórmio e microcápsulas de própolis vermelha apresentaram absorbância máxima à 280 nm, semelhante ao padrão de catequina e diferente do padrão de quercetina, que apresentou comprimento de onda máximo em 250 nm e 370 nm. Assim, vários grupos de pesquisa desenvolveram um método rápido de leitura direta no UV para o conteúdo de flavonoides totais. O padrão analítico de catequina apresenta um perfil espectrofotométrico (específico) semelhante ao da tintura de própolis vermelha e demonstra maior especificidade que a quercetina para o teor de flavonoides totais. Uma das explicações para a maior especificidade da catequina está relacionada à grande quantidade de isoflavonas e isoflavanas presentes nas tinturas de própolis vermelha, nas quais a absorção máxima ocorre a 280 nm.

Em relação à presença de flavonoides, o apiário Ilha do Porto apresentou uma concentração média de 26 mg de catequina a cada 100 mg do extrato. Os dados de sazonalidade do apiário Ilha do Porto demonstraram uma variação sazonal bimodal (2 ciclos de máxima concentração) com maiores concentrações de flavonoides para os meses de julho,

agosto e setembro (34,5 mg de catequina / 100mg de extrato bruto) e outro pico de concentração máxima nos meses de janeiro e fevereiro (31,8 mg de catequina / 100mg de extrato bruto), como mostrado na Figura 10 A1. Os meses de março, maio e dezembro apresentaram concentração bem abaixo da média no ano (20 mg de catequina / 100mg de extrato bruto).

Já o apiário Primavera demonstrou um perfil de manutenção da concentração em praticamente todo o período estudado (concentração média de 30 mg de catequina/ 100 mg do extrato). Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, as concentrações chegaram próximo de 33 mg de catequina / 100 mg de extrato bruto, entretanto os meses de junho e julho obtiveram os menores resultados(23 mg de catequina / 100mg de extrato bruto). Quando comparado com os outros dois apiários, ele proporcionou uma elevada concentração lote a lote dessa matéria-prima, Figura 10 B1.

Dos três apiários estudados, o apiário Paripueira mostrou os resultados mais inferiores (concentração média de 23mg de catequina/ 100 mg do extrato), como pode ser observado na Figura 10 C1 nos meses de abril, maio e junho, onde apenas se aproximaram de 13 mg/ 100 mg de extrato bruto e os meses onde conseguiu os resultados mais expressivos foram os meses de julho e agosto (31,8 mg de catequina / 100mg de extrato).

Levando em consideração às exigências mostradas anteriormente, o método apresentou linearidade, precisão intermediária e exatidão na faixa de concentração entre 2 e 10 µg/mL. Fica evidenciado que pode ser feito no laboratório uma validação para o método de Folin-Ciocalteu no âmbito do laboratório (Tabela suplementar 2, Anexo 2). Todos os resultados mostrados por esse trabalho, atende as exigências impostas pela ANVISA (RDC 899/2003), pois ficam abaixo dos 5,99% de variação de precisão e exatidão.

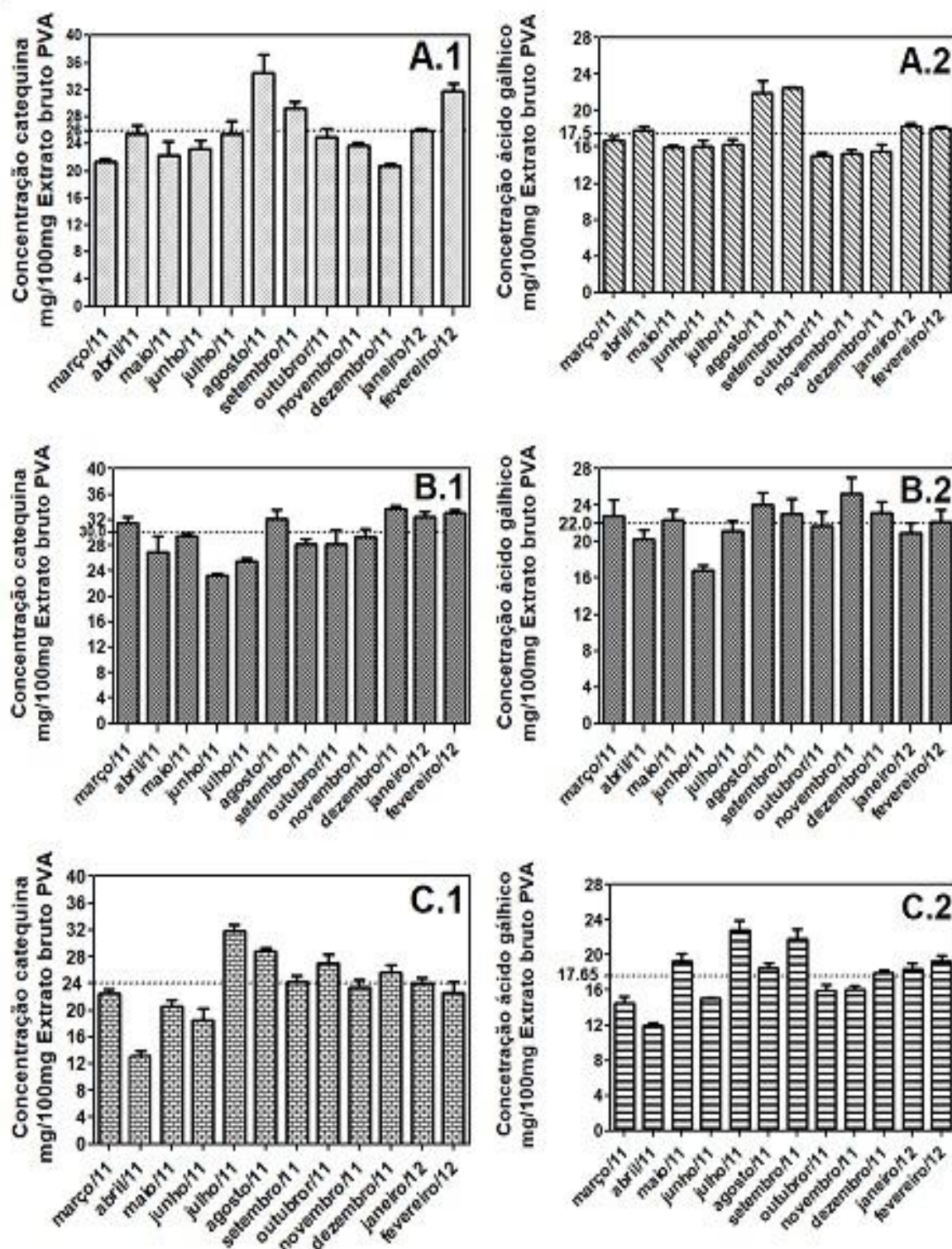
O perfil obtido da variação sazonal de fenóis totais do apiário Primavera (Marechal Deodoro) mostrou baixa variação entre os meses, mantendo uma boa qualidade avaliado pelo perfil sazonal. O mês de junho ocorreu uma concentração distante do padrão mostrando durante o ano (16,8mg de ácido gálico/ 100mg de extrato bruto). Os meses que ganharam destaque nesse estudo foram: agosto e novembro (24 mg e 25 mg de ácido gálico/100mg de extrato bruto) com maiores quantidades de fenóis totais. E entre os três apiários, foi o que apresentou o melhor resultado, observando na Figura 10 B2.

O apiário Ilha do Porto, mostrou um perfil interessante em relação à concentração de ácidos fenólicos durante o ano estudado, pois mostrou que os meses de agosto e setembro se destacaram, se comparado aos outros meses, outros dois picos de concentração podem ser

observados, nos meses de agosto e setembro, que obtiveram pouco mais de 22 mg/100 mg e 23 mg/100 mg de fenóis no extrato bruto, respectivamente, e os meses onde ocorreu uma diminuição da concentração, a diferença não foi tão grande em relação aos meses que ficaram na média, os meses de outubro e novembro, obtiveram os resultados mais baixos, mas sem destoar dos outros meses, como fica evidenciado na Figura 10 A2.

Observando o gráfico do perfil do apiário Paripueira, percebe-se que se comparar com os outros dois apiários, ele apresentou as menores concentrações durante todo o ano. Entre os meses de julho e setembro mostraram picos elevados com concentrações de 22,8 mg/100 mg e 21,7 mg/100 mg de fenóis no extrato bruto, já o mês de abril 11,9 mg/100 mg de fenóis no extrato bruto, mostraram quase 50% da concentração dos picos máximos, mostrado na figura 10 C.2. A variação encontrada em compostos químicos de própolis vermelha é devido a uma pressão sazonal sofrida pela fonte botânica, pois o elemento médio na produção da própolis vermelha é uma resina secretada pelas árvores *Dalbergia ecastophyllum* e a produção e acumulação de metabolitos secundários de plantas são influenciados por variações sazonais (REGUEIRA-NETO et al., 2017).

Figura 10- Perfil sazonal de flavonoides (A.1, B.1, C.1) e fenóis totais (A.2, B.2, C.2) de extratos brutos de PVA dos apiários (Ilha do Porto: A, Primavera: B, Paripueira: C).



Quando se fala sobre produto natural, ganha-se uma importância muito grande a padronização lote a lote da PVA que será produzida, pois a indústria farmacêutica está investindo na própolis vermelha de Alagoas, mas a qualidade precisa ser mantida durante todo o ano, pois nos últimos anos os produtos apícolas de forma geral, ganharam uma visibilidade

por meio da média (SENA-LOPEZ et al., 2018). Como diversos fatores influenciam na concentração dos constituintes, como vegetação, clima, manuseio das caixas, o estudo de sazonalidade torna-se muito importante como parâmetro, para observar o que acontece com essas substâncias e principalmente com os ácidos fenólicos (SOUZA-MACHADO et al., 2016).

5.3.2 Capacidade antioxidante dos extratos de PVA estudo de sazonalidade

Muitos estudos têm relatado atividade antioxidante para os flavonoides, devido à sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e para eliminar os radicais livres (AHN et al., 2004). A fração hexânica da própolis vermelha apresentou a maior concentração de flavonoides totais e mostrou a melhor atividade sequestradora para radicais livres (ALENCAR et al., 2007). Cabra et al. (2009) também descobriu que a fração hexânica obtida da própolis vermelha mostrou a maior atividade antioxidante (74,4%), sequestrando o radical livre DPPH. Além do mais, Frozza et al. (2013) demonstraram que o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha tem importante capacidade de eliminação de DPPH (IC_{50} 270,13 μ g/mL).

Todas as amostras do estudo sazonal apresentaram atividade antioxidante com valores superiores a 80,6%, 81,5% e 78,5% na concentração do extrato de 80 μ g/mL para as amostras de Própolis do apiário Ilha do Porto (A), Primavera (B) e Paripueira (C), respectivamente. Os estudos científicos de De Mendonça et al. (2015) mostram que a própolis vermelha brasileira apresenta atividade antioxidante com valores de IC_{50} entre 5,0 e 8,0 μ g/mL. No entanto, foram observadas variações no percentual de atividade antioxidante de IC_{50} para as amostras de própolis A e própolis C com valores de IC_{50} superiores a 10-12 μ g/mL nos meses entre março e agosto. Observou-se que nesses meses algumas amostras apresentaram concentrações máximas de flavonoides (mês de agosto para própolis A e meses de julho e agosto própolis C). A própolis A apresentou IC_{50} de 25,73 μ g/mL e 20,40 μ g/mL nos meses de julho e agosto, respectivamente. A própolis B apresentou valores de IC_{50} de 9,25 μ g/mL e 8,45 μ g/mL para os meses de maio e julho, respectivamente. O própolis C apresentou valores de IC_{50} de 35,47 μ g/mL e 51,03 μ g/mL para os meses de abril e junho, respectivamente (Tabela 3). A própolis de Sonora apresentou bons resultados de atividade antioxidante utilizando o método DPPH na faixa de concentração de 12,5 μ g/mL a 100 μ g/mL. A própolis San Juan da Argentina apresentou boa atividade antioxidante com valores de IC_{50} entre 15 μ g/mL e 42 μ g/mL durante um ciclo sazonal anual.

Figura 11- Perfil de atividade antioxidante e avaliação gráfica da IC₅₀ do apiário Ilha do Porto durante ciclo de 12 meses de sazonalidade.

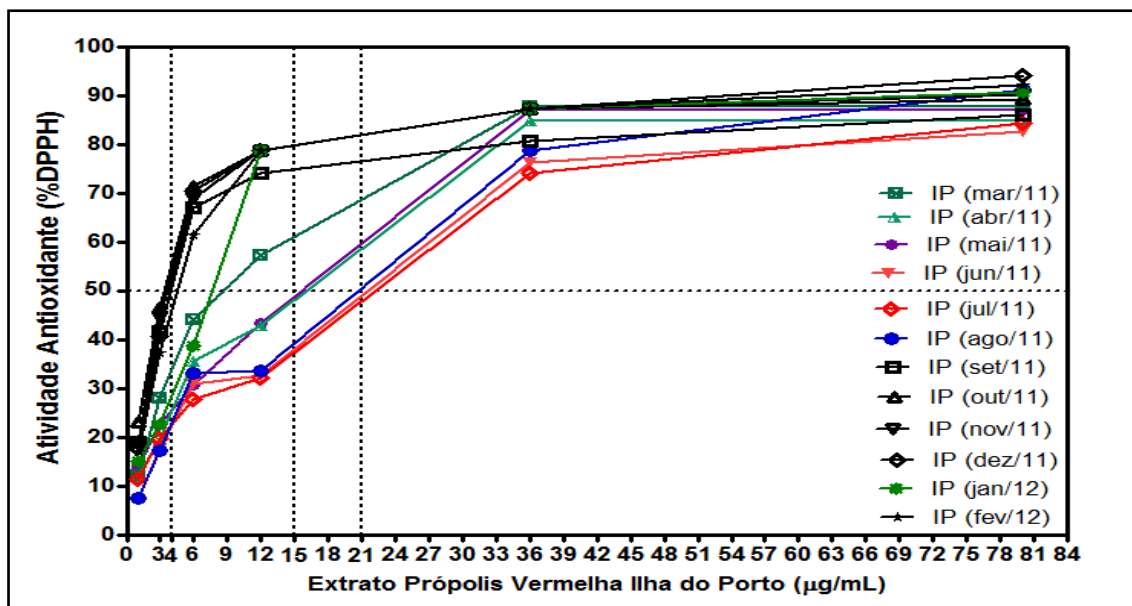


Figura 12- Perfil de atividade antioxidante e avaliação gráfica da IC₅₀ do apiário Paripueira durante ciclo de 12 meses de sazonalidade.

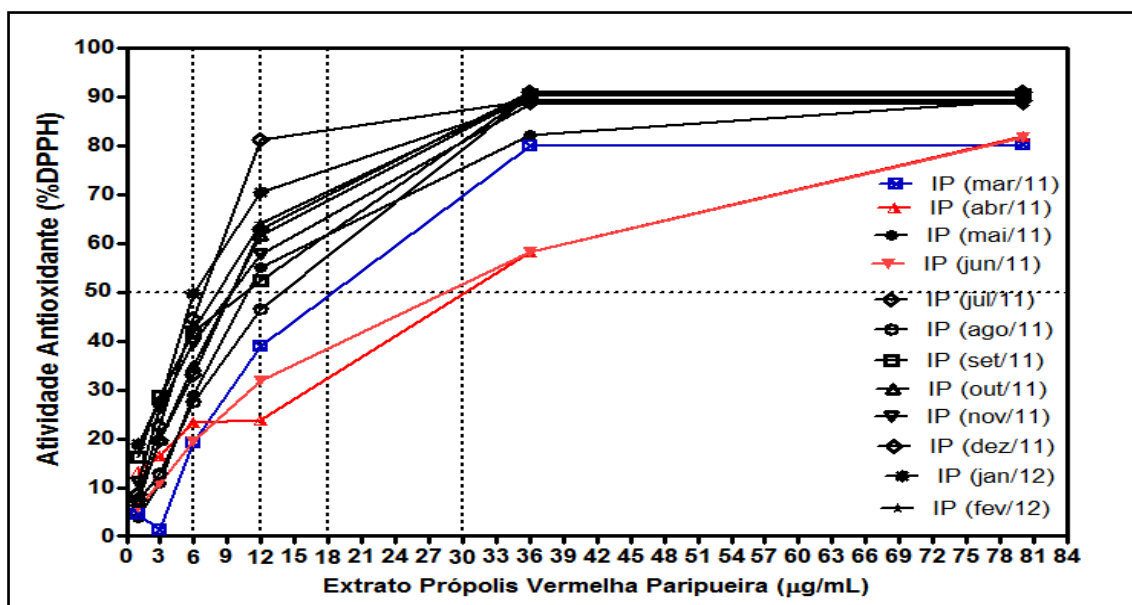
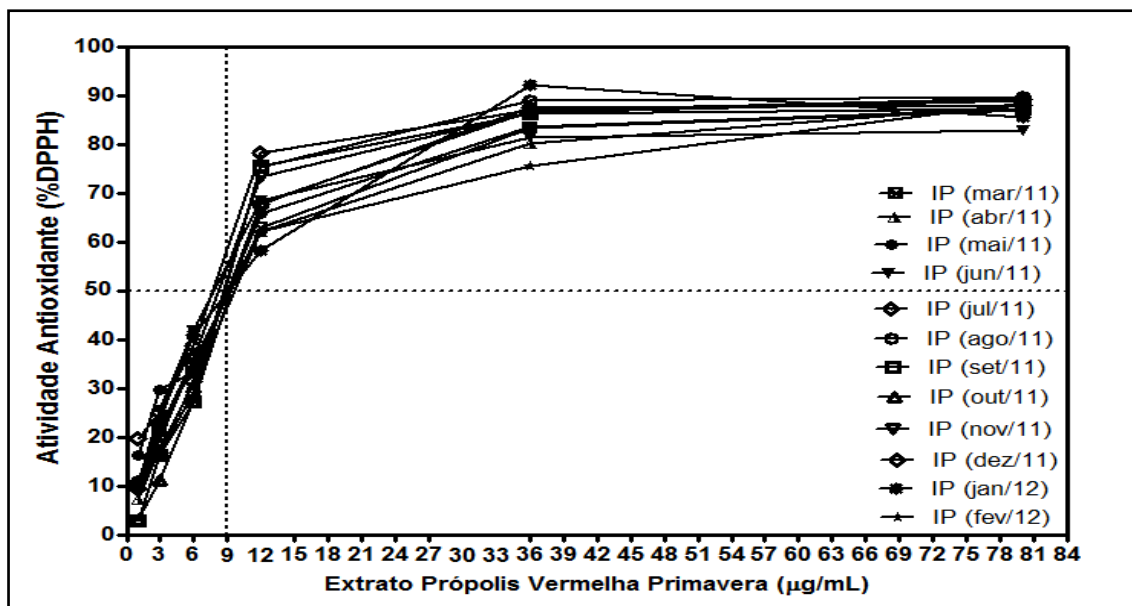


Figura 13- Perfil de atividade antioxidante e avaliação gráfica da IC₅₀ do apiário Primavera durante ciclo de 12 meses de sazonalidade.



Nos últimos anos, vem ocorrendo uma crescente busca por antioxidantes naturais, para que sejam utilizados em diversos produtos alimentícios ou medicamentos, dessa forma substituindo os antioxidantes sintéticos, pois eles podem causar diversos problemas e até câncer. (NUNES et al., 2013).

Quando se faz uma breve comparação com a própolis verde, que possui estudos mais aprofundados, Zhag et al.(2017), mostrou que esse tipo de própolis possui um perfil em que não apenas as quantidades de fenóis totais, mas também de flavonoides totais variaram amplamente em diferentes amostras de própolis verde brasileira, variando de 87,5mg/g a 148,6 mg/g e 38,4mg/g a 67,6 mg/g, respectivamente, todas as amostras mostraram uma boa atividade de eliminação de radicais livres com valores de IC₅₀ variando de 93,51 µg/mL a 190,27 µg/mL. Os dados indicaram que são os fenóis que contribuem para a atividade antioxidante, a qual está de acordo com Mello e Hubinger (2012), que relataram que a atividade antioxidante da própolis verde brasileira é atribuída principalmente aos altos níveis de conteúdo fenólico.

No geral, os resultados sugerem que a propolis vermelha pode desempenhar um papel vital nos caminhos metabólicos e protegem as células contra o estresse oxidativo, mas pesquisas adicionais são necessárias para confirmar seu potencial. Embora existam vários estudos que corroboram o potencial da atividade antioxidante da própolis, contudo não há dados robustos sobre a dose segura em humanos (FREIRES et al., 2016).

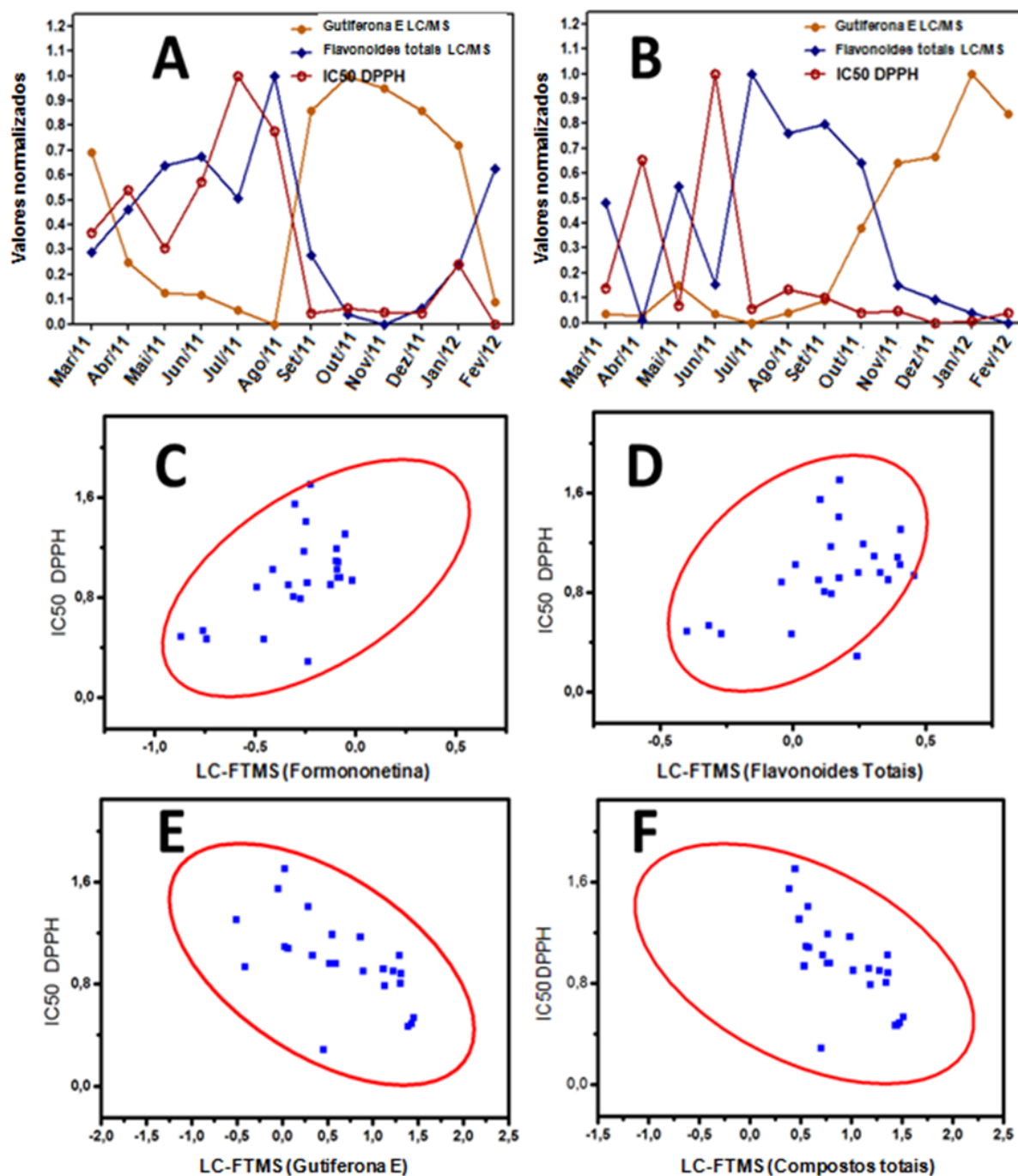
Observou-se que há baixa relação na diminuição da IC₅₀ (alta atividade antioxidante) com os valores de concentração isolada de flavonoides, mas ocorre uma correlação mais forte entre as gutiferas E usando dados LC/Orbitrap/FTMS. Houve uma boa correlação dos valores de diminuição de IC₅₀ com as altas concentrações de gutiferas E e a soma da concentração total de compostos. A figura 14 mostra a correlação de Pearson entre alguns flavonoides (formononetina, isoliquiritigenina), compostos totais, gutiferas E, gutiferas B e gutiferas totais e valores de IC₅₀ DPPH. As amostras de própolis de Ilha do Porto e Paripueira, que apresentaram altos valores de IC₅₀ (ou diminuição da atividade antioxidante em alguns meses no período chuvoso), principalmente nos meses em que houve diminuição na concentração da soma dos flavonoides totais e/ou gutiferas (os meses de março a agosto na própolis de Ilha do Porto; março e junho até própolis de Paripueira).

Tabela 3- Concentração Inibitória (IC₅₀) do extrato de própolis vermelho brasileiro contra o radical DPPH durante o estudo de sazonalidade (março/2011 a fevereiro/2012).

Apiario	mar.	abr.	Mai	jun.	jul.	ago.	set.	out.	nov.	dez.	jan.	fev.
Propolis A	10.66	14.82	9.18	15.53	25.73	20.40	2.96	3.45	3.10	2.97	7.68	1.95
Propolis B	8.39	14.81	9.26	6.40	8.45	8.43	7.84	8.26	7.66	7.79	8.51	14.00
Propolis C	12.43	35.47	9.19	51.03	8.71	12.16	10.65	8.04	8.36	6.19	6.44	8.02

Os ensaios antioxidantes e antibacterianos demonstraram a boa qualidade da matéria prima vermelha da própolis. O método DPPH e o teste de CIM (teste de microbiologia) mostraram-se sensíveis para detectar variações nas concentrações de compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis vermelha, sendo também ferramentas importantes para o monitoramento da qualidade dos extratos da própolis vermelha brasileira. A análise estatística de Pearson demonstra correlação entre os valores de IC₅₀ do teste DPPH, com efeito sinérgico entre as gutiferas e a soma do total de compostos fenólicos. A análise de PCA e PLS-DA revelou correlação entre os dados de LC/Orbitrap/FTMS (concentrações de flavonoides e fungicidas isoliquiritigenina) e teste de CIM e revelou baixa atividade antibacteriana da própolis vermelha devido a baixos níveis de concentração não apenas de flavonoides mas também de gutiferas.

Figura 14- Correlação entre IC_{50} do método DPPH e concentrações de flavonoides e gutíferonas E para a própolis A (A) e própolis C (B). Correlação de Pearson entre IC_{50} do método DPPH e formononetina (C), flavonoides totais (D), gutíferonas E (E) e soma da concentração total de compostos fenólicos (F) usando concentrações dos dados de LC-Orbitrap-FTMS.



5.4. Monitoramento sazonal dos marcadores de própolis vermelha através de ensaios biológicos

5.4.1 Ensaio tripanossomicida

O interesse da indústria farmacêutica na procura por novos medicamentos relacionados a esse patógeno praticamente inexistente, isso ocorre pelo fato de não possuir rentabilidade para ela. Os fármacos usados normalmente para o controle em áreas endêmicas possuem uma baixa eficiência e foram descobertos a mais de 100 anos. Já foi descrito em diversas pesquisas a eficiência da própolis no uso antiparasitário. Como descrito por Higashi, Castro, 1995, quando buscaram o perfil de efetividade de extratos da própolis frente ao *Tripanossoma cruzi* e as interações com as células hospedeiras, comprovaram a lise total de tripomastigotas presente na corrente sanguínea após 24 horas, usou-se uma concentração de 100 µg/mL do extrato etanólico da própolis.

Constatou-se que, todas as amostras da própolis vermelha de Alagoas, oriundas dos três apiários durante o período utilizado (março/2011 a fevereiro/2012), mostraram atividade tripanossomicida, pois a literatura relata que para se considerar o extrato ativo, a inibição do crescimento deve ser menor ou igual a 10%, como mostrada na Tabela 4. Quanto maior for a concentração, menor será o crescimento desse parasita, ocorrendo uma coerência na Tabela 4, sendo assim todos os meses obtiveram resultados satisfatórios. Quando se compara as três própolis em relação à média obtida durante o estudo, observa-se que a própolis A, B e C em relação à concentração de 20µg/mL, apresentaram inibição de crescimento maior que 98% (crescimento do parasita $\leq 2\%$). Quando o ensaio foi realizado na concentração de 20µg/mL, apenas a própolis B (Primavera) apresentou inibição de crescimento maior que 98% (crescimento do parasita $\leq 2\%$), enquanto as própolis A (Ilha do Porto) e C (Paripueira) apresentaram inibição de crescimento maior que 97,2% (crescimento do parasita $\leq 3,8\%$) demonstrando que todas as amostras de própolis apresentam atividade tripanossomicida contra a espécie de *Tripanossoma brucei*. Com esses resultados, abre-se um leque ainda maior para o uso desse produto natural, como forma de tratamento.

Tabela 4- Inibição do crescimento em (%) do *Trypanossoma brucei brucei* S0247 frente ao extrato bruto da própolis durante o estudo de sazonalidade (março/2011 a fevereiro/2012).

Apiário	mar.	abr.	mai	jun.	jul.	ago.	set.	out.	nov.	dez.	jan.	fev.
Propolis A¹	0.7	0.7	0.5	0.3	0.1	0.0	0.0	1.9	1.1	0.1	0.0	0.4
Propolis A²	0.9	1.9	1.5	1.7	0.6	0.1	0.7	3.7	2.9	3.1	0.1	1.3
Propolis B¹	1.1	0.9	0.1	0.2	0.2	0.9	0.5	0.0	0.3	0.1	0.5	0.2
Propolis B²	2.0	1.1	1.4	1.0	1.9	1.2	0.8	0.1	0.8	0.9	1.7	0.3
Propolis C¹	0.9	0.6	0.4	0.9	0.1	0.3	0.0	0.3	0.2	1.1	0.5	1.2
PropolisC²	1.7	3.8	2.2	3.4	2.3	0.4	1.2	0.7	0.3	3.1	0.8	1.4

C1: Concentração de 20µg/mL; C2 : Concentração de 10 µg/mL; ≤ 10% é considerado bioativo contra forma Tripomastigotas

Marcucci et al., (2001) além de conseguir o isolamento de quatro compostos presentes na própolis, (1) ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), (2) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), (3) ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), e (4) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB), conseguiu comprovar que os compostos 1 e 4, foram efetivos contra *Trypanossoma cruzi*, além de possuírem efetividade em bactérias, com exceção do composto 1. Testes *in vitro* e *in vivo*, comprovam que a atividade tripanomicida da própolis é dose dependente, mostrando um poder de redução das promastigotas e amastigotas do *Trypanossoma cruzi* em meio de cultura, além de ocasionar a ruptura da membrana de tripomastigotas, que estão presentes na corrente sanguínea e ainda ação contra o *Trypanossoma evansi*, que mostrou ser suscetível a essa matéria prima, pois observou-se a morte de tripomastigotas, após 1 hora de incubação e ainda quando aumentou-se as concentrações da própolis, aumentou também a longevidade de um determinado grupo de ratos, comparando com outro grupo que não utilizou as maiores concentrações (GRESSLER et al., 2012). Não apenas a própolis brasileira possui ação antiparasitária, um bom exemplo de outro tipo, mas que mantém a efetividade desse produto é a própolis búlgara. Comprovou-se que ela proporciona uma diminuição significativa na massa do baço dos ratos estudados, e esse aumento foi ocasionado por reações inflamatórias que ocorreram inicialmente no tratamento, além de ocasionar uma diminuição na carga parasitária do *Trypanossoma cruzi*, e ainda tem o fato de não afetar toxicamente os ratos estudados (DANTAS et al., 2006).

5.4.2 Ensaios microbiológico

No presente estudo, comparou-se concentrações da PVA dos três apiários em relação ao crescimento de cepas gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Pseudomona aeruginosa*). Quando se observa a variação sazonal em relação a cepa de *Staphylococcus aureus*, o apiário Ilha do Porto (Marechal Deodoro) conseguiu inibir o crescimento dessa cepa na maioria dos meses do ano, exceto os meses de maio e julho com crescimento nas concentrações de 66 µg/mL (maio e julho) e 88 µg/mL (julho), respectivamente, tabela 5.

O apiário Paripueira demonstrou que seus resultados foram os menos satisfatórios dos três estudados, pois nos meses de abril (66 µg/mL até 210 µg/mL) e julho (66 µg/mL até 158 µg/mL) ocorreu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, além do mês de março (66 µg/mL) (Tabela 6). Já o apiário Primavera conseguiu inibir em todos os meses o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo assim, mostrando sua eficiência frente a esse patógeno (Tabela 7).

Tabela 5- Atividade antimicrobiana da própolis A (Ilha do Porto) contra *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.

µg/mL	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Inibição de crescimento da cepa; +: Crescimento da cepa

Tabela 6- Atividade antimicrobiana da própolis B (Primavera) contra *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas

µg/mL	MAR/11	ABR/11	MAI/11	JUN/11	JUL/11	AGO/11	SET/11	OUT/11	NOV/11	DEZ/11	JAN/12	FEV/12
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Inibição de crescimento da cepa; +: Crescimento da cepa

Tabela 7- Atividade antimicrobiana da própolis C (Paripueira) contra *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.

µg/mL	MAR/11	ABR/11	MAI/11	JUN/11	JUL/11	AGO/11	SET/11	OUT/11	NOV/11	DEZ/11	JAN/12	FEV/12
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
118	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
88	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
66	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Inibição de crescimento da cepa; +: Crescimento da cepa

Em relação ao estudo sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, a própolis do apiário Primavera conseguiu inibir por completo. Já o apiário Paripueira mostrou um perfil semelhante em relação à *Staphylococcus aureus*, pois ocorreu crescimento nos meses de março (66 µg/mL), abril (66 µg/mL até 158 µg/mL) e ainda no mês de junho (66 µg/mL até 118 µg/mL). O apiário Ilha do Porto ocorreu crescimento apenas no mês de julho na concentração de 66 µg/mL.

Em estudo desenvolvido por ODOLNI et al., (2011), frações clorofórmicas foram ativas contra *Staphylococcus aureus* (CIM entre 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL) e *Streptococcus*

mutans (CIM entre 62,5 e 125 µg/mL). A isoliquiritigenina foi a mais potente (CIM entre 15,6 e 31,2 µg/mL). Bispo Junior et al. (2012) verificou que extratos etanólicos de própolis vermelha mostraram atividade antimicrobiana contra gram positivas (100%) e gram negativas (62,5%).

Tabela 8- Atividade antimicrobiana da própolis A (Ilha do Porto) contra *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.

µg/mL	MAR/11	ABR/11	MAI/11	JUN/11	JUL/11	AGO/11	SET/11	OUT/11	NOV/11	DEZ/11	JAN/12	FEV/12
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Inibição de crescimento da cepa; +: Crescimento da cepa

Tabela 9- Atividade antimicrobiana da própolis B (Primavera) contra *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.

µg/mL	MAR/11	ABR/11	MAI/11	JUN/11	JUL/11	AGO/11	SET/11	OUT/11	NOV/11	DEZ/11	JAN/12	FEV/12
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	+	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	+	—	+	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	+	—	+	-	-	-	-	-	-	-	-
66	+	+	—	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: Inibição de crescimento da cepa; +: Crescimento da cepa

Tabela 10- Atividade antimicrobiana da própolis C (Paripueira) contra *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes concentrações do extrato de própolis testadas.

µg/mL	MAR/11	ABR/11	MAI/11	JUN/11	JUL/11	AGO/11	SET/11	OUT/11	NOV/11	DEZ/11	JAN/12	FEV/12
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: -: **Inibição de crescimento da cepa**; +: **Crescimento da cepa**

Regueira Neto et al. (2016), compararam a atividade antibacteriana das amostras de propólis vermelha do estado de Pernambuco nas estações chuvosas (abril até agosto de 2014) e secas (dezembro/2015 até março/2016), e observou sua efetividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, ocorreu variações sazonais nas MICs contra *Staphylococcus aureus*, mas não em relação a *Pseudomonas aeruginosa*.

Em outras pesquisas relacionadas à variação sazonal da atividade antimicrobiana da própolis contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas, mas sem diferenças significantes durante o ano da pesquisa (JORGE et al., 2012). No entanto, amostras de própolis argentinas que foram coletadas no verão (dezembro - março) e no outono, mostraram maiores atividades quando comparadas as outras épocas do ano (ISLA et al., 2012).

5.5. Estudos de correlação multivariada

5.5.1 Estudo de correlação multivariada entre métodos analíticos de quantificação de flavonoides

A correlação entre os métodos analíticos utilizados para quantificação de flavonoides foi realizada usando estatística de matrix scatter e correlação de Pearson.

Consegue-se observar que as metodologias utilizadas mantiveram um perfil bem semelhante, como mostrado na Figura 17, onde consegue-se visualizar aumento e diminuição nos diferentes meses do ano. Por exemplo, no mês de julho ocorre um aumento similar nas quatro metodologias, entretanto o método de fenóis totais e a leitura direta por UV-vis para flavonoides, por serem metodologias espectrofotométricas, possuem uma relação direta e os

dados da Figura 17 corroboram com essa informação, pois apresenta um estreitamento na elipse que está relacionada com essas duas metodologias. Em termos de correlação de Pearson elas possuem uma relação de 78%, tabela 10.

Já as metodologias de LC-DAD e LC-MS, mostraram uma relação próxima, como observado na figura 18, com seus pontos mantendo um padrão quase linear, possuindo uma relação de 85%.

Figura 15- Comparação entre os métodos de Fenóis totais, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação ao apiário Ilha do Porto (A) e concentração normalizada (B).

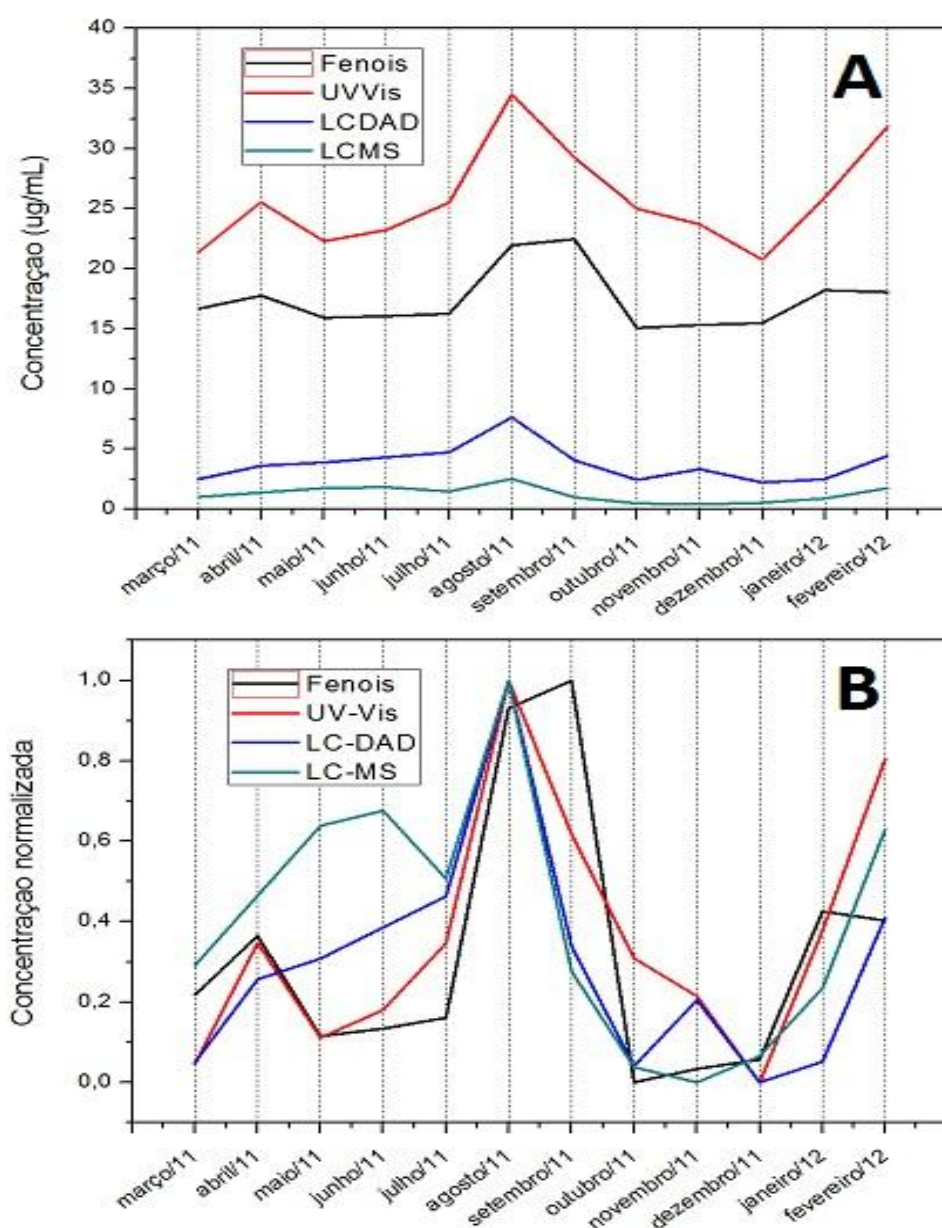


Figura 16- Correlação em matrizes dos métodos de Fenóis totais, UV-Vis, LC-DAD e LC-MS do apiário Ilha do Porto.

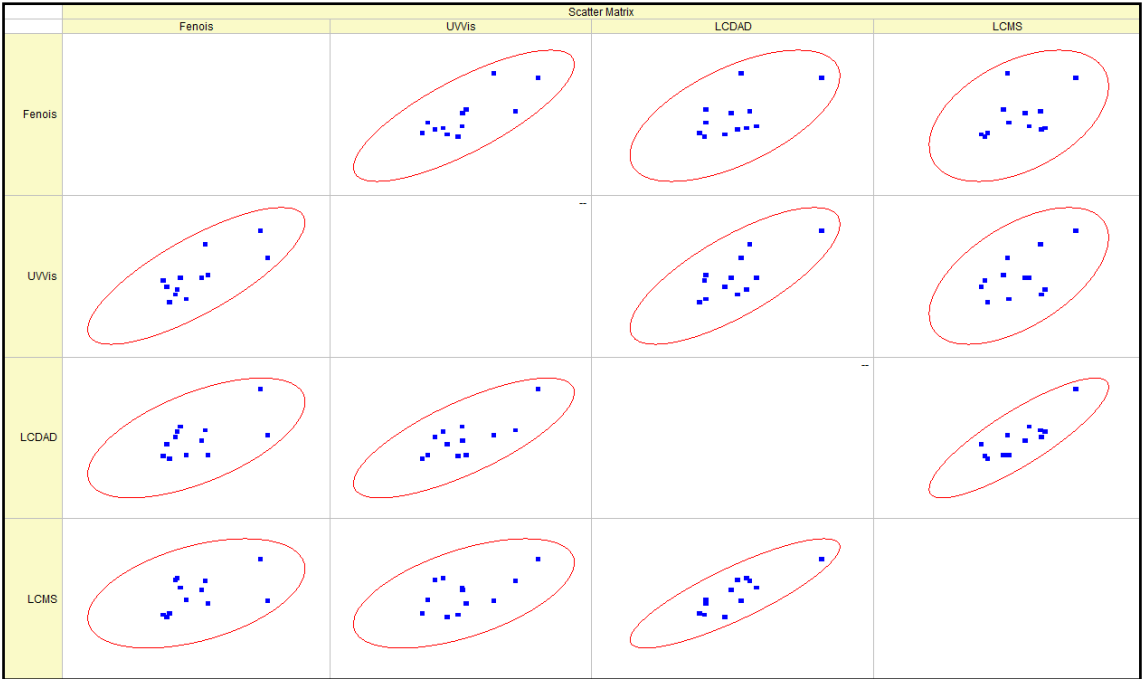
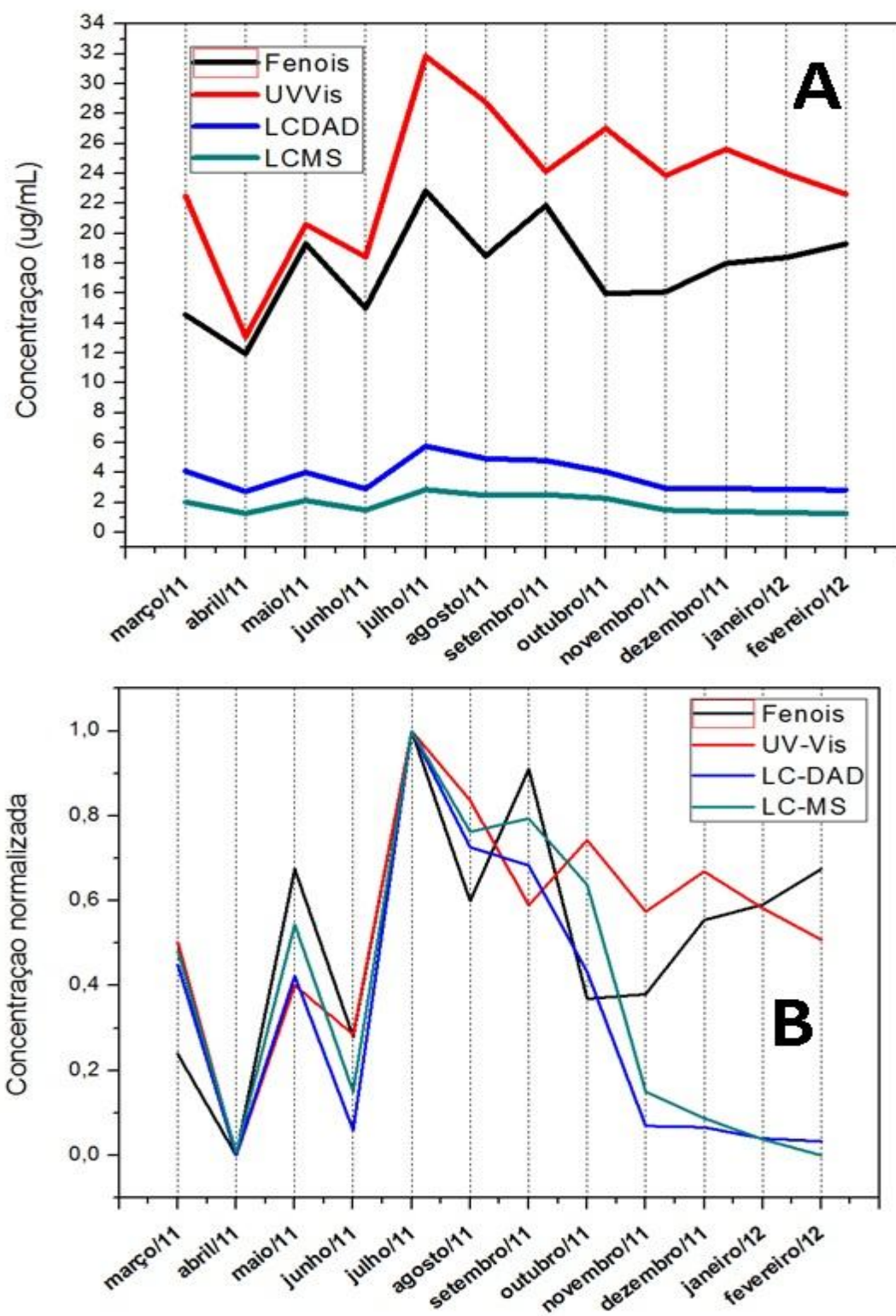


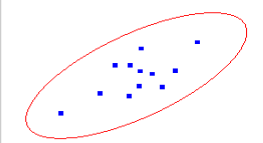
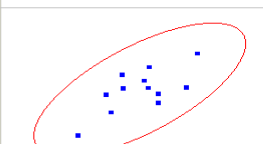
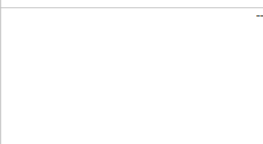
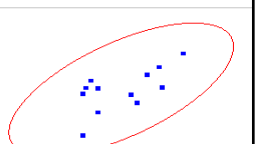
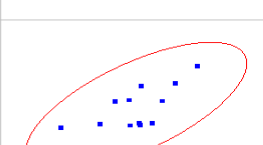
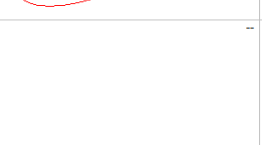
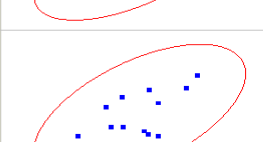
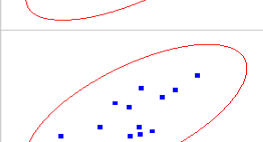
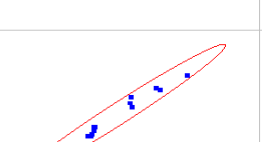
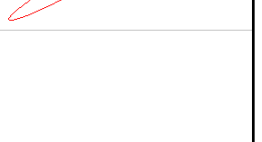
Tabela 11- Correlação de Pearson do apiário Ilha do Porto.

	Fenóis totais	UV-Vis	LC-DAD	LCMS
Fenóis totais	-	78%	60%	44%
UV-Vis	78%	-	75%	55%
LC-DAD	60%	75%	-	85%
LCMS	44%	55%	85%	-

Quando se compara as metodologias utilizadas em relação ao apiário Paripueira, fica ainda mais claro a relação próxima entre as metodologias espectroscópicas e cromatográficas. Na figura 19, pode-se observa que os fenóis totais e a leitura direta por UV-Vis, mostraram perfis praticamente iguais (correlação de 69%), relacionado com a sensibilidade do método, apenas no último trimestre do estudo ocorreu uma inversão. Já em termos de correlação de Pearson, um valor de 98% de proximidade entre o LC-DAD e o LC-MS, e isso se confirma ainda mais quando observa a elipse entre os dois métodos, figura 20.

Figura 17- Comparação entre os métodos de Fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação ao apiário Paripueira (A) e concentração normalizada (B).



	Scat Matrix			
	Fenois	UVVis	LCDAD	LCMS
Fenois				
UVVis				
LCDAD				
LCMS				

	Fenóis totais	UV-Vis	LC-DAD	LCMS
Fenóis totais	-	69%	61%	56%
UV-Vis	69%	-	67%	64%
LC-DAD	61%	67%	-	98%
LCMS	56%	64%	98%	-

67

Figura 19- Comparação entre os métodos de Fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação aos flavonoides do apiário Primavera(A) e concentração normalizada (B).

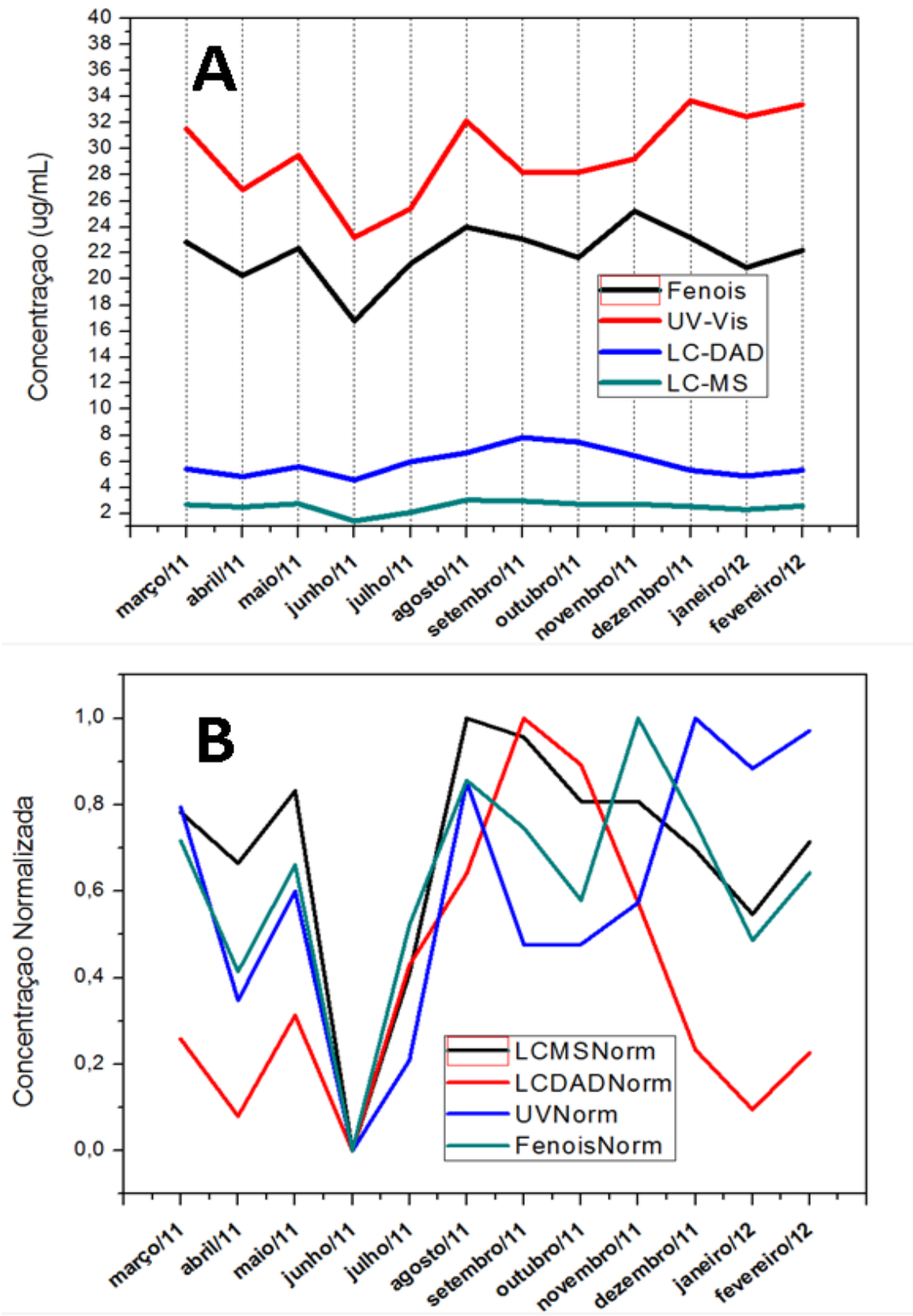


Figura 20- Correlação em matrizes dos métodos de Fenóis, UV-Vis, LC-DAD e LC-MS do apiário Primavera.

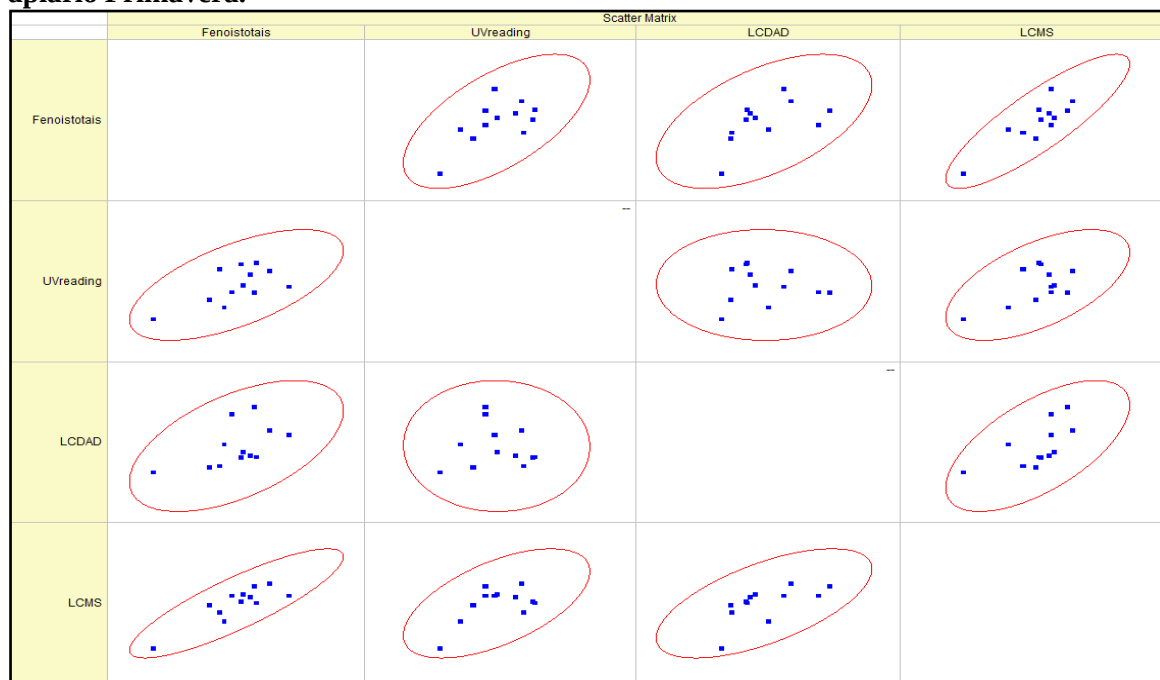


Tabela 13- Correlação de Pearson do apiário Primavera.

	Fenóis totais	UV-Vis	LC-DAD	LCMS
Fenóis totais	-	62%	54%	85%
UV-Vis	62%	-	1%	58%
LC-DAD	54%	1%	-	63%
LCMS	85%	58%	63%	-

5.5.2 Estudo de correlação multivariada entre métodos analíticos de quantificação de flavonoides e gutiferonas

Estudo de correlação de matriz entre os métodos analíticos de quantificação apresentou boa correlação entre os métodos LC-DAD-UV e LC-MS para os apiários Ilha do Porto (-70% de correlação inversa), Primavera (correlação inversa de 62,5%) e Paripueira (correlação inversa de 54%). A menor correlação em relação à correlação anterior apenas com dados de flavonóides se deveu porque o método LC-DAD-UV não conseguiu quantificar as gutiferonas devido à ausência de padrões na época. Apesar disso, os dados LC-MS foram extremamente importantes para verificar o comportamento destes metabólitos secundários gutiferonas ao longo do ano e correlacionar com dados de meteorologia.

Figura 21- Comparação entre os métodos de Fenóis totais, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação à concentração de flavonoides e gutiferonasdo apiário Ilha do Porto (A) e concentração normalizada (B).

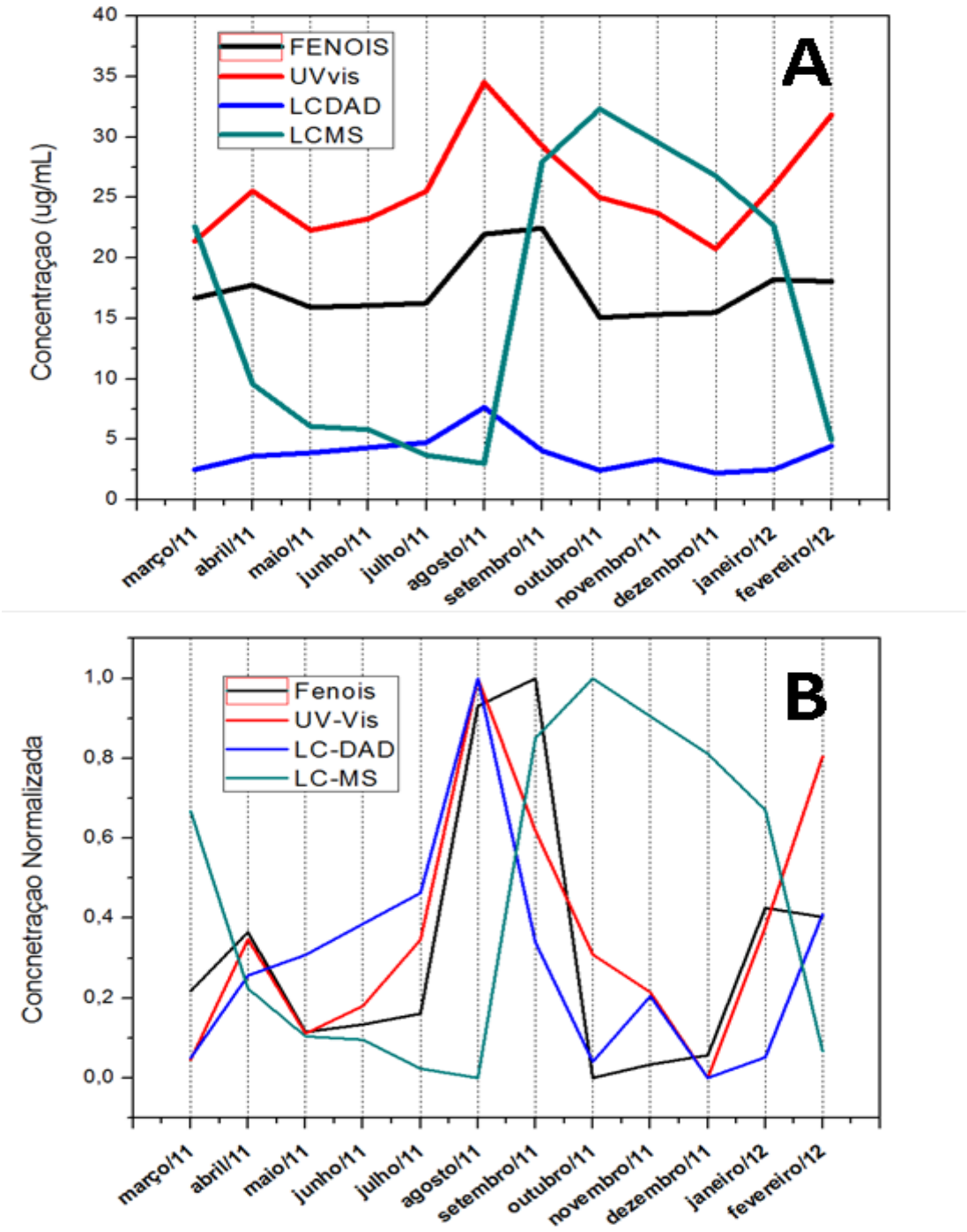


Figura 22- Comparação entre os métodos de Fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação à concentração de flavonoides e gutiferonas do apiário Paripueira (A) e concentração normalizada (B).

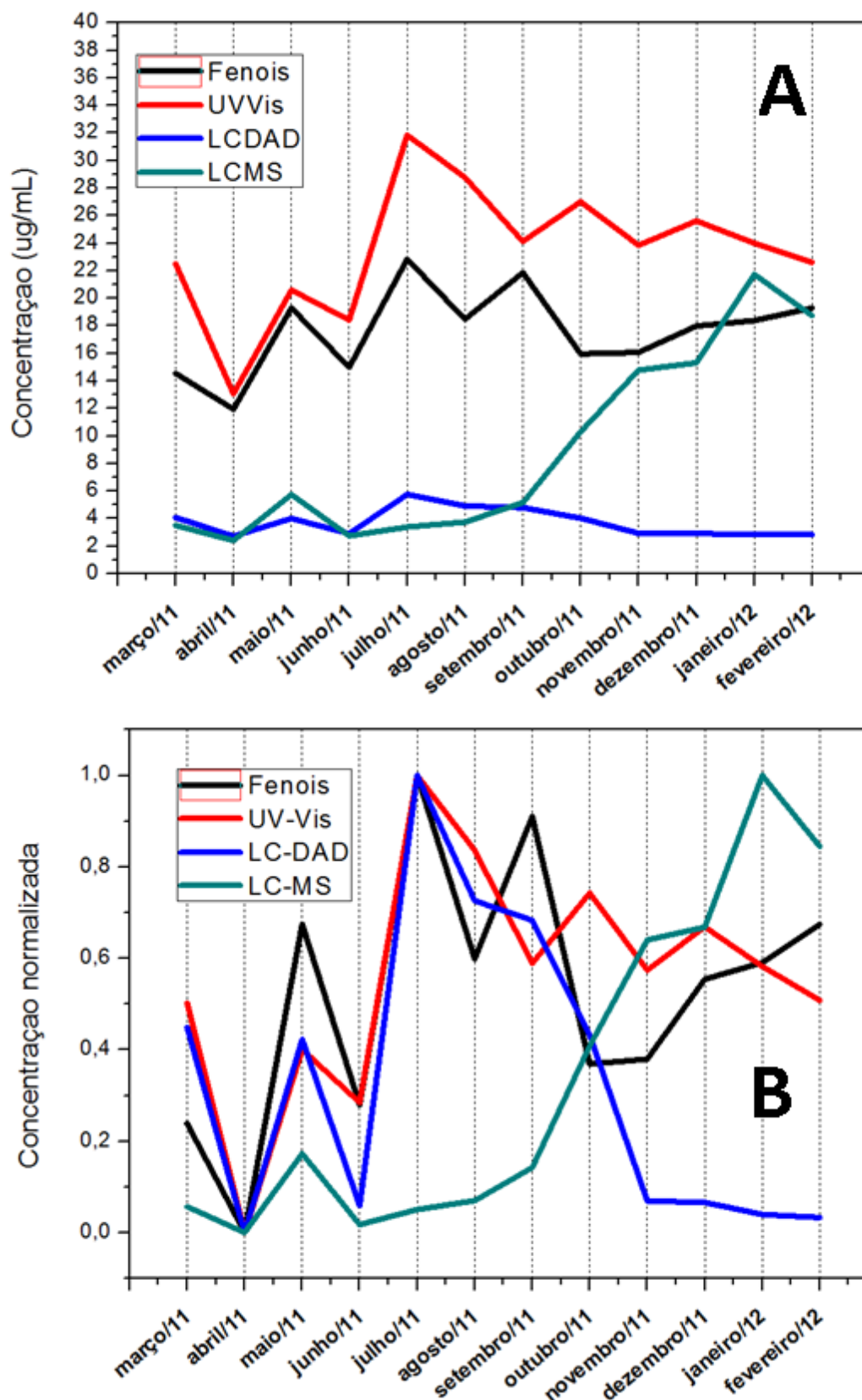
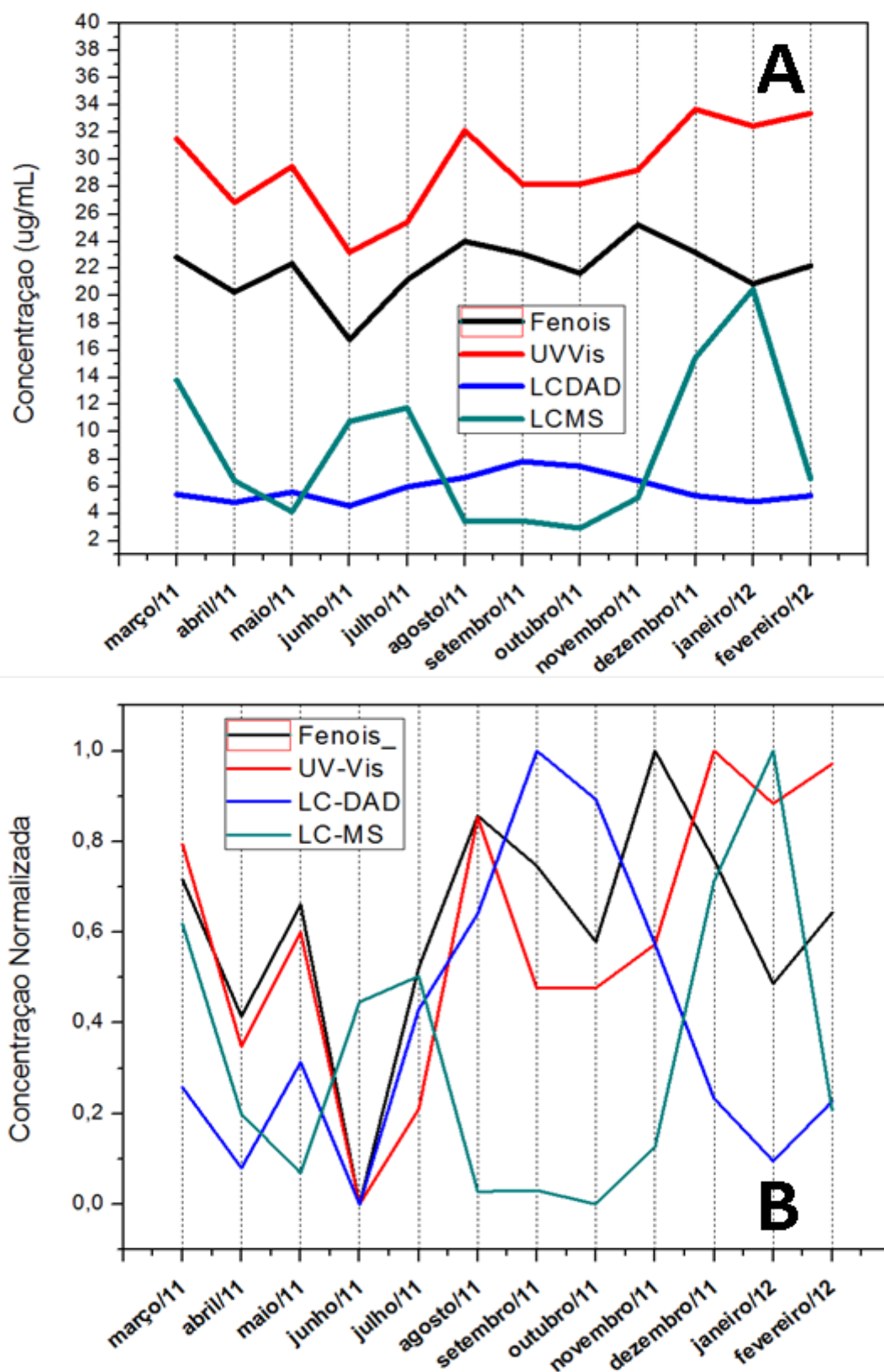


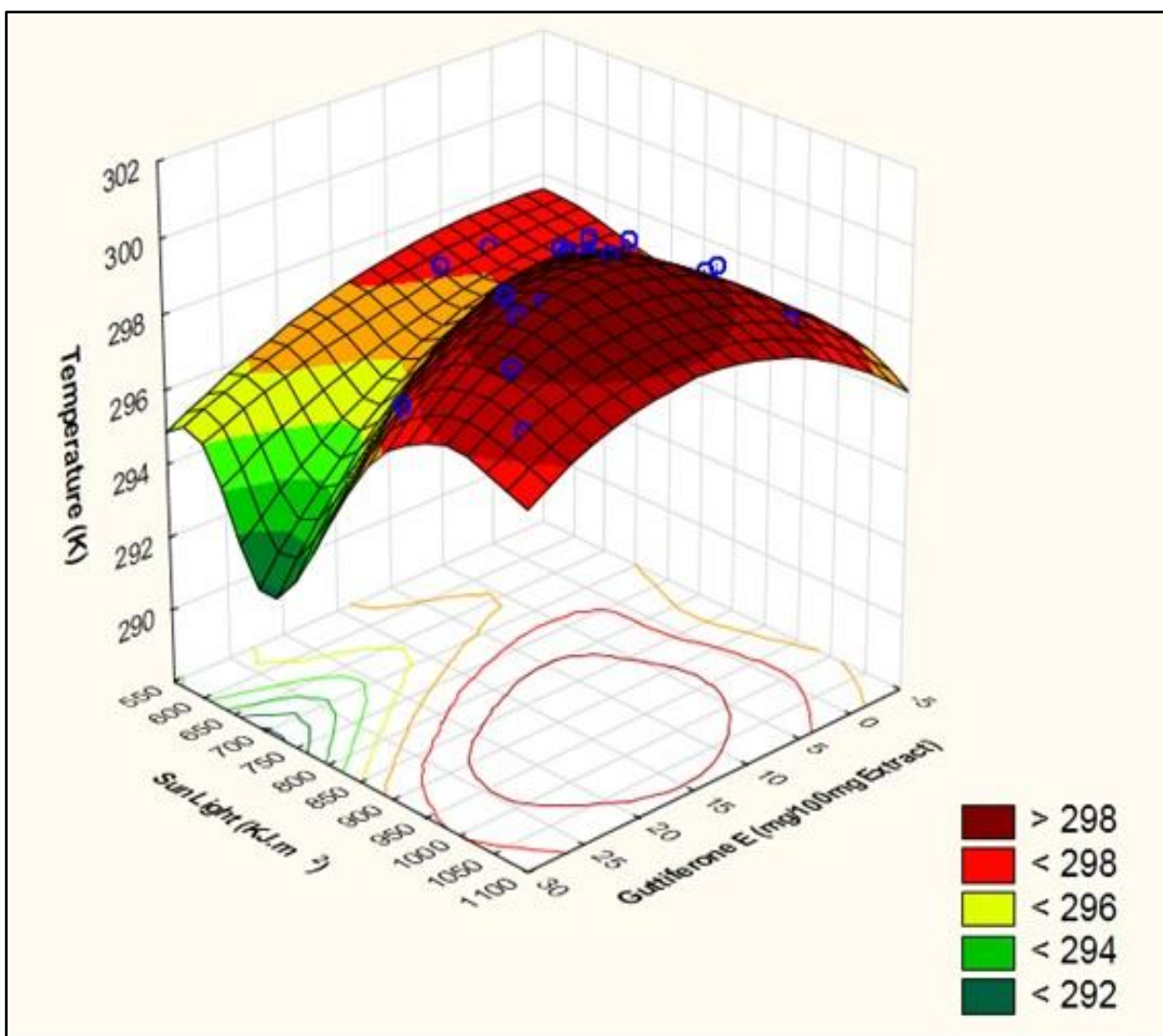
Figura 23- Comparação entre os métodos de Fenóis, UV-Vis, LC-DAD E LC-MS em relação à concentração de flavonoides e gutifersonas do apiário Primavera (A) e concentração normalizada (B).



5.5.3. Estudo de correlação multivariada-químico e meteorológico durante estudo de sazonalidade

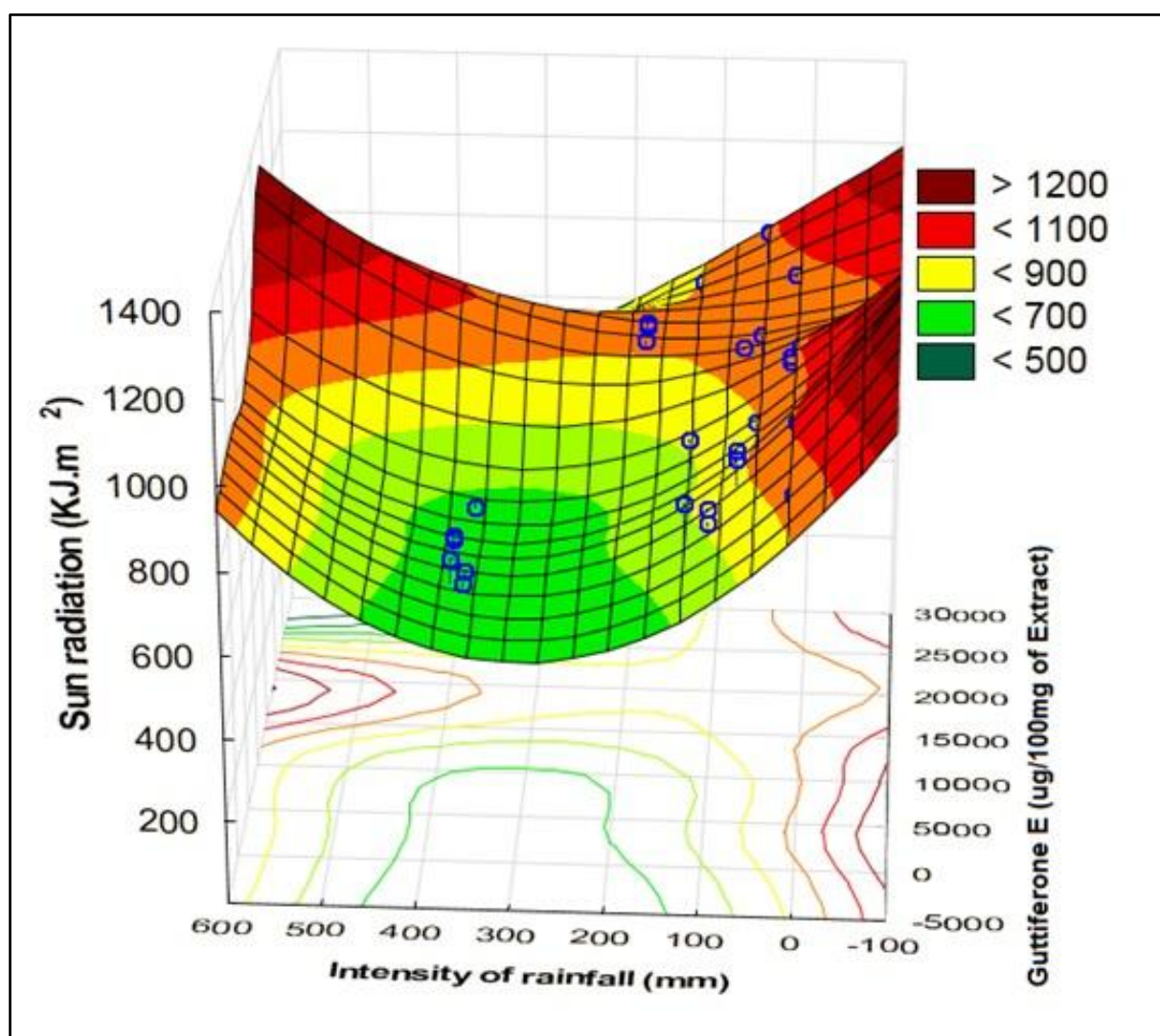
Diversos fatores irão influenciar diretamente a composição da própolis estudada, seja clima, temperatura, umidade, entre outros; influenciando diretamente na concentração de flavonoides, ácidos fenólicos e gutiferas. Nesse sentido, a partir da figura 24 pode-se observar um perfil das gutiferas presente na própolis, relacionando parâmetros. Ocorre um aumento da concentração das gutiferas E, quando aumenta a incidência da luz solar e a temperatura e este aumento ocorre entre os meses de novembro a março, sendo assim em meses onde houve temperaturas mais amenas, diminuem a concentração desse componente, como observado anteriormente nos apiários estudados.

Figura 24- Variação na concentração de gutiferas em relação à luz solar e temperatura.



Outro parâmetro importante a ser estudando em relação às gutíferonas, seria a relação com as chuvas na região. A figura 25 mostra que quanto maior a intensidade das chuvas menor a concentração de gutíferonas, o que já é de se esperar, pois elas possuem em sua biossíntese vias mistas de metabolismo secundário (via chiquimato para fenóis, via acetato malonato para graxas e via acetato mevalonato para compostos isoprenpoides), já que as gutíferonas apresentam porções lipídicas e fenólicas em sua estrutura. Além disso, quanto maior a radiação solar, maior a concentração de gutíferonas na própolis vermelha.

Figura 25- Variação na concentração de gutíferonas em relação à radiação solar e intensidade das chuvas.



Os dados meteorológicos trazem consigo informações que proporcionam base para a relação direta da biossíntese de flavonoides com o ambiente. Quando se relaciona a proporção de chuvas e umidade, percebe-se que a quantidade de flavonoides está diretamente ligada intensidade das chuvas e a umidade relativa, dessa forma quanto maior esses dois parâmetros, maior será a concentração desse composto, como mostrado na figura 26.

A partir das figuras 26 e 27, pode-se visualizar, que a concentração de flavonoides relaciona-se de forma limiar em relação à radiação solar ($600 - 800 \text{ kJ/m}^2$) e diretamente proporcional a intensidade de chuvas, sendo assim, os meses onde ocorre maior concentração de flavonoides são os meses entre junho, julho e agosto e estes são os meses onde a concentração dos flavonoides aumentam.

Figura 26- Variação da concentração de flavonoides em relação à umidade relativa e intensidade das chuvas.

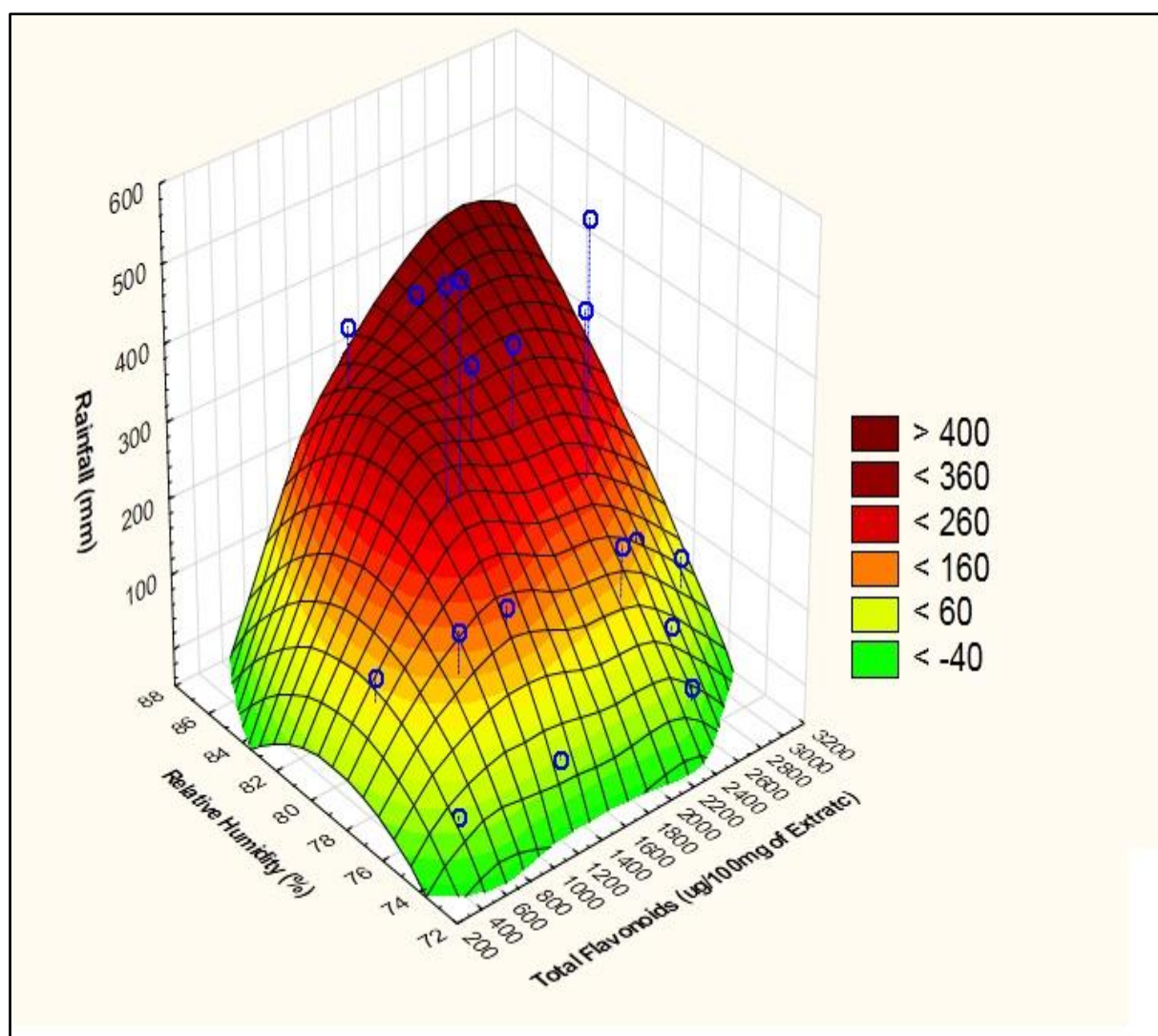
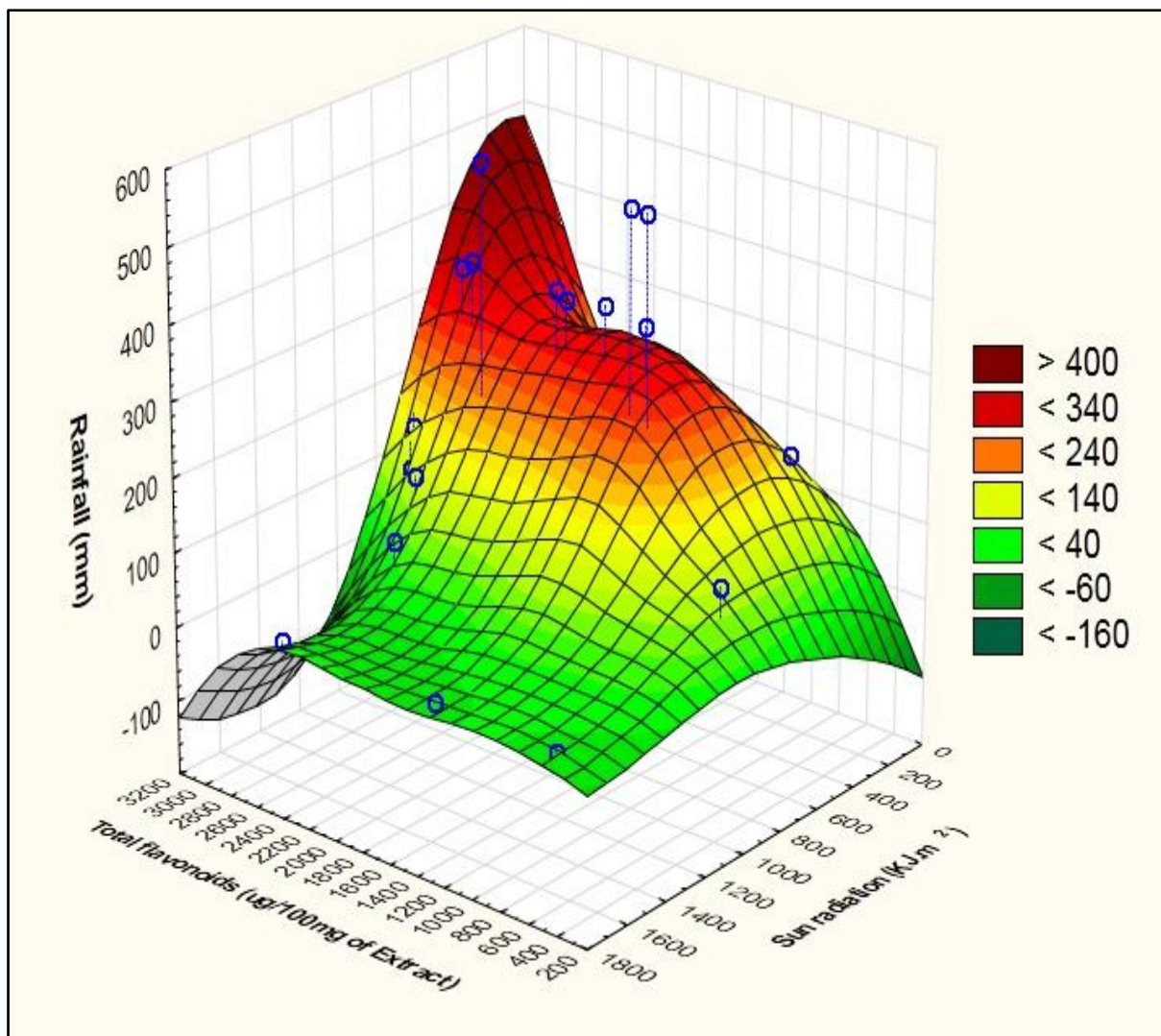


Figura 27- Variação da concentração de flavonoides em relação à radiação solar e intensidade de chuvas.



5.5.4 Estudo de correlação multivariada entre ensaios químicos e microbiológicos

A análise do componente principal (PCA) é uma técnica de reconhecimento de padrão não supervisionada, desenvolvida para extrair e visualizar as principais informações em dados multivariadas, como a formação de agrupamento entre as amostras; identificar as variáveis que possuem maior contribuição para diferenciá-las; detectar amostras anômalas, entre outras. Já a análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), baseia-se no método de regressão PLS (mínimos quadrados parciais). O método busca uma relação linear da resposta instrumental “X” (variáveis independentes), com propriedades de interesse “Y”

(variáveis dependentes). No contexto da classificação de amostras, a matriz Y representa valores qualitativos, codificada com números binários 0 ou 1 (GONÇALVES, M. I. S. 2015).

As análises PCA e PLS-DA mostraram uma correlação entre concentração de compostos fenólicos (flavonoides + gutíferonas) extraídos dos dados LC-Orbitrap-FTMS com dados de concentração inibitória mínima. Demonstrando que nos meses com queda na produção de flavonoides, ocorreu o aumento dos valores do teste de atividade microbiana dos extratos, especialmente nos apiários Ilha do Porto e Paripueira (Figuras 28 e 29).

Figura 28- Análise de PCA e análise de correlação PLS-DA para Concentração Inibitória Mínima de *Staphylococcus aureus* e concentração de flavonoides comparando própolis vermelha Ilha do Porto (A), Primavera (B) e Paripueira (C).

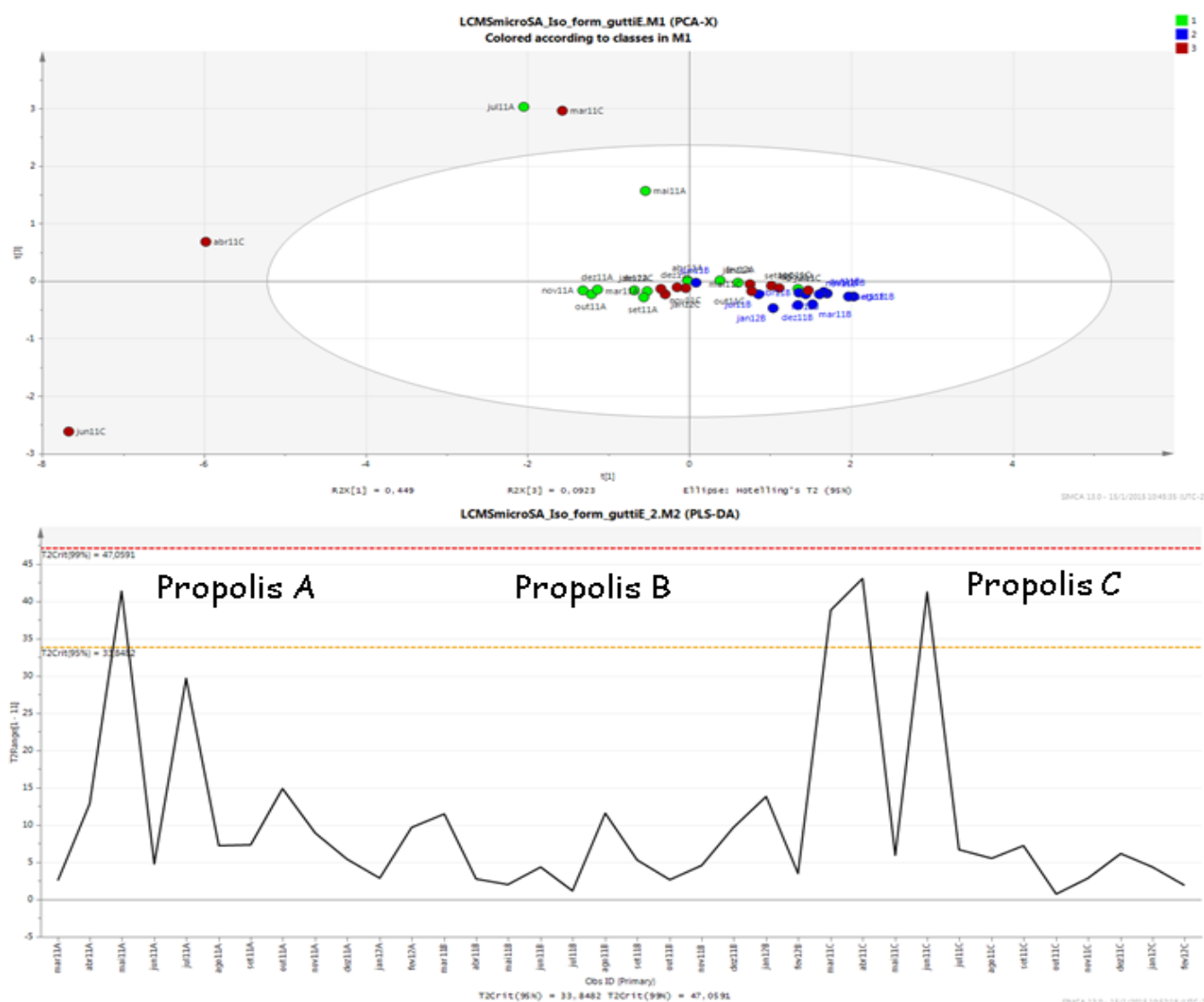
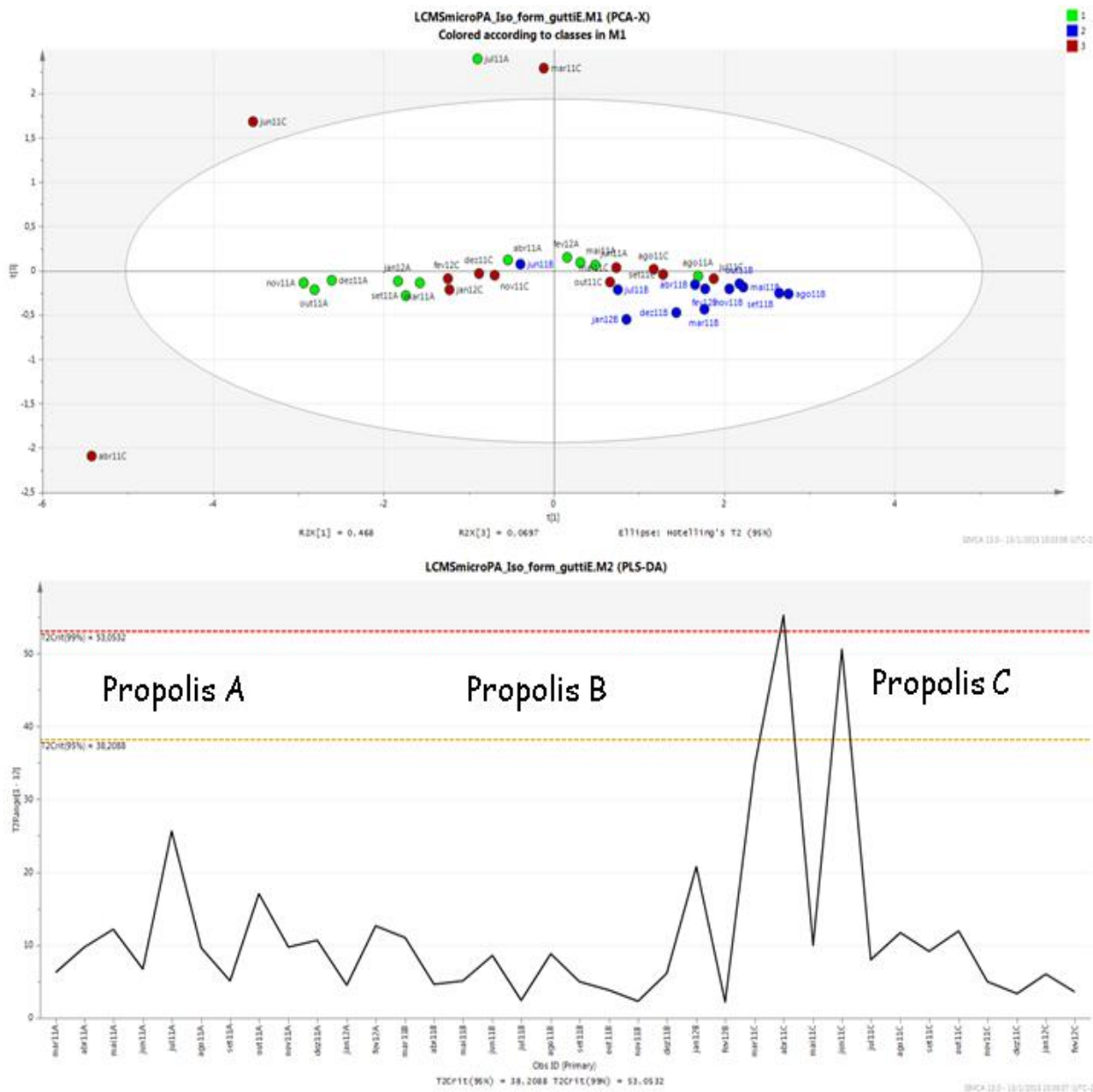


Figura 29- Análise de PCA e análise de correlação PLS-DA para Concentração Inibitória Mínima de *Pseudomonas aeruginosa* e concentração de flavonoides comparando própolis vermelha Ilha do Porto (A), Primavera (B) e Paripueira (C).



6. CONCLUSÃO

Os métodos de quantificação de fenóis totais, leitura direta UV-vis, LC-DAD-UV e LC-MS foram eficazes na caracterização do perfil químico da própolis vermelha durante estudo sazonal. A presença de flavonóides e de gutiferas na própolis vermelha de Alagoas, apresentaram variabilidade ao longo do ano, que pode ser explicada, em parte, devido às variações climáticas de intensidades de chuvas, radiação solar, umidade relativa.

A metodologia de DPPH e os ensaios de microbiologia demonstraram serem sensíveis às concentrações de compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis vermelha e demonstraram serem ferramentas importantes para monitorar a qualidade dos extratos.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa detectou e quantificou gutiferas e diversos flavonoides, ácidos fenólicos presentes na PVA, sendo importante para correlacionar concentração de gutiferas em algumas épocas do ano onde ocorrem em altas concentrações.

Correlações químico-meteorológicas e correlações químico-microbiológicas foram úteis para monitorar a qualidade dos extratos de própolis vermelha e dos apiários produtores, de forma a estabelecer novas ferramentas de certificação de apiários e produtores de matérias-primas de própolis vermelha com alto grau de rigorosidade.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam-Holanda, v. 113, n 2, p. 278-283, sep. 2007.

ALMEIDA, E. T. C. **Caracterização físico-química e microbiológica de tintura e microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas**. 2013. 143 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição)-Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 16, n.1, p. 181-189, jan. 2008.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C.; Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **Springer**, Berlin, v. 31, n. 1, p.3-15, Jan. 2000.

BISAGGIO, D. F. R.; ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. In vitro effects of suraminon Trypanosoma cruzi. **International Journal of Antimicrobial**, Amsterdam-Holanda, v. 31, n.1, p. 282-286, jan. 2008.

BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, Amsterdam-Holanda, v. 29, n. 1, p. 124-131, out. 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaftund Technologie**, Berlim-Alemanha, v. 28, n. 1, p.25-30, dec. 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York-USA, v. 56, n.11, p.317-333, mar. 1998.

BRIDI, R. International Regulations of Propolis Quality: Required Assays do not Necessarily Reflect their Polyphenolic-Related In Vitro Activities. **Journal of Food Science**, Illinois, v. 80, n. 6, p. 1188-1195, jun. 2015.

BONAMIGO, T. et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **Plos One**, California, v.12, n. 9, p. 110-119, Set. 2017.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington-DC, v. 61, n. 19, p. 45-50, mai. 2013.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, jul. 200

CASTRO, M. L; CURY, J. A; ROSALEN, P.L;Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.7, p. 1512-1516, ago. 2007.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

CUESTA-RUBIO, O. et al. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 7502-7509, nov. 2007.

DANTAS, A. P. et al. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam-Holanda, v. 103, n. 2, p.187-193, jan. 2006.

DANTAS-SILVA, R. P. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLOS One**, London, v.12, n. 3, p. 1-18, mar. 2017.

DAUGSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. **Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas/SP. 2007.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 21-25, mai. 1998.

DE MEDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **Bio Med Central**, London, v. 15, n. 357, p. 1-12, out. 2015.

DEMIR, E. et al. The Radioprotective Effects of propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Radiation-Induced Oxidative/nitrosative Stress in Brain Tissue. **Free Radical Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 100, n. 15, p. 5111-5120, ago, 2016.

FRANCHIN, M. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, n. 5, p. 49-55, jun. 2018.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n 1, p. 171-178, mar. 2002.

GRESSLER, L. T. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam-Holanda, v.93, n. 3, p. 1314-1317, dez. 2012.

GONÇALVES, M. I. et al. Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Regions within Libya. **Plos One**, London, v. 11, n. 5, p. 1-16, jun. 2015.

HIGASHI, K. O.; CASTRO, S. L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam-Holanda, v. 43, n. 2, p. 149-155, jul. 1995.

INOUE, H. T. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latino americana de Producción Animal**, Santiago-Chile, v. 15, n. 2, p. 65-69, abr. 2007.

ISLA, M. I. Effect of Seasonal Variations and Collection Form on Antioxidant Activity of Propolis from San Juan, Argentina. **Journal of medicinal food**, New York, v. 12, n. 6, p. 1334-1342, jun. 2009.

JORGE, P. K. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 107, n. 8, p. 978-984, dez. 2012.

LOPÉZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, Amsterdam-Holanda, v. 146, n. 1, p. 174-180, fev. 2014.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 447-454, set. 2008.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam,, v. 74, n. 2, p. 105-112, fev. 2001.

MARCUCCI, M.C.; Custódio, A. R.; Pereira, R. M. S. Própolis tiificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Mensagem Doce**, v.1, n. 90 , abr. 2007.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **Food Science & Technology**, Basel, v. 47, n. 1, p. 2510-2518, jun. 2012.

MIKUS, J.; STEVERDING, D. A Simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. **Parasitology International**, Amsterdam-Holanda, v. 48, n. 1, p. 265-269, jan. 2000.

MUNSHI, S.; TWINING, R. C.; DAHL, R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, Amsterdam-Holanda, v. 70, n. 2, p. 195-198, out. 2014.

NASCIMENTO, E. A. et al. Atividade antioxidante de própolis verde, marrom e avermelhada de regiões que contêm alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Mensagem doce**. Nº 92, 2007, disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/92/artigo2.htm>, acessada em Janeiro de 2018.

NAZZARO, F; FRATIANNI, F; COPPOLA, R. Quorum Sensing and Phytochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 6, p. 12607-126019, Jun. 2013.

NETTO, C. A. et al. Effects of typified propolis on mutants streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. **Brazilian Dental Science**, São José dos Campos, v. 16, n. 2, p. 31-36, abr. 2013.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, San Francisco, v. 178, n. 20, p. 5853-5857, out. 1996.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmognosia**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 524-529, jun. 2009.

NUNES, L. C. C. et al, Advanced Studies in Biology. **International Publishers of Science**, Sofia-Bulgaria, v. 5, n. 3, p. 119 – 133, jun. 2013.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, abr. 2009.

OMAR, R. M. K. et al. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochemical Analysis**, London, v. 27, n. 2, p. 107-115, mar. 2016.

OSÉS, S. M. et al. Bioactive properties of honey with própolis. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 1215-1123, out. 2016.

PARK, Y. K. ; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Mensagem Doce**, v. 58, n.1, p. 2-7, mar. 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, São Paulo, v. 50, n 9, p. 2502-2506, mar. 2002.

PARK, Y. K. et al. Própolis e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, Nº 89, Nov. 2006, disponível em: www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm, acessada em outubro de 2018.

PATI, P. P. et al. Melarsoprol Sensitivity Profile of *Trypanosoma brucei gambiense* Isolates from Cured and Relapsed Sleeping Sickness Patients from the Democratic Republic of the Congo. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, California-USA, v. 8, n. 10, p. 1-13, out. 2014.

PEREIRA, A. S. et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, N. 2, p. 321-326, 2002.

PICCINELLI, A. L. et al. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 23, p. 9010- 9016, jul. 2005.

PINHEIRO, K. S. et al. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 111-117, fev. 2014.

PRADO, M. A. **Desenvolvimento e comparação de técnicas analíticas, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar na determinação de corantes artificiais**. 2003. 130f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade de Campinas, 2003

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

RAHMANI, R. et al. 6-Arylpyrazine-2-carboxamides: A New Core for *Trypanosoma brucei* Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington DC, v. 58, n. 1, p. 6753-6765, aug. 2015.

REGUEIRA, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 572-580, mar. 2017.

RIGHI, A. A. Comparative Chemistry of **Propolis** from Eight Brazilian Localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2, n. 3, p. 50-64, mar. 2013.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químicos de própolis**. 1996. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 1996.

RISTIVOJEVIC, P. Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. **Plos One**, London, v. 11, n. 6, set. 2016.

ROBAYS, J. et al. Eflornithine is a cost-effective alternative to melarsoprol for the treatment of second-stage human West African trypanosomiasis in Caxito, Angola. **Tropical Medicine and International Health**, London, v. 13, n. 2, p. 265-271, feb. 2008.

RUFFATO, L. C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Amsterdam, v. 7, n. 7, p. 591-598, jun. 2017.

SENA-LOPEZ, A. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLoS ONE**, London, v. 13, n. 2, p. 1-16, jan. 2018.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 243-249, fev. 2000.

SILVA, R. A. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1842-1848, dez. 2006.

SILVA, M. A. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 319-324, abr. 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.

SOARES, S. D. Ácidos Fenólicos Como Antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n 1, p. 71-81, abr. 2002.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jul. 2007

SOUZA-MACHADO, B. A. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, London, v. 11, n. 1, p. 1-26, jan. 2016.

TEIXEIRA, E. W. et al. Seasonal Variation, Chemical composition and antioxidant of brazilian propolis samples. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 7, n. 3, p. 307-315, jul. 2010.

TIWARI, M. K. Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource technology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 636-646, nov. 2012.

TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4378-4382, jun. 2006.

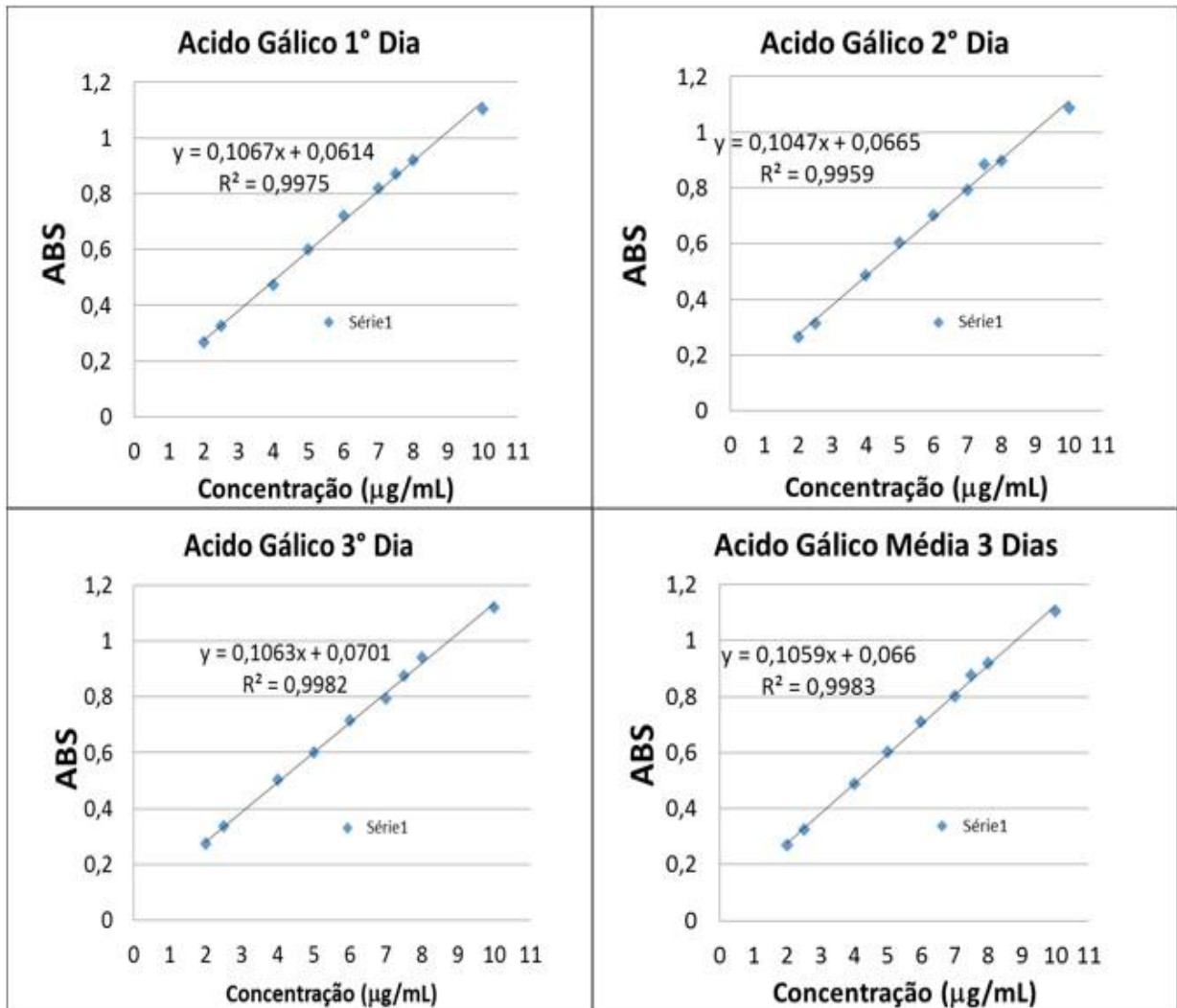
TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 3, n. 2, p.249-254, out. 2006.

VALENCIA, D. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 131, v. 2, p. 645-651, mar. 2012.

ZHANG, C. et al. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1602-1607, abr. 2017.

ANEXOS

Anexo 1- Curva de calibração do ácido gálico em triplicata e a média



Anexo 2- Valores de Absorbância do padrão ácido gálico nos 3 diferentes dias para o método Folin –Ciocalteu.

Absorbância (A)						
Concentração (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	DP	%CV
2,0	0,245	0,266	0,275	0,269	0,0052	1,93
2,5	0,313	0,314	0,336	0,325	0,0110	3,39
4,0	0,482	0,488	0,504	0,488	0,0155	3,17
5,0	0,571	0,605	0,6	0,602	0,0025	0,42
6,0	0,666	0,702	0,714	0,712	0,0092	1,29
7,0	0,774	0,793	0,795	0,802	0,0145	1,80
7,5	0,807	0,866	0,874	0,877	0,0072	0,82
8,0	0,845	0,899	0,941	0,919	0,0210	2,28
10,0	1,046	1,087	1,222	1,104	0,0175	1,59

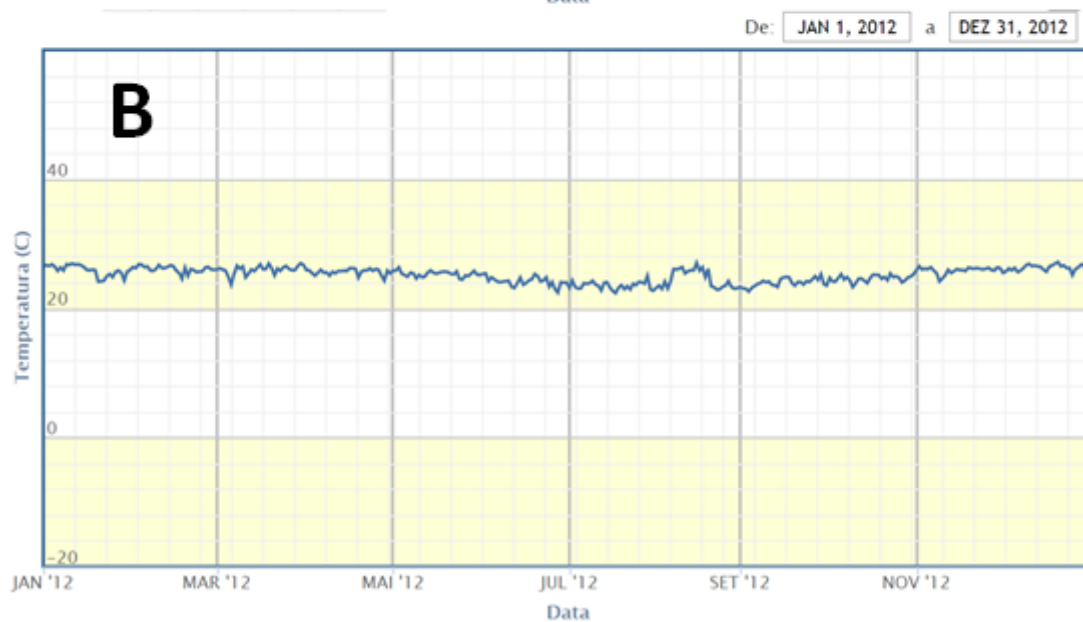
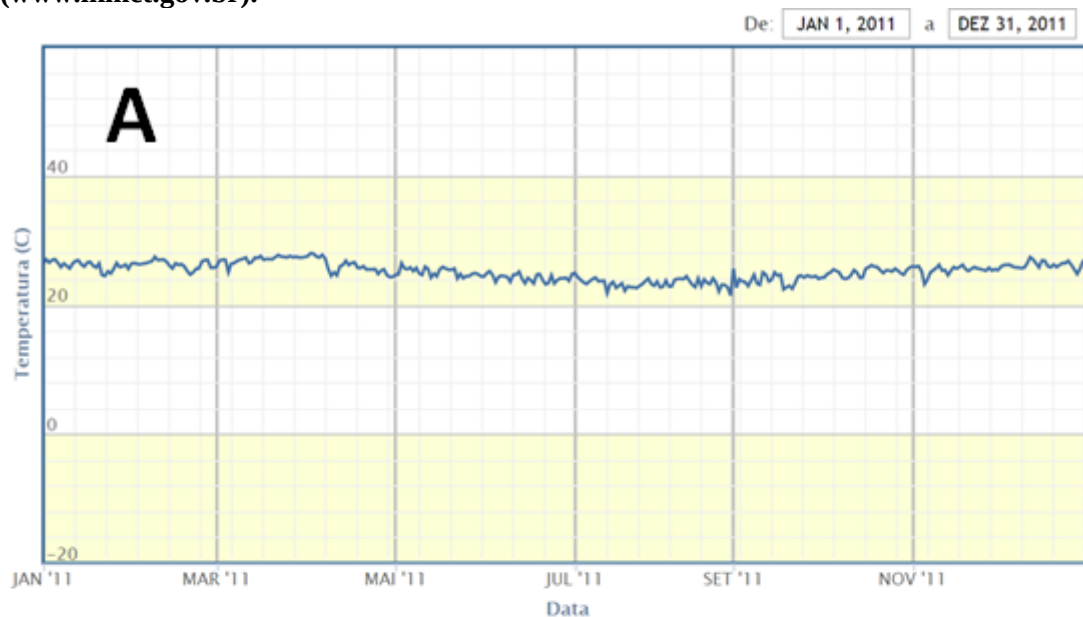
Anexo 3- Determinação da precisão inter-dia do padrão ácido gálico para o método Folin-Ciocalteu.

Concentração experimental (µg/mL)						
Concentração teórica(µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	DP	%CV
2,0	1,71	1,91	2,00	1,94	0,0504	2,59
2,5	2,37	2,38	2,59	2,49	0,1067	4,29
4,0	4,01	4,06	4,22	4,07	0,1502	3,69
5,0	4,87	5,20	5,15	5,17	0,0244	0,47
6,0	5,79	6,14	6,25	6,23	0,0888	1,42
7,0	6,84	7,02	7,04	7,11	0,1402	1,97
7,5	7,16	7,92	7,80	7,84	0,0701	0,89
8,0	7,52	8,05	8,45	8,25	0,2036	2,47
10,0	9,47	9,87	10,21	10,03	0,1698	1,69

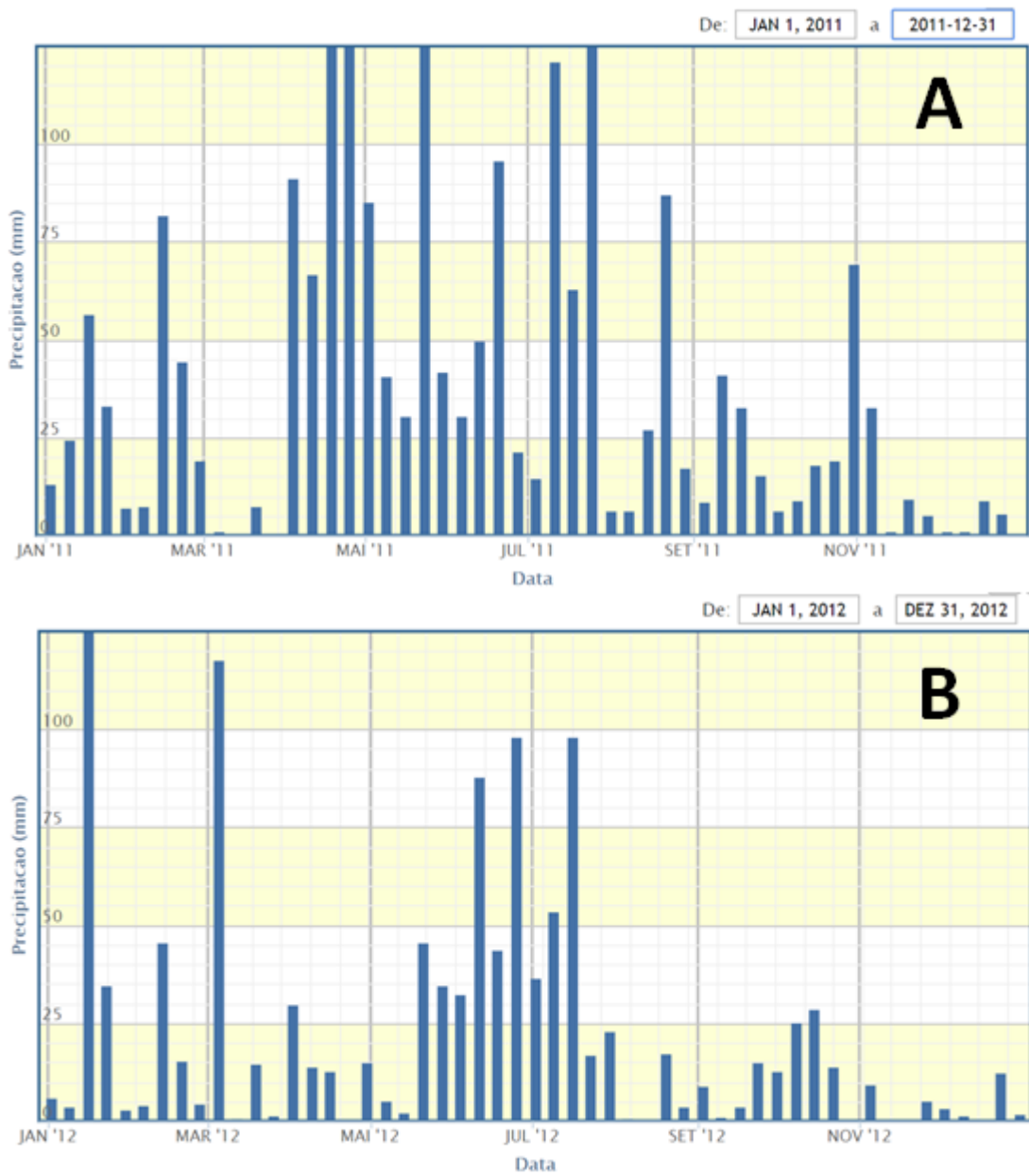
Anexo 4- Determinação da exatidão do padrão ácido gálico para o método Folin-Ciocalteu.

Concentração teórica(µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)							
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	% Bias 1	% Bias 2	% Bias 3	%Bias Mé
2,0	1,71	1,91	2,00	1,94	-14,53	-4,36	0,00	-2,91
2,5	2,37	2,38	2,59	2,49	-5,27	-4,88	3,64	-0,49
4,0	4,01	4,06	4,22	4,07	0,15	1,60	5,47	1,68
5,0	4,87	5,20	5,15	5,17	-2,64	3,95	2,98	3,44
6,0	5,79	6,14	6,25	6,23	-3,52	2,29	4,23	3,91
7,0	6,84	7,02	7,04	7,11	-2,35	0,28	0,55	1,57
7,5	7,16	7,92	7,80	7,84	-4,60	5,61	4,06	4,53
8,0	7,52	8,05	8,45	8,25	-5,96	0,58	5,67	3,08
10,0	9,47	9,87	10,21	10,03	-5,29	-1,32	2,07	0,33

Anexo 5- Dados meteorológicos de temperatura média para os meses do ano de 2011 (A) e para os meses do ano de 2012 (B). Dados extraídos do Instituto Nacional de Meteorologia / INMET, (www.inmet.gov.br).



Anexo 6- Dados meteorológicos de precipitação de chuvas para os meses do ano de 2011 (A) e para os meses do ano de 2012 (B). Dados extraídos do Instituto Nacional de Meteorologia / INMET, (www.inmet.gov.br).



Anexo 7- Dados meteorológicos de radiação solar para os meses do ano de 2011 (A) e para os meses do ano de 2012 (B). Dados extraídos do Instituto Nacional de Meteorologia / INMET, (www.inmet.gov.br).

