

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EMANOEL GUILHERMINO DA SILVA JUNIOR

**VARIAÇÃO SAZONAL DA PRÓPOLIS MARROM-ESVERDEADA DE UNIÃO DOS
PALMARES DURANTE 2020–2021: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

MACEIÓ-AL

2024

EMANOEL GUILHERMINO DA SILVA JUNIOR

**VARIAÇÃO SAZONAL DA PRÓPOLIS MARROM-ESVERDEADA DE UNIÃO DOS
PALMARES DURANTE 2020–2021: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

MACEIÓ-AL

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586v Silva Junior, Emanuel Guilhermino da.
Variação sazonal da própolis marrom-esverdeada de União dos Palmares durante 2020-2021 : composição química e atividades antioxidante e antimicrobiana / Emanuel Guilhermino da Silva Junior. – 2024.
122 f. : il. color.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 88-103.
Anexos: f. 104-122.

1. Própolis marrom. 2. Composição química. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDU: 615: 638.135

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Ser enquanto Ser, a absoluta perfeição, por ter sido a causa primeira e eficiente de uma obra como o universo, tão complexamente ordenada. Não apenas criou os entes materiais, mas também a nossa consciência e vontade, a fim de que fôssemos capazes de investigar a natureza, especular sobre ela, para enfim alcançar o nosso objetivo último: o sumo bem.

Agradeço à minha família queridíssima: ao meu pai, Emanuel Guilhermino, à minha mãe, Madalena Maria, e ao meu irmão, Marcus Vinicius. Não existe outro motivo senão eles para perseverar em todos os meus propósitos. Serão sempre meu apoio, meus amigos verdadeiros, meus exemplos de caráter e virtude, meus amores eternos.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, nunca vi professor igual a ele. Ele supera todos os seus pares em conhecimento, e generosidade, e bondade, e determinação, e magnanimidade. Se há qualquer trabalho acadêmico que fiz, se há neles qualidade, é porque o professor me ofereceu todas as oportunidades no laboratório, dispondo-se a orientar-me. Professor, todos os méritos deste trabalho são seus!

Agradeço, por fim, a todos meus colegas de laboratório, que têm sido muito solícitos e cordiais para comigo. O conhecimento e os dons de cada um, em sua própria área de atuação, conservam a vida do laboratório, mantendo seu ambiente agradável e produtivo, o que resulta em trabalhos sempre relevantes e excelentes.

***“Existes, pois, ó Senhor, Deus meu!
[...] Tudo, menos tu, pode ser
suposto pelo pensamento como não
existindo. A ti só, entre todos,
pertence a qualidade de existir
verdadeiramente, e no mais alto
grau.”***

— Santo Anselmo de Cantuária

RESUMO

A própolis é um produto natural que possui atividades anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, imunoestimulante e anticâncer. O objetivo desta dissertação foi avaliar a variação sazonal de marcadores químicos, de metabólitos totais e das atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de extratos da própolis marrom-esverdeada do município alagoano de União dos Palmares (PMUP). Uma amostra de PMUP *in natura* foi obtida, por mês, de setembro de 2020 a agosto de 2021. As amostras foram extraídas por maceração com 2 x 50 mL de etanol 92,8% para 15 g de própolis bruta. As seguintes análises foram realizadas com os 12 extratos: investigação dos marcadores químicos em CLAE-DAD; quantificação nos ensaios de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), e flavanonas e dihidroflavonóis (FD); estimativa da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH•; atividade antimicrobiana por meio do teste de microdiluição em caldo, no qual se utilizou o revelador MTT; e o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, para elucidar a força de correlação entre os teores de CFT, FT e os resultados dos ensaios antioxidante e microbiológico. A CLAE-DAD mostrou que os marcadores da PMUP foram semelhantes aos de outras própolis verdes, incluindo a própolis verde brasileira. A pinocembrina foi o composto bioativo de maior concentração, com média de $74,49 \pm 32,47$ mg/g. Outros biomarcadores com alto teor foram pinobanksin, artepillin-C, crisina, pinostrobin e galangina. Os 12 extratos apresentaram altos teores de CFT, FT, e FD, demonstrando concentrações médias de $81,1 \pm 26,05$ mg EAG/g, $38,45 \pm 10,10$ mg EQ/g e $1,59 \pm 0,24$ mg EP/20 mg, respectivamente. A CI_{50} média verificada pelo ensaio DPPH foi de $47,72 \pm 13,02$ µg/mL, caracterizando boa atividade antioxidante. O teste de microdiluição em caldo com MTT, realizado para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 90028), mostrou que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis que a Gram-negativa. Os extratos de PMUP tiveram as CIMs mais baixas em janeiro de 2021 e abril de 2021, meses em que ocorreu o maior teor de FT e de biomarcadores em todo o estudo. Houve correlações entre as quantificações de CFT e FT e as CIMs e CI_{50} . Quase todos os resultados permitiram definir períodos de melhor qualidade da PMUP: o primeiro, de outubro de 2020 a janeiro de 2021, o segundo, de abril a julho de 2021. Esta é a primeira pesquisa de sazonalidade do novo tipo de própolis marrom-esverdeada.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis. Compostos Fenólicos. Capacidade de Absorbância de Radicais de Oxigênio. Produtos com Ação Antimicrobiana. HPLC.

ABSTRACT

Propolis is a natural product that exhibits anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial, antioxidant, immunostimulant, and anticancer activities. The aim of this dissertation was to evaluate the seasonal variation of chemical markers, total metabolites, and the *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of greenish-brown propolis extracts from the municipality of União dos Palmares (PMUP), Alagoas. A sample of PMUP *in natura* was obtained monthly from September 2020 to August 2021. The samples were extracted by maceration with 2 x 50 mL of 92.8% ethanol for 15 g of raw propolis. The following analyses were conducted on the 12 extracts: investigation of chemical markers by HPLC-DAD; quantification in assays of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and flavanones and dihydroflavonols content (FDC); estimation of antioxidant activity by the DPPH• assay; antimicrobial activity through broth microdilution test using MTT as an indicator; and calculation of the Pearson correlation coefficient to elucidate the correlation strength between TPC, TFC, and the results of antioxidant and microbiological assays. HPLC-DAD revealed that the markers of PMUP were similar to those of other green propolis, including Brazilian green propolis. Pinocembrin was the most concentrated bioactive compound, with an average of 74.49 ± 32.47 mg/g. Other biomarkers with high content included pinobanksin, artepillin-C, chrysin, pinostrobin, and galangin. The 12 extracts showed high levels of TPC, TFC, and FDC, demonstrating average concentrations of 81.1 ± 26.05 mg GAE/g, 38.45 ± 10.10 mg QE/g, and 1.59 ± 0.24 mg PE/20 mg, respectively. The average IC₅₀ verified by the DPPH assay was 47.72 ± 13.02 µg/mL, indicating good antioxidant activity. The broth microdilution test with MTT, conducted for *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Candida albicans* (ATCC 90028) showed that Gram-positive bacteria were more sensitive than Gram-negative. PMUP extracts had the lowest MICs in January 2021 and April 2021, months with the highest TFC and biomarkers throughout the study. Correlations were observed between TPC and TFC quantifications and MICs and IC₅₀. Nearly all results allowed the definition of periods of better quality of PMUP: the first, from October 2020 to January 2021, the second, from April to July 2021. This is the first study on the seasonality of the new type of greenish-brown propolis.

KEY-WORDS: Propolis. Phenolic Compounds. Oxygen Radical Absorbance Capacity. Products with Antimicrobial Action. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Papiro em que são exibidas atividades de apicultura no Egito Antigo.....	20
Figura 2 – Abelhas preenchendo buracos com própolis.....	21
Figura 3 – Espécime de <i>A. mellifera</i> coletando a resina de <i>B. dracunculifolia</i> BC.....	22
Figura 4 – Abelha retirando resina recém-coletada das patas traseiras de outro espécime.....	23
Figura 5 (A-F) – Exemplos de colorações com que se pode encontrar a própolis. (A) Vermelha. (B) Marrom-avermelhada. (C) Marrom. (D) Marrom-escura. (E) Marrom. (F) Marrom-esverdeada.....	24
Figura 6 – Quantidade relativa de substâncias que compõem a própolis.....	26
Figura 7 – Esquema das condições ambientais que alteram o teor de metabólitos secundários de plantas.....	37
Figura 8 – Amostra ainda não processada de PMUP, coletada em agosto de 2021....	44
Figura 9 (A-C) – Obtenção de EBs a partir do EHE. (A) EHE revelando o precipitado de ceras ao fundo do frasco. (B) Evaporação rotativa do EHE. (C) EB antes de ser armazenado.....	46
Figura 10 – Curva de calibração do ácido gálico no ensaio de CFT.....	49
Figura 11 – Tubos de ensaio no ensaio de CFT, após duas horas.....	50
Figura 12 – Curva de calibração da quercetina no ensaio com AlCl_3	52
Figura 13 – Tubos após 30 minutos, no ensaio com AlCl_3	53

Figura 14 (A-B) – Mistura reacional escurecida após a adição de KOH. (A) Mistura reacional após a adição de KOH. (B) Mistura reacional após centrifugação, com precipitado ao fundo do tubo.....	54
Figura 15 – Curva da pinocembrina no ensaio com DNP.....	55
Figura 16 – Equação da %CEE.....	56
Figura 17 – Variação nas colorações dos EHEs de setembro de 2020 a julho de 2021, da esquerda para a direita.....	61
Figura 18 (A-I) – Quantificação de marcadores químicos da PMUP, por CLAE-DAD, de setembro de 2020 a agosto de 2021. (A) Concentrações da artemisinina. (B) Concentrações dos ácidos ferúlico e cafeico. (C) Concentrações da pinocembrina. (D) Concentrações da quercetina e do kaempferol (E) Concentrações da pinobanksina e pinostrobin. (F) Concentrações da naringenina. (G) Concentrações da galangina e crisina. (H) Concentrações da rutina. (I) Concentrações do ácido p-cumárico.....	62
Figura 19 – Concentração percentual de compostos fenólicos totais nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.....	70
Figura 20 – Concentração percentual de flavonoides totais nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.....	72
Figura 21 – Concentração de flavanonas e dihidroflavonóis nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.....	75
Figura 22 – CI_{50} dos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de própolis brasileira classificados, com coloração e origem botânica correspondentes.....	25
Tabela 2 – Bactérias Gram-positivas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.....	31
Tabela 3 – Bactérias Gram-negativas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.....	32
Tabela 4 – Concentração mínima permitida de metabólitos totais para as própolis do Álamo e Alecrim, segundo a Comissão Internacional do Mel.....	40
Tabela 5 – Apiários de origem das amostras, sua massa e a época do ano em que foram coletadas.....	45
Tabela 6 – Concentração média dos compostos quantificados por CLAE-DAD, em EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.....	48
Tabela 7 – CIMs dos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021, no ensaio de microdiluição em caldo.....	80
Tabela 8 – Valores de r para ensaios químicos e microbiológicos deste estudo ($p \leq 0,01$).....	85

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Comprovante de cadastro de acesso ao SisGen.....	104
Anexo 2 – Cromatograma da mistura 1 de padrões analíticos (leitura em 291 nm, concentração de 60 µg/mL).....	106
Anexo 3 (A-J) – Curva de calibração, em CLAE-DAD, dos padrões analíticos da mistura 1. (A) Curva de calibração da catequina. (B) Curva de calibração do ácido cafeico. (C) Curva de calibração do ácido ferúlico. (D) Curva de calibração do ácido 2-cumárico. (E) Curva de calibração da naringenina. (F) Curva de calibração da pinobanksin. (G) Curva de calibração do kaempferol. (H) Curva de calibração da pinocembrina. (I) Curva de calibração da galangina. (J) Curva de calibração da pinostrobina.....	107
Anexo 4 – Cromatograma da mistura 2 de padrões analíticos (leitura em 277 nm, concentração de 60 µg/mL).....	111
Anexo 5 (A-I) – Curva de calibração, em CLAE-DAD, dos padrões analíticos da mistura 2. (A) Curva de calibração do ácido p-cumárico. (B) Curva de calibração da rutina. (C) Curva de calibração do resveratrol. (D) Curva de calibração da cumarina. (E) Curva de calibração da liquiritigenina. (F) Curva de calibração da quercetina. (G) Curva de calibração da luteolina. (H) Curva de calibração da crisina. (I) Curva de calibração da pinostrobina.....	112
Anexo 6 (A-B) – Resultados observados em CLAE-DAD para a artemillin-C. (A) Cromatograma da artemillin-C, no λ de 315 nm, na concentração de 75 µg/mL. (B) Espectro de absorção UV da artemillin-C em CLAE-DAD.....	115
Anexo 7 – Curva de calibração, em CLAE-DAD, do padrão analítico de artemillin-C.....	116

Anexo 8 (A-L) – Cromatograma dos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021, aferidos no λ de 313 nm. (A) Setembro de 2020 (B) Outubro de 2020. (C) Novembro de 2020. (D) Dezembro de 2020. (E) Janeiro de 2021. (F) Fevereiro de 2021. (G) Março de 2021. (H) Abril de 2021. (I) Maio de 2021. (J) Junho de 2021. (K) Julho de 2021. (L) Agosto de 2021.....	117
--	-----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(8-OH-dG) 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

(%CEE) Capacidade de eliminação experimental

(λ) Comprimento de onda

($\lambda_{\text{máx}}$) Comprimento de onda de máxima absorção

(AAPH) 2,2'-azobis(2-amidinopropano)

(ABTS•) 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

(AlCl₃) Cloreto de alumínio

(AMH) Ágar Mueller-Hinton

(As) Arsênio

(ICC) Infusão de cérebro e coração

(C₇H₆O₅) Ácido gálico

(C₁₅H₁₀O₇) Quercetina

(C₁₅H₁₂O₄) Pinocembrina

(CAT) Capacidade antioxidante total

(CCD) Cromatografia em camada delgada

(Cd) Cádmio

(CFT) Compostos fenólicos totais

(CG-EM) Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

(CH) Compostos hidrossolúveis

(CI₅₀) Concentração inibitória de 50%

(CIM) Concentração inibitória mínima

(CLAE-DAD) cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de redes de diodos

(CMH) Caldo Mueller-Hinton

(DMT2) *Diabetes mellitus* tipo 2

(DNP) 2,4-dinitrofenilhidrazina

(DPPH•) 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

(EAG) Equivalentes de ácido gálico

(EB) Extrato bruto

(EE) Extrato etanólico

(EH) Extrato hidroetanólico

(EHE) Extrato hidroetanólico de PMUP

(EHPC) Extrato hidroetanólico do período chuvoso

(EHPS) Extrato hidroetanólico do período seco

(EP) Equivalentes de pinocembrina

(EQ) Equivalentes de quercetina

(EROs) Espécies reativas de oxigênio

(FD) Flavanonas e dihidroflavonóis

(FRAP) Poder antioxidante redutor férrico

(FT) Flavonoides totais

(GSH-px) Glutathione peroxidase

(IL) Interleucina

(KOH) Hidróxido de potássio

(LAFA) Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias

(MAPK) Proteína quinase ativada por mitógeno

(MTT) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico

(Na₂CO₃) Carbonato de sódio

(ON) Óxido nítrico

(Pb) Chumbo

(PMUP) Própolis marrom-esverdeada do município alagoano de União dos Palmares

(PVA) Própolis vermelha de Alagoas

(PVB) Própolis verde brasileira

(*r*) Coeficiente de correlação de Pearson

(SisGen) Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

(SOD) Superóxido dismutase

(TGF) Fator de crescimento transformador

(TNF- α) Fator de necrose tumoral alfa

(tR) Tempo de retenção

(U937) Células de linfoma histiocítico humano

(UV-Vis) Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Própolis.....	20
2.1.1 Composição.....	25
2.1.2 Bioatividade.....	29
2.1.2.1 Atividade antimicrobiana.....	29
2.1.2.2 Atividade antioxidante.....	33
2.1.3 Sazonalidade.....	37
2.1.4 Controle de qualidade.....	39
3. OBJETIVO GERAL.....	43
3.1 Objetivos específicos.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Coleta de amostras.....	44
4.2 Obtenção de extratos.....	45
4.3 Ensaios químicos.....	46
4.3.1 Reagentes.....	46
4.3.2 Quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD.....	47
4.3.2.1 Curvas de calibração.....	47
4.3.2.2 Análise dos EHEs por CLAE-DAD.....	48
4.3.3 Teor de compostos fenólicos totais.....	48
4.3.3.1 Curva de calibração do ácido gálico.....	48
4.3.3.2 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais nos EHEs...49	
4.3.4 Teor de flavonoides totais.....	51
4.3.4.1 Curva de calibração da quercetina.....	51
4.3.4.2 Avaliação do teor de flavonoides totais nos EHEs.....	52
4.3.5 Teor de flavanonas e dihidroflavonóis.....	53
4.3.5.1 Curva de calibração da pinocembrina.....	53
4.3.5.2 Teor de flavanonas e dihidroflavonóis nos EHEs.....	55
4.3.6 Capacidade de sequestro de radicais DPPH•.....	56
4.3.6.1 Determinação da capacidade de eliminação experimental (%CEE).....	56

4.3.6.2	Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI ₅₀).....	56
4.4	Ensaio microbiológico.....	57
4.4.1	Preparo dos inóculos bacterianos.....	57
4.4.2	Preparo do inóculo fúngico.....	57
4.4.3	Preparo dos meios de cultura.....	58
4.4.4	Determinação da concentração inibitória mínima.....	58
4.5	Coeficiente de correlação de Pearson (<i>r</i>).....	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Aspecto visual dos extratos.....	61
5.2	Ensaio químicos.....	62
5.2.1	Quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD.....	62
5.2.2	Teor de compostos fenólicos totais.....	70
5.2.3	Teor de flavonoides totais.....	72
5.2.4	Teor de flavanonas e dihidroflavonóis.....	74
5.2.5	Capacidade de sequestro de radicais DPPH•.....	77
5.3	Ensaio microbiológico.....	79
5.4	Coeficiente de correlação de Pearson (<i>r</i>).....	85
6.	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXOS.....	104

1. INTRODUÇÃO

A própolis, também chamada “cola de abelha” (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018), é uma substância natural pegajosa (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018), viscosa (IRIGOITI et al., 2021), com odor característico (SFORCIN, 2016), acumulada por abelhas melíferas após a mistura de sua cera e enzimas salivares com pólen e resina de plantas (MOJ; SOPONAR; SÂRBU, 2010; SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). As resinas podem ser obtidas de diferentes partes vegetais, como o exsudato de flores, folhas e brotos (SIMONE-FINSTROM et al., 2017).

A própolis possui atividades anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana (SFORCIN; BANKOVA; KUROPATNICKI, 2017), antiparasitária (SAEED, 2016), adstringente, fitoinibitória, fitotóxica (GHISALBERTI, 1979), antioxidante, imunostimulante, hepatoprotetora, citotóxica (SFORCIN; BANKOVA, 2011), anticâncer, mitigadora dos efeitos adversos de quimioterapias e radioterapias (FORMA; BRYŚ, 2021), antialérgica, antifúngica (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019), antiprotozoária (ANDRADE-FERREIRA et al., 2007), analgésica (PAULINO et al., 2006) e antinociceptiva (CAVENDISH et al., 2015). Os mecanismos de ação desencadeadores desses efeitos estão em constante descoberta (GECKIL et al., 2005). Quanto aos efeitos adversos e à toxicidade, são mínimos (DEMIR et al., 2016).

A maioria das espécies vegetais tem o perfil químico modificado como resultado de um sinergismo de fatores ambientais (YANG et al., 2018). A própolis varia semelhantemente, na sua composição, não somente por ser um produto derivado de plantas, como também por mudanças na preferência das abelhas por certas fontes vegetais e regiões geográficas (IRIGOITI et al., 2021; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019; BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021). A concentração percentual dos componentes do opoterápico muda inclusive em função da espécie de abelha (SILICI; KUTLUCA, 2005).

As variações de composição são limitadas pelo comportamento da *Apis mellifera* ao selecionar determinadas fontes vegetais para a coleta (DUKE et al., 2017; LEV-YADUN, 2019). Assim, o perfil químico das plantas próximas à colmeia determina a composição da própolis (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010), gerando diferentes padrões de coloração, origem botânica e composição (PARK; ALENCAR; AGUIAR,

2002). Diante disso, autores criaram categorias para o apicêutico (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). A classificação brasileira, devido à vasta dimensão e biodiversidade do país (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002), definiu trezes grupos, oito referentes a própolis de coloração marrom (MENDONÇA, 2011).

No Brasil, os tipos de própolis marrom diferem significativamente em constituição química (TAZAWA et al., 2016), o que acontece por serem resultado de diversas origens botânicas (RIBEIRO et al., 2023). Por essa razão, recomenda-se que haja um maior número de pesquisas com a própolis marrom brasileira, de forma que sejam disponibilizados, no mercado nacional, produtos seguros e eficazes (RIBEIRO et al., 2023).

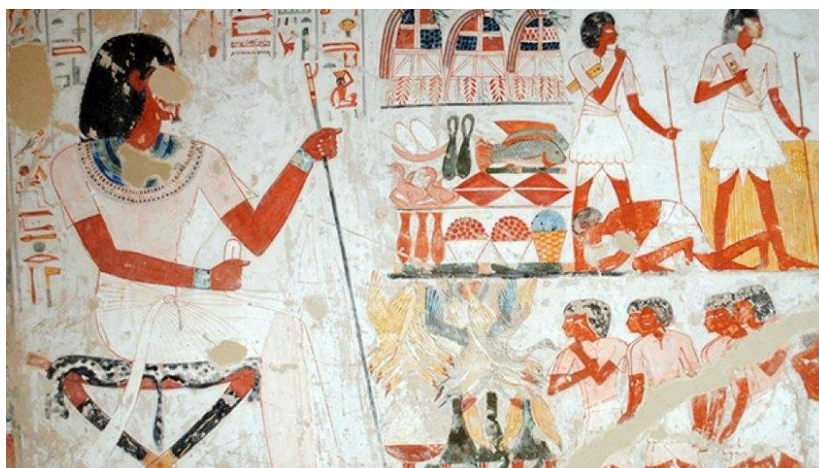
Por ser um tipo de própolis recentemente descoberto pelo nosso grupo de pesquisa, cujas características o tornam candidato a selo de indicação geográfica do tipo denominação de origem (NASCIMENTO, 2023), esta dissertação tem como objeto de estudo a própolis marrom-esverdeada do município alagoano de União dos Palmares (PMUP). Na literatura estão disponíveis apenas três publicações concernentes a ela (NOVA et al., 2022; NASCIMENTO, 2023; SILVA, 2023); portanto, todas as referências aqui utilizadas tratam de amostras com origens diferentes, ora especificadas, ora desconsideradas pelos autores. Tais publicações caracterizam a própolis de forma geral, possibilitando comparações, mas não refletem necessariamente as propriedades da PMUP. A escassez de estudos, por outra perspectiva, revela o ineditismo deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Própolis

Desde muito tempo, são conhecidas as suas propriedades terapêuticas (CASTALDO; CAPASSO, 2002), um dos registros mais antigos do seu uso data de 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979). Médicos da Roma e Grécia antigas, por exemplo, a empregaram como agente cicatrizante e antisséptico (CASTALDO; CAPASSO, 2002); os egípcios, por sua vez, aproveitaram tanto a característica “plástica” quanto a atividade antimicrobiana para embalsamar mortos, na conservação de múmias (LIN et al., 2007). Alguns povos antigos relataram as propriedades curativas da própolis, o seu efeito protetor em lesões da pele, incluindo atividade anti-inflamatória em feridas e úlceras (GHISALBERTI, 1979).

Figura 1 – Papiro em que são exibidas atividades de apicultura no Egito Antigo.



Fonte: EROĞLU; YÜKSEL (2020).

No passado houve discussões acerca da verdadeira origem e composição da própolis, pois era incerto se as abelhas a produziam diretamente ou a obtinham de plantas. Contudo, com o desenvolvimento relativamente recente de técnicas analíticas a ciência foi enfim apta a resolver tal impasse (KĘDZIA, 2008). Embora relatos históricos sugerissem a sua origem vegetal, dúvidas permanecerem até o início dos anos 1900, quando foram realizadas as primeiras análises químicas e farmacológicas do apicêutico. As primeiras tentativas de elucidar a sua constituição química pretendiam analisar o extrato etanólico, denominado “fração de resina”, que era

particionado, descartando-se ceras e compostos insolúveis em álcool (GHISALBERTI, 1979).

A palavra “própolis”, etimologicamente, encontra origem na língua grega, em que o prefixo “pro” significa “em defesa de”, enquanto “polis” quer dizer “cidade”. Portanto, “própolis” encerra o sentido de “defesa da cidade”, “defesa da colmeia”, o que remete ao principal uso que as abelhas fazem do opoterápico (SALATINO et al., 2005). De maneira resumida, a sua função é evitar o colapso da colmeia (KĘDZIA, 2008), efeito alcançado por meio do revestimento das paredes internas com uma camada delgada de própolis (GHISALBERTI, 1979), que as suaviza (SALATINO et al., 2005); da prevenção de infecções (SALATINO et al., 2005); da reparação de favos; do preenchimento de buracos (Figura 2); e da adaptação da entrada para intempéries (GHISALBERTI, 1979).

Figura 2 – Abelhas preenchendo buracos com própolis.



Fonte: EROĞLU; YÜKSEL (2020).

As abelhas cobrem com própolis e cera os pequenos animais que, após invadirem a colmeia, lá tenham morrido, deixando-os na porção inferior ou em alguma das paredes. Exemplos de espécies de traças que representam ameaça são *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Acherontia atropos*, *Vespa vulgaris* e *V. crabro*. Limacida e Arionida são famílias de invertebrados que também podem ser nocivos a elas (GHISALBERTI, 1979). Em resumo, a própolis tem o papel de defender a colmeia

(IRIGOITI et al., 2021), porque é a “arma química” mais importante das abelhas (MARCUCCI, 1995).

A necessidade de utilizar a própolis para determinadas funções conduz o comportamento de coleta de exsudatos das abelhas (GHISALBERTI, 1979). No clima brasileiro, ao longo do ano, há coleta de material para produzir o apicêutico (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019); em contrapartida, as abelhas da zona temperada, no hemisfério norte, realizam coletas principalmente no verão (SFORCIN, 2007). No norte da Europa, as coletas ocorrem do fim de junho até o fim da época de atividade das abelhas; na Itália, do início de março até os primeiros sinais da primavera (GHISALBERTI, 1979).

Quando restritas a uma região geográfica específica, as abelhas tendem a visitar as mesmas fontes vegetais, o que uniformiza os constituintes da própolis. A título de exemplo, no Brasil, a *Apis mellifera* africanizada demonstra preferência pela *Baccharis dracunculifolia* BC (TEIXEIRA et al., 2005), como mostra a figura 3 o momento em que a polinizadora coletava resina dessa espécie vegetal. Os compostos voláteis armazenados em ductos resiníferos ou tricomas glandulares, logo que dispersos no ambiente, são detectados pelas abelhas, atraindo-as para a retirada do exsudato (SFORCIN, 2007).

Figura 3 – Espécime de *A. mellifera* coletando a resina de *B. dracunculifolia* BC.



Fonte: TOMAZZOLI et al. (2020).

A obtenção propriamente dita é caracterizada pela quebra do exsudato resinoso em pedaços menores, utilizando para isso as patas traseiras e o aparelho bucal das abelhas, seguida da mistura dos pedaços pela língua, enquanto as mandíbulas são responsáveis por transformá-los em grânulos. Depois, as patas auxiliam a transferência, através dos pelos da tíbia, dos grânulos da boca para a corbícula, que é uma reentrância sem pelos, no lado externo da tíbia posterior. Com a corbícula preenchida, a mistura é finalmente transportada para a colmeia, em cujas paredes as abelhas podem permanecer a fim de que a própolis seja recolhida (figura 4) para uso imediato. A produção pode ser interrompida se forem necessárias visitas à colmeia com o propósito de se alimentar, além de certas espécies realizarem coletas mais ativamente do que outras (GHISALBERTI, 1979).

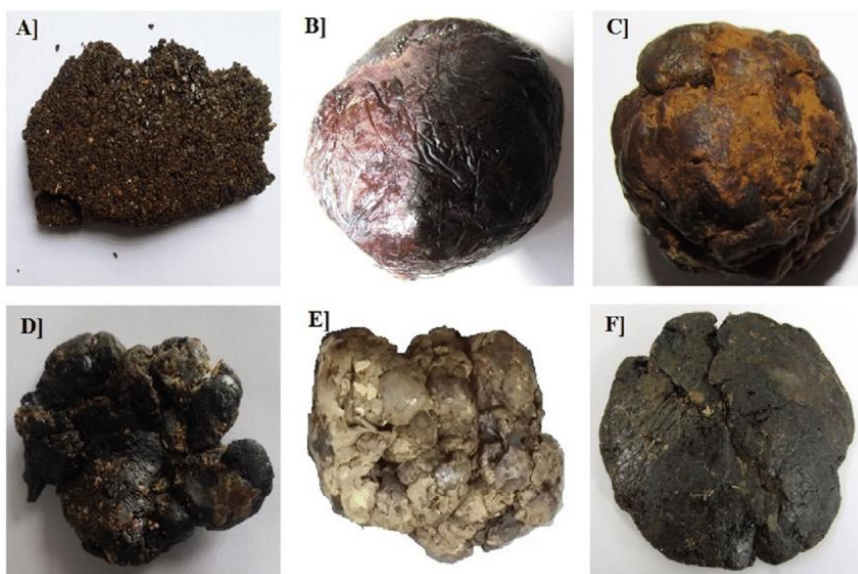
Figura 4 – Abelha retirando resina recém-coletada das patas traseiras de outro espécime.



Fonte: Adaptada de DRESCHER et al. (2019).

Com relação às propriedades organolépticas, a própolis possui odor intenso, aromático (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002), bem como coloração em tonalidades do amarelo, verde, marrom, preto e vermelho (Figura 5 A-F). Além disso, seus compostos interagem com óleos e proteínas da pele humana, promovendo forte aderência em temperaturas mais elevadas, nas quais também se mostra macia. Por tais características, tem sido chamada de “cola aromática”; porém, em temperaturas baixas, apresenta-se dura e quebradiça (GHISALBERTI, 1979).

Figura 5 (A-F) – Exemplos de colorações com que se pode encontrar a própolis.



A: Vermelha; **B:** Marrom-avermelhada; **C:** Marrom; **D:** Marrom-escura; **E:** Marrom; **F:** Marrom-esverdeada;

Fonte: KASOTE (2017).

Atualmente, estão disponíveis numerosos produtos pessoais, remédios, preparações à base de própolis, os quais são utilizados com frequência, como ocorre nos Balcãs (BANKOVA, 2005). A medicina popular, em suas práticas tradicionais, rapidamente introduziu a própolis em remédios, empregando-os para tratar feridas superficiais e dermatites (GHISALBERTI, 1979), o que tem tido ampla aceitação em decorrência da alta efetividade terapêutica (KUREK-GÓRECKA et al., 2013).

Produtos contendo própolis, tais como alimentos funcionais (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001), medicamentos odontológicos para tratar infecções de polpa e periapicais (ONCAG et al., 2006; ANDRADE-FERREIRA et al., 2007), são amplamente comercializados pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; KUREK-GÓRECKA et al., 2013). Tanto os compostos hidrossolúveis (CH) quanto o extrato etanólico (EE) de própolis, assim como seus demais compostos ativos, têm sido usados no tratamento de inflamações, no estímulo do sistema imunológico (SAWICKA et al., 2012). De maneira geral, os produtos são comercializados para consumo na forma comprimidos, cápsulas ou

soluções etanólicas (FINGER et al., 2014), seja na forma pura, seja em formulações mais complexas (BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021).

2.1.1 Composição

Os diferentes tipos de própolis brasileira, que por enquanto não abrangem a PMUP, constam da tabela 1, classificados de acordo com composição química, coloração e origem vegetal (MENDONÇA, 2011). Cerca de 800 constituintes já foram identificados (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022), em uma composição geral (Figura 6) formada por resinas e bálsamos (45-55%), ceras (8-35%), óleos essenciais e compostos aromáticos (5-10%), ácidos graxos (5%), pólen (5%), minerais e compostos orgânicos (5%). Por conseguinte, a própolis consiste em uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas (ANJUM et al., 2019), produzidas a partir de mucilagens, gomas, óleos, resinas, látex e substâncias lipofílicas (WALKER; CRANE, 1987).

Tabela 1 – Tipos de própolis brasileira classificados, com coloração e origem botânica correspondentes.

(continua)

Grupo	Região de origem	Coloração	Fonte vegetal
1	Sul (RS)	Amarela	Resina de <i>Populus alba</i>
2	Sul (RS)	Castanha-clara	
3	Sul (PR)	Castanha-escura	
4	Sul (PR)	Castanha-clara	
5	Sul (PR)	Marrom-esverdeada	Resina de <i>Hyptis divaricata</i>
6	Nordeste (BA)	Marrom-avermelhada	
7	Nordeste (BA)	Marrom-esverdeada	
8	Nordeste (PE)	Castanha-escura	
9	Nordeste (PE)	Amarela	

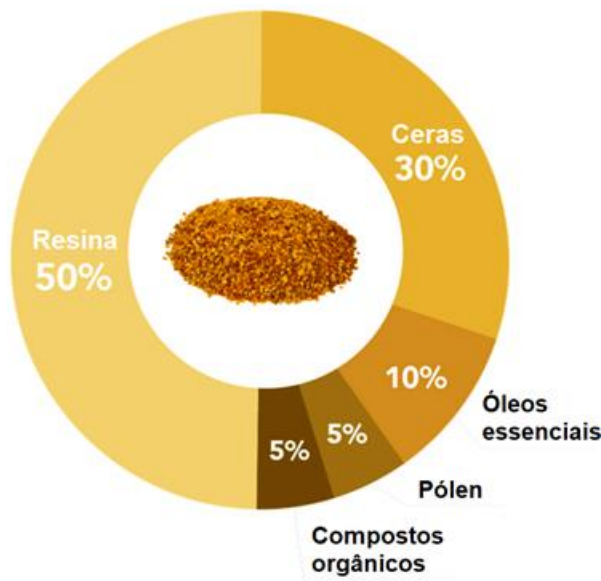
Tabela 1 – Tipos de própolis brasileira classificados, com coloração e origem botânica correspondentes.

(conclusão)

Grupo	Região de origem	Coloração	Fonte vegetal
10	Nordeste (CE)	Amarela-escura	
11	Nordeste (PI)	Amarela	
12	Sudeste (SP, MG)	Verde ou Marrom-esverdeada	Resina de <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC
13	Nordeste (AL, BA, PB)	Vermelha	Exsudato do caule de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>

Fonte: Adaptada de MENDONÇA (2011).

Figura 6 – Quantidade relativa de substâncias que compõem a própolis.



Fonte: Adaptada de EASTON-CALABRIA; DEMARY; ONER (2019).

A própolis pode ser constituída dos mais diversos compostos, como aldeídos, benzofenonas preniladas, cumarinas (HUANG et al., 2014), compostos fenólicos, flavonoides, álcoois, terpenos (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983), benzofuranos (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022), benzopiranos (SFORCIN, 2007), esteroides, chalconas, ácidos alifáticos e aromáticos, ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares,

aminoácidos (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018), ácidos decanoicos (PASUPULETI et al., 2017), ácidos e ésteres cinâmicos, ácidos e ésteres carboxílicos, hidrocarbonetos (ECEM-BAYRAM et al., 2020), vitaminas (ELNAKADY et al., 2017) e microelementos (BRASIL, 2001).

Amostras brasileiras de própolis marrom contêm grande concentração de ácidos graxos, como os ácidos linoleico, palmítico, esteárico, e de polifenóis, principalmente de derivados do ácido cumárico e flavonoides (CASTRO et al., 2007; DEMBOGURSKI et al., 2018). Em própolis os fenólicos são compostos relevantes, que abrangem, entre outras substâncias, aldeídos, derivados do ácido cinâmico e do ácido benzoico, e especialmente os flavonoides (BONVEHÍ; COLL; JORDÀ, 1994).

Tanto os compostos fenólicos quanto os terpenos, estes encontrados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022), são os metabólitos de própolis mais bioativos (PIMENTA et al., 2015). Os flavonoides constantes em própolis, tais como flavonóis, flavonas e flavanonas, estão entre esses compostos detentores de significativa atividade biológica (BONVEHÍ; COLL; JORDÀ, 1994).

Os flavonoides compõem uma classe de metabólitos relevante por apresentar teores relativamente altos na própolis, embora os compostos específicos mudem em função do tipo analisado (PARK et al., 1997). Exemplos de quantidade relativa determinada incluem a própolis da Polônia, com concentração de flavonoides totais de 6,2% a 18,8% (KĘDZIA et al., 2017), bem como a própolis da Turquia, que teve teor de 1,83% a 49,39% (ECEM-BAYRAM et al., 2020). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, assim como na própolis (GHISALBERTI, 1979), na qual foram encontradas categorias específicas, a saber, flavonas, flavonóis (BANKOVA, 2005), flavanonas (GHISALBERTI, 1979), prenilflavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos, neoflavonoides e pterocarpanos (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022).

A subdivisão das flavanonas está presente, em alta quantidade, na própolis tanto da região do Pacífico quanto da África, encontrada mais especificamente como gerani-flavanonas (FERNANDES-SILVA et al., 2013). A própolis do Pacífico, nas ilhas Okinawa e Taiwan, também é composta de flavanonas que, em consequência da sua prenilação, ganham lipofilicidade para realizar forte atividade antimicrobiana através de mecanismo que envolve danos tanto à membrana, quanto à parede celular

(RAGHUKUMAR et al., 2010). A maioria das própolis coletadas na Europa, na América do Norte, em regiões não tropicais da Ásia, na Nova Zelândia, na África, possui perfil químico semelhante ao da própolis do álamo, isto é, alto nível de flavanonas, flavonas, mas baixo teor de compostos fenólicos e seus ésteres (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; HEGAZI; EL HADY, 2002; MOHAMMADZADEH et al., 2007).

Na própolis vermelha brasileira, foram identificadas 10 flavanonas, nomeadamente (2S)-7-hidroxi-flavanona, (2S)-liquiritigenina, (2S)-7-hidroxi-6-metoxi-flavanona, (2S)-naringenina, (2S)-dihidrobaicaleina, (2S)-dihidrooroxilina A, (2R,3R)-3,7-dihidroxi-flavanona, garbanzol, (2R,3R)-3,7-dihidroxi-6-metoxi-flavanona, e alnustinol (LI et al., 2008). Ainda assim, as amostras do Brasil, na maior parte das vezes, não contêm tantas flavonas, flavonóis e flavanonas quanto as variedades europeias e chinesas (FRANCHIN et al., 2023). Contudo, em alguns casos, como o da própolis verde da Caatinga, na Região Nordeste, elaborada da resina de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Fabaceae), há teor expressivo de flavanonas e flavonóis (SON; RIBEIRO; BASTOS, 2022).

Têm-se evidenciado, dentre os principais flavonoides contidos em própolis, as flavanonas pinocembrina e naringenina (ZABAIU et al., 2017). Após a análise, por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), do extrato da própolis da Turquia, foram quantificados majoritariamente, além de outros metabólitos, os flavonoides, com destaque para a pinocembrina. Na mesma publicação, as flavanonas mostraram correlação boa com a atividade antibacteriana do opoterápico (POPOVA et al., 2005). Em própolis brasileiras, por sua vez, a pinocembrina tem sido comumente determinada (BARBOSA, 2016). Em amostras brasileiras de própolis marrom, foram descritas hesperitina e pinocembrina, que também são flavanonas (WALLER et al., 2017).

Uma pesquisa com própolis brasileira, cuja coloração não foi descrita, aferiu, por meio de ensaio colorimétrico, 7,12% de flavanonas e dihidroflavonóis (FD) (CHANG et al., 2002). Segundo o mesmo método, em amostras de própolis de coloração amarela, vermelha e castanha, provindas de regiões de floresta e savana de Roraima, coletadas tanto em período seco quanto chuvoso, foi avaliado o teor de FD, sendo observados valores de 1,11 a 5,28 mg equivalentes de pinocembrina (EP)/g de extrato (BARBOSA, 2016).

2.1.2 Bioatividade

Os metabólitos que formam a própolis, isoladamente, apresentam menor eficácia que quando complexamente misturados, pois entre eles foi verificado sinergismo gerador de muitos efeitos biológicos, alguns dos quais, a seguir, serão descritos (KUJUMGIEV et al., 1999; SFORCIN, 2007).

2.1.2.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de própolis pode ser efetuada diretamente, pela ação dos seus compostos contra microrganismos, ou indiretamente, como consequência da atividade imunoestimulante de um indivíduo infectado (SFORCIN; BANKOVA, 2011; SFORCIN, 2007). Os compostos de própolis, que podem formar sinergismos com determinados fármacos antimicrobianos (SFORCIN, 2007), são também capazes de prevenir a resistência bacteriana (PAMPLONA-ZOMENHAN et al., 2011). Tanto as amostras provenientes de regiões temperadas quanto as própolis brasileiras apresentam efeito antimicrobiano; no entanto, alcançam isso por intermédio de diferentes substâncias (BANKOVA et al., 1995).

Na Europa, as atividades antibacteriana e antifúngica resultam da ação de flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres, e flavanonas (SFORCIN, 2007). Alguns flavonoides manifestam propriedade antimicrobiana (KUJUMGIEV et al., 1999). Derivados do ácido cinâmico são diretamente responsáveis por danos à membrana bacteriana, interferem na comunicação de quórum, inibem ATPases, bloqueiam a divisão celular e a formação de biofilme (GOPU; MEENA; SHETTY, 2015). Apesar de não haver sempre uma associação diretamente proporcional entre a concentração de compostos e a bioatividade da própolis, espera-se que tanto o teor de compostos fenólicos totais (CFT) quanto o teor flavonoides totais (FT) representem o grau do seu efeito antimicrobiano *in vitro* (BRIDI et al., 2015).

Quanto aos vários EEs de própolis testados contra microrganismos, há um, preparado a partir de amostras obtidas no Japão, de coloração marrom-escura, que interrompeu o crescimento de *Streptococcus mutans* e a atividade da glicosiltransferase (IKENO; IKENO; MIYAZAWA, 1991; PARK et al., 1998). Outro, cuja própolis havia sido adquirida na Itália, impediu a adesão das células *S. aureus* para formarem biofilme, atenuou os fatores de virulência lipase e coagulase (SCAZZOCCHIO et al., 2006). Um terceiro, de amostras de diferentes regiões do

Brasil, inibiu o crescimento de *S. aureus* coagulase positivo (PARK et al., 1997). Mais um extrato, desenvolvido com própolis verde brasileira (PVB), demonstrou atividade contra *S. aureus* resistente a meticilina (VEIGA et al., 2017), *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* (SEIBERT et al., 2019).

O teste de difusão em ágar comprovou que não apenas as bactérias anaeróbicas estritas, mas também as facultativas são sensíveis a própolis (BANKOVA et al., 1995). Por exemplo, em canais radiculares de dentes extraídos, o apicêutico realizou efeito antimicrobiano contra *E. faecalis* (ONCAG et al., 2006). Certas espécies dos gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides* foram inibidas pelo EE, na concentração de 60–3000 µg/mL, enquanto *Prevotella nigrescens* mostrou alta sensibilidade a 49 µg/mL. Ainda nessa publicação, *Clostridium perfringens* e *Fusobacterium nucleatum* tiveram desempenho intermediário, *E. faecalis* e *Actinomyces israelii* foram os microrganismos mais resistentes (ANDRADE-FERREIRA et al., 2007).

Contra as bactérias *P. intermedia* e *P. nigrescens*, que haviam sido isoladas de pacientes com periodontite, o EE de própolis obtido de amostras providas do estado de Minas Gerais demonstrou atividade comparável à de fármacos como penicilina, eritromicina, meropenem e metronidazol (SANTOS et al., 2002). Com EE comercializado no Brasil, foi possível tratar a candidíase de 12 pacientes, infecção associada ao uso de prótese dentária (SANTOS et al., 2005). A irrigação subgingival do extrato hidroalcoólico de própolis, melhorou os parâmetros clínicos de 20 pacientes com periodontite crônica, comprovando-se mais eficaz que o tratamento convencional. O número de sítios onde se detectaram leveduras diminuiu, tal qual a proporção de sítios contendo nível baixo de *Porphyromonas gingivalis* (GEBARA et al., 2003).

Conforme as tabelas 2 e 3, que expõem a concentração inibitória mínima (CIM) média de diferentes extratos de própolis, estes foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Além disso, as bactérias aeróbicas foram tão sensíveis quanto as anaeróbicas (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Tabela 2 – Bactérias Gram-positivas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.

(continua)

Espécie	Líquido extrator	CIM médio (mínimo–máximo) em µg/mL
	Diclorometano	1340
	DMSO	930 (50–950)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Etanol	457 (8–3100)
	Hexano	258 (16–500)
	Metanol	266 (63–1000)
	Água	883 (565–1200)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Diclorometano	900
	Etanol	345 (8–1135)
<i>Streptococcus mutans</i>	Etanol	511 (4–4025)
<i>Streptococcus “viridans”</i>	Etanol	682 (150–1370)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Etanol	534 (80–1556)
	Água	1078 (600–1556)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Etanol	153 (80–300)
	Água	1003 (600–1556)
<i>Streptococcus oralis</i>	Etanol	167 (100–300)
	Água	1070 (940–1200)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Etanol	333 (100–600)
	Água	2150 (600–3693)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Etanol	5 (2–8)
	DMSO	1600
<i>Enterococcus spp.</i>	Etanol	544 (2–1600)
	Fluido supercrítico	698 (63–100)
	Água	250

Tabela 2 – Bactérias Gram-positivas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.

(conclusão)

Espécie	Líquido extrator	CIM médio (mínimo–máximo) em µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i>	Diclorometano	35 (8–63)
	Etanol	117 (4–400)
	Hexano	254 (8–901)
<i>Bacillus subtilis</i>	Diclorometano	39 (16–62,5)
	Etanol	180 (21–300)
	Hexano	266 (31–500)
	Água	250

Fonte: Adaptada de PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI (2019).**Tabela 3** – Bactérias Gram-negativas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.

(continua)

Espécie	Líquido extrator	CIM médio (mínimo–máximo) em µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	Diclorometano	1340
	DMSO	3648 (3190–4940)
	Etanol	784 (16–5000)
	Metanol	303 (31–1000)
	Água	2500
<i>Salmonella spp.</i>	Etanol	2962 (32–14700)
	Metanol	265 (62–1000)
	Água	2500
<i>Klebsiella spp.</i>	Diclorometano	1030
	Etanol	1006 (32–3330)
	Água	2067 (1200–2500)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Etanol	1633 (1200–2500)
	Metanol	171 (63–500)

Tabela 3 – Bactérias Gram-negativas e sua sensibilidade a diferentes extratos de própolis.

(conclusão)

Espécie	Líquido extrator	CIM médio (mínimo–máximo) em µg/mL
<i>Proteus</i>	Etanol	1633 (1200–1500)
<i>mirabilis</i>	Metanol	171 (63–500)
<i>Shigella</i>	Etanol	1133 (300–2500)
<i>flexneri</i>	Água	2500
<i>Enterobacter</i>	Diclorometano	1150
<i>cloacae</i>	Etanol	1926 (300–5000)
	Água	2500
<i>Enterobacter</i>	Etanol	34 (8–64)
<i>aerogenes</i>	Diclorometano	1100
	DMSO	2310 (1560–2810)
<i>Pseudomonas</i>	Etanol	1252 (32–7910)
<i>aeruginosa</i>	Metanol	180 (63–500)
	Água	2500
<i>Acinetobacter</i>	Etanol	5000
<i>baumannii</i>	Etanol	1433 (600–2500)
<i>Haemophilus</i>	Água	2500
<i>influenzae</i>	Etanol	256 (170–340)
<i>Campylobacter</i>		
<i>jejuni</i>		
<i>Bacterioides</i>	Etanol	2460 (1840–3700)
<i>fragilis</i>	Etanol	2467 (1200–5000)
<i>Burkholderia</i>		
<i>cepacia</i>	Água	2500

Fonte: Adaptada de PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI (2019).

2.1.2.2 Atividade antioxidante

Os principais constituintes detectados no extrato aquoso possuem atividade antioxidante que geralmente excede a do EE (NAKAJIMA et al., 2007). No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas avaliando a atividade antioxidante do EE, a qual decorre da ação de compostos fenólicos (KUREK-GÓRECKA et al., 2013). Esses compostos realizam efeito antioxidante por meio do sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO), da estabilização de oxigênios singletos e da quelação de íons metálicos (OKAWA et al., 2001). Os compostos da própolis que sequestram íons hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mitigando o estresse oxidativo (FORMA; BRYŚ, 2021), abrangem principalmente compostos fenólicos e flavonoides (KUREK-GÓRECKA et al., 2012).

A relação entre estrutura química e atividade antioxidante de ácidos fenólicos e flavonoides tem sido extensivamente descrita na literatura científica, tanto para sistemas aquosos quanto para sistemas lipofílicos (NENADIS et al., 2004). Os flavonoides são capazes de interromper a cadeia de reações oxidativas em duas etapas: no início da peroxidação lipídica e, tardiamente, sequestrando peroxirradicais de ácidos graxos poli-insaturados (NAGAI et al., 2003).

É imprescindível, para atividades antioxidantes mais pronunciadas, que haja uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 dos flavonoides, tanto quanto uma hidroxila ligada ao carbono 3 (ZIELINSKA et al., 2007). Flavonoides 3'4'-dihidroxilados, por exemplo, são benéficos a capilares, pois, através da sua atividade quelante de metais, protegem o ácido ascórbico de oxidações (GHISALBERTI, 1979).

Parte dos resultados terapêuticos do consumo de própolis derivam da sua propriedade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002), que reduz o risco de doenças graves, como câncer e doenças cardiovasculares (TEIXEIRA et al., 2010). A própolis é promissor suplemento em concentrações menores que 0,01% (p/v), a partir das quais se observa considerável propriedade antioxidante na cultura de fibroblastos da pele humana (TYSZKA-CZOCHARA et al., 2014).

O efeito da própolis turca nos ensaios da capacidade antioxidante total (CAT) e do estresse oxidativo total (EOT) foi analisado durante 24h, utilizando células HUVEC e diferentes concentrações de extrato hidroetanólico (EH) (12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). A CAT foi reduzida pelas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, porém se elevou com 12,5 $\mu\text{g/mL}$; no que se refere ao EOT, foi observado apenas nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (ECEM-BAYRAM et al., 2020). Outra análise, a

qual avaliou o EE também da própolis turca, em hepatócitos, teve resultados opostos: concluiu que as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL aumentam a CAT, sem mudanças na EOT nem na viabilidade celular (TÜRKEZ; YOUSEF; GEYIKOGLU, 2012).

O tratamento de células do cristalino de ratos com 5 e 50 µg/mL de CHs da própolis brasileira atenuou o nível de EROs, promovendo a viabilidade celular, que havia sido anteriormente prejudicada pelo alto teor de glicose na cultura (55 mM). A própolis, portanto, desempenhou atividade antioxidante protetora das células (SHIBATA et al., 2016). Através da aferição do teor de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG), em uma cultura de fibroblastos humanos, constatou-se a ausência de estresse oxidativo do EH da própolis da Turquia (AYDIN et al., 2018). Esse extrato, testado com o mesmo tipo celular, em uma pesquisa posterior, não modificou o nível de 8-OH-dG, de forma que não houve danos oxidativos ao DNA nem ao RNA dos fibroblastos (ECEM-BAYRAM et al., 2020).

O EH da própolis da Malásia demonstrou resultados notáveis nos ensaios de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), H₂O₂ e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). A investigação se expandiu para ensaio *in vivo*, em que ratos machos Sprague Dawley, acometidos por diabetes induzida por estreptozocina, aos quais foram administrados por quatro semanas 300 mg/kg do EH, apresentaram aumento da CAT, de enzimas pancreáticas antioxidantes e inibição do malondialdeído (NNA et al., 2018). Tal modelo animal foi novamente utilizado, administrando-se a ele 100 mg/kg de EE da PVB e da própolis chinesa, duas vezes ao dia, durante oito dias. Consequentemente, os dois tipos de própolis elevaram tanto o nível sérico de superóxido dismutase (SOD) quanto a glutathiona peroxidase (GSH-px) hepatorrenal (ZHU et al., 2011).

Pacientes acometidos por artrite reumatoide, tratados com própolis, tiveram reduzidos EROs e malondialdeído (NATTAGH-ESHTIVANI et al., 2022). O EE da própolis do Irã foi administrada a ratos machos Wistar, na dose de 100 mg/kg, o que diminuiu o nível de malondialdeído, mas aumentou GSH-px, SOD e CAT (SAMENI et al., 2016). O mesmo modelo animal, submetido a ablação renal e nefrectomia, foi tratado com EH da própolis vermelha de Alagoas (PVA) por 90 dias, ao fim dos quais se verificou significativa atenuação do estresse oxidativo (TELES et al., 2015). Portanto, a própolis é capaz de realizar efeitos antioxidantes não somente pela

interferência na peroxidação lipídica, mas também por meio de ativação enzimática (ZHU et al., 2011).

O extrato metanólico da própolis de Portugal foi submetido ao ensaio de inibição do dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), no qual se obtiveram CI_{50} de $31,0 \pm 5,6 \mu\text{g/mL}$ para o ácido ascórbico, bem como $6,3 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ e $10,4 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ para o apicêutico. Além disso, o melhor desempenho em relação à vitamina C se repetiu, de modo dependente de tempo e concentração, na proteção de hemólise da membrana de eritrócitos humanos. Outro resultado concentração-dependente ocorreu na peroxidação lipídica, em que houve redução do malondialdeído. Concluiu-se que algumas variedades de própolis são antioxidantes naturais eficazes (VALENTE et al., 2011).

No sistema β -caroteno/ácido linoleico, a CAT do EH da própolis polonesa foi apenas ligeiramente menor que aquela de compostos com propriedade antioxidante relativamente alta, como α -tocoferol e butil-hidroxitolueno. Depois, tanto a capacidade de sequestro de radicais DPPH• como a capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox, no ensaio com 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS•), se mostraram relativamente altas (KUREK-GÓRECKA et al., 2012).

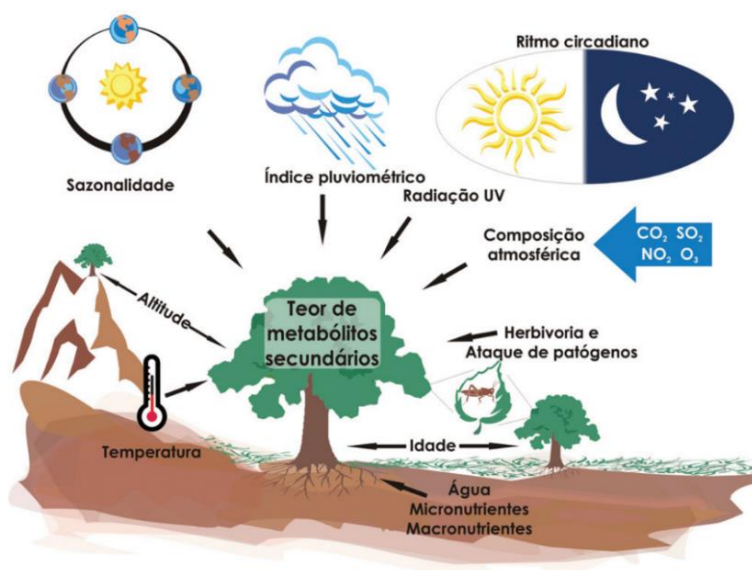
Com relação à capacidade de sequestro de radicais DPPH•, o EH da própolis do México revelou CI_{50} relativamente baixa, $15,75 \mu\text{g/mL}$. No ensaio com modelos murinos portadores de diabetes induzida por estreptozocina, o extrato elevou a atividade das enzimas SOD, catalase e GSH-px. Os resultados promissores foram atribuídos à ação de compostos fenólicos e flavonoides totais que compõem a própolis (RIVERA-YAÑEZ et al., 2018). Em um ensaio controlado, randomizado e duplo-cego, abrangendo 62 pacientes portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), a administração de cápsulas com 500 mg de própolis do Irã, três vezes ao dia durante oito semanas, intensificou significativamente a atividade da catalase (HESAMI et al., 2019).

Após ensaio clínico randomizado, controlado, realizado durante 18 semanas com pacientes acometidos por DMT2, aos quais se administraram 900 mg/dia do EE da PVB, houve aumento significativo do nível sérico de GSH-px, enquanto as proteínas carboniladas não se alteraram (ZHAO et al., 2016). Novamente a dosagem de 900 mg/dia, administrada a pacientes com a mesma doença, por igual período, todavia utilizando própolis chinesa, elevou o teor sérico de GSH-px dos pacientes.

2.1.3 Sazonalidade

Os metabólitos secundários constituem uma interface química entre a planta e o ambiente que a cerca, pois estão sujeitos a modificação por fatores que, consequentemente, atuam na composição da própolis (KUTCHAN, 2001). As condições do ambiente (Figura 7) onde está a espécie vegetal incluem ritmo circadiano, temperatura, idade da planta, disponibilidade hídrica, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, nutrientes disponíveis no solo, altitude, composição e poluição atmosférica, ataque de patógenos, estímulos mecânicos e sazonalidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Essas condições se relacionam com os metabólitos secundários de modo diverso, pluralístico e dinâmico (SHI et al., 2022).

Figura 7 – Esquema das condições ambientais que alteram o teor de metabólitos secundários de plantas.



Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007.

As condições de coleta do material vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), o período de coleta da própolis (CHEN et al., 2004), a localização geográfica da colmeia (SILVA et al., 2015), são todos fatores que também alteram o teor de compostos bioativos. Com relação à sazonalidade, ela influencia até mesmo as características fenológicas das plantas, de modo que a biossíntese de metabólitos seja modificada (TEIXEIRA et al., 2010).

A própolis brasileira difere da própolis de zonas temperadas do Hemisfério Norte, porque aquela é constantemente produzida, durante o ano, pelas abelhas (BANKOVA et al., 1998), enquanto esta é produzida apenas no verão, fim da primavera e início do outono (GHISALBERTI, 1979). Portanto, diante das variações da composição da própolis do Brasil, apicultores podem selecionar amostras dos meses em que são sintetizados mais metabólitos ativos, ou aqueles do seu interesse (BANKOVA et al., 1998).

Existem casos, porém, em que a composição das plantas resiste a todos os fatores ambientais, permanecendo, ao longo dos anos, inalterada (SAKAMOTO et al., 2005). Ensaaios com o EH da própolis de São Paulo e células NK, por exemplo, revelaram não haver significativas variações sazonais (SFORCIN; KANENO; FUNARI, 2002), resultado também observado em outras pesquisas bioquímicas, imunológicas e microbiológicas utilizando o apicêutico (SFORCIN, 2007). Devem, pois, ser realizadas pesquisas contínuas visando à avaliação do teor de metabólitos secundários de plantas e própolis, em função dos períodos em que foram coletados. Além disso, é necessário o rigoroso controle de qualidade de tais produtos, que empreguem técnicas analíticas modernas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A Região Nordeste do Brasil é marcada por duas temporadas: seca e chuvosa, determinadas pela quantidade de chuvas que nelas ocorre. BUENO-SILVA et al. (2017) verificaram que, apesar de haver variação sazonal tanto na concentração de marcadores quanto na atividade antibacteriana da PVA, o período de chuvas, que compreendeu os meses de janeiro a maio, apresentou os melhores resultados. O extrato da PVA, submetido por NASCIMENTO et al. (2019) a um estudo de sazonalidade, demonstrou maior teor de marcadores flavonoídicos nos meses de março a dezembro, isto é, no período de intensas chuvas e maior umidade relativa. As gutiferas E e B, porém, tiveram maior concentração de outubro de 2011 a março de 2012, período do verão, em que houve intensa radiação solar e alta temperatura. Dessa forma, através da ação de diferentes compostos, a PVA sustenta por longo tempo alta atividade antimicrobiana.

Tanto a composição como a atividade antibacteriana do EH da própolis vermelha de Pernambuco foram avaliadas, no período de chuvas (EHPC) e no período seco (EHPS), com ambos os extratos inibindo *P. aeruginosa* na concentração de 512 µg/mL. Contra esse microrganismo e *S. aureus*, não ocorreu sinergismo ocasionado

pela associação do EHPC com imipenem ou gentamicina. Contrariamente, a combinação do EHPS com gentamicina se mostrou mais eficaz contra as duas cepas, porém, quando associado com imipenem, foi mais eficaz apenas contra *P. aeruginosa*. Os ácidos clorogênico, cafeico e elágico tiveram teor mais alto no EHPS, em contrapartida, luteolina e apigenina tornaram-se mais concentradas no EHPC. Contra *S. aureus* e *E. coli* multirresistentes, o EHPC apresentou melhor desempenho, com CIMs de 64 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente, enquanto o EHPS teve valores mais altos, respectivamente, 101,6 µg/mL e 512 µg/mL (REGUEIRA-NETO et al., 2017).

TEIXEIRA et al. (2010) efetuaram a análise da variação sazonal da composição e atividade antioxidante do extrato metanólico da PVB, durante um ano, com amostras coletadas em três diferentes localidades de Minas Gerais. A amostra do município de Itapeçerica, embora tenha tido variação do nível de compostos ao longo do ano, manifestou o acetato de farnesila apenas em janeiro, e teve, em março, teor de 6,3% de ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, cuja concentração foi nula em abril. Os menores teores de CFT ocorreram em janeiro (15,5%), março (20,9%) e julho (18,6%), o maior, apesar de ter sido o mês com menor capacidade de sequestro DPPH•, em maio. A capacidade de sequestro de DPPH• mais baixa foi observada em janeiro, as maiores, em março e novembro, estatisticamente iguais à do butil-hidroxitolueno.

O EH da própolis de São Paulo, através de investigação, durante um ano, por CG-EM, apresentou relação inversamente proporcional entre ácidos diterpênicos e CFT. Conforme a subespécie de abelha, houve diferentes preferências por espécies vegetais. Além disso, exclusivamente no verão, surgiu um ácido diterpênico; no outono, em contrapartida, um ácido diterpênico do tipo lábdano demonstrou máxima concentração. A porcentagem de matéria extraída com etanol a 70%, que constitui o bálsamo, também se alterou de acordo com a estação do ano: 44,6% na primavera, 37,0% no verão, 36,0% no outono e 49,2% no inverno (BANKOVA et al., 1998).

2.1.4 Controle de qualidade

A Comissão Internacional do Mel estabeleceu os requisitos de qualidade dos dois tipos de própolis mais amplamente comercializados no mundo, o tipo Alecrim (PVB, *B. dracunculifolia* BC) e o tipo Álamo, alguns dos quais constam da tabela 4. Exigem-se da própolis Alecrim pelo menos 5% de CFT e 0,5% de FT; do Álamo, 21% de CFT, 4% de flavonas e flavonóis totais, e 4% de FD (POPOVA et al., 2004).

Tabela 4 – Concentração mínima permitida de metabólitos totais para as própolis do Álamo e Alecrim, segundo a Comissão Internacional do Mel.

Tipo de própolis	Ensaio	Concentração percentual mínima permitida (%)
Álamo	Compostos fenólicos totais	21
	Flavonas e flavonóis totais	4
	Flavanonas e dihidroflavonóis totais	4
Alecrim	Compostos fenólicos totais	5
	Flavonoides totais	0,5

Fonte: Adaptada de POPOVA et al. (2004).

Os critérios de qualidade definidos para a própolis brasileira e seu extrato encontram-se na Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001, que abrange amostras destinadas tanto ao comércio nacional quanto ao internacional. A legislação classifica a própolis bruta de acordo com o seu teor de FT: baixo teor (até 1,0%, m/m), médio teor (>1,0% até 2,0%, m/m) e alto teor (>2,0%, m/m) (BRASIL, 2001).

No que se refere aos requisitos físico-químicos para a própolis bruta, a perda por dessecação pode ser de no máximo 8% (m/m); o conteúdo de cinzas, até 5% (m/m); o teor de cera, no máximo 25%; o teor de CFT, no mínimo 5% (m/m); o teor de FT, no mínimo 0,5%; a atividade de oxidação, até 22 segundos; a massa mecânica, no máximo 40% (m/m); e compostos solúveis em etanol, de no mínimo 35% (m/m).

Quanto às provas qualitativas, são exigidos picos relativos às principais classes de flavonoides entre 200 e 400 nm, assim como resultado positivo nos ensaios de acetato de chumbo positivo e hidróxido de sódio. Os critérios macroscópicos e microscópicos, por sua vez, definem que a amostra não deve ter matéria estranha, exceto aquelas que, acidentalmente presentes, forem oriundas do processo de elaboração da própolis, pelas abelhas, como fragmentos de abelha, madeira e plantas.

As características sensoriais variam conforme a origem botânica, e incluem aroma balsâmico e resinoso; coloração amarelada, parda, esverdeada ou marrom;

sabor de suave e balsâmico a forte e picante; consistência, à temperatura ambiente, maleável ou rígida; e granulometria heterogênea (BRASIL, 2001). Para o extrato de própolis, as características sensoriais mudam pela mesma causa, e têm de ser estas: aroma característico; coloração em tons avermelhados, esverdeados ou âmbar, com intensidade dependente da concentração; sabor característico, de suave a forte, amargo e picante; e aspecto límpido e heterogêneo.

O mínimo de 11% (m/v) é requerido para a concentração do extrato seco, o teor de cera não deve ser superior a 1% (m/m), deve ser no mínimo 0,50% (m/m) a sua concentração de CFT; a de FT, no mínimo 0,25% (m/m). A atividade de oxidação não pode ultrapassar 22 segundos, a graduação alcoólica do etanol empregado para o obter deve ser no máximo 70 °GL (v/v), o teor máximo de metanol, quando utilizado, tem de ser 0,40 mg/L. Tal como na própolis bruta, o extrato precisa ter resultado positivo tanto no ensaio de acetato de chumbo como no ensaio de hidróxido de sódio (BRASIL, 2001).

Produtos alimentícios, segundo a UK Food Standards Agency, que define o controle de qualidade de produtos de abelha para consumo humano, não podem ter concentração de Pb acima de 1 mg/kg (MAFF, 1995). Por outro lado, a Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001 determina que contaminantes orgânicos e inorgânicos, tanto da própolis bruta quanto do seu extrato, têm limites máximos exigidos por outro regulamento (BRASIL, 2001), a Resolução - RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013. O arsênio (As) está limitado a 0,30 mg/kg; o chumbo (Pb), a 0,30 mg/kg; e o cádmio (Cd), a 0,10 mg/kg (BRASIL, 2013).

A qualidade da própolis é aprimorada ao substituir ferramentas de colmeia pelo coletor de própolis adequado, o que reduz do seu teor de cera para menos de 21%. Portanto, as boas práticas da apicultura, quando implementadas pelos apicultores, conduzem à melhor qualidade do apicêutico (STAN; MĂRGHITAŞ; DEZMIREAN, 2011). De modo geral, uma própolis de boa qualidade deve ser livre de contaminantes tóxicos, apresentar baixo teor de cera, cinzas e matéria insolúvel, e ter compostos ativos correspondentes, em identidade e concentração, à sua principal fonte vegetal, que tem de ser conhecida (BANKOVA, 2000).

Tanto a origem quanto a qualidade das matérias-primas são fundamentais para a obtenção de produtos finais com composição e propriedades terapêuticas constantes (CALIXTO, 2000). Como conclusão de seu estudo, BRIDI et al. (2015)

sugerem que as regulações internacionais passem a incluir testes microbiológicos e antioxidantes, *in vitro*, como o ensaio da capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC), a fim de uma avaliação mais precisa da qualidade da própolis.

Em virtude dos distintos tipos de própolis, em todo o mundo, não é possível definir um padrão químico universal para o controle de qualidade (BANKOVA, 2005). A variabilidade da composição do opoterápico contribuiu para que ele ainda não tenha sido oficialmente aceito em determinados países. A falta de uniformidade, nesse aspecto, gera dificuldades para o controle de qualidade, de modo que são necessárias mais pesquisas que avaliem o teor biomarcadores nas variedades de própolis, elucidando perfis químicos. Além disso, aferir parâmetros de qualidade constitui um pré-requisito para a comercialização do apicêutico (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022).

Os critérios de qualidade são definidos com base em um grande número de pesquisas que caracterizem um tipo de própolis (STAN; MĂRGHITAȘ; DEZMIREAN, 2011). O controle de qualidade garante produtos seguros tanto a consumidores como a apicultores, seus métodos devem ser rápidos, baratos, precisos, confiáveis e reprodutíveis. Embora os marcadores químicos tenham a sua importância na pesquisa científica (POPOVA et al., 2010), é preferível, para o controle de qualidade de própolis, a quantificação de grupos de metabólitos (BANKOVA, 2005).

A investigação de marcadores químicos da própolis geralmente emprega técnicas cromatográficas, espectroscópicas e quimiométricas (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022); o controle de qualidade, métodos espectrofotométricos simples, validados, que envolvem reações de complexação ou redução, capazes de determinar no apicêutico o teor de flavonas, flavonóis, flavanonas, dihidroflavonóis e compostos fenólicos totais (POPOVA et al., 2004).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a variação sazonal de marcadores químicos, de metabólitos totais e das atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de extratos da PMUP.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os marcadores químicos da PMUP por meio de CLAE-DAD;
- Analisar o teor de CFT dos extratos hidroetanólicos da PMUP através de ensaio com Folin-Ciocalteu;
- Obter a concentração de FT dos extratos hidroetanólicos da PMUP por ensaio com cloreto de alumínio (AlCl_3);
- Investigar o nível de FDT dos extratos hidroetanólicos da PMUP por intermédio de ensaio com 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNP);
- Estimar a atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos da PMUP por meio do ensaio químico da capacidade de sequestro de radicais DPPH•; e
- Determinar a CIM dos extratos da PMUP contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *Candida albicans*.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta de amostras

Antes do início dos procedimentos experimentais, esta pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), adquirindo o número A2F5549. O comprovante de cadastro de acesso ao SisGen, com seus detalhes, consta do anexo 1. Amostras de PMUP *in natura* (Figura 8) foram obtidas de seis diferentes apiários, os quais forneceram uma amostra referente a cada mês, durante um ano, resultando em 12 amostras que abrangeram os meses de setembro de 2020 a agosto de 2021. O nome dos apiários, o mês de coleta e a massa de própolis que cada um forneceu estão descritos na tabela 5.

Figura 8 – Amostra ainda não processada de PMUP, coletada em agosto de 2021.



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 5 – Apiários de origem das amostras, sua massa e a época do ano em que foram coletadas.

Época de coleta (mês/ano)	Apiário	Massa (g)
SET/2020	Mata dos Frios	91
OUT/2020	Mata dos Frios	60
NOV/2020	Serra da Barriga	56
DEZ/2020	Mata Micro-ondas	75
JAN/2021	Mata dos Frios	65
FEV/2021	Branquinha	61
MAR/2021	Branquinha	81
ABR/2021	Mata dos Frios	38
MAI/2021	Mata dos Frios	44
JUN/2021	Mata dos Frios	42
JUL/2021	Sueca	43
AGO/2021	Mata dos Frios	64

Fonte: Autor, 2024.

As amostras foram acondicionadas em filme plástico de polietileno, em seguida, armazenadas sob refrigeração, a -20 °C, onde foram mantidas até o momento de serem processadas e analisadas. Todas as pesagens, em todos métodos utilizados nesta pesquisa, foram efetuadas na mesma balança analítica (Shimadzu AX200).

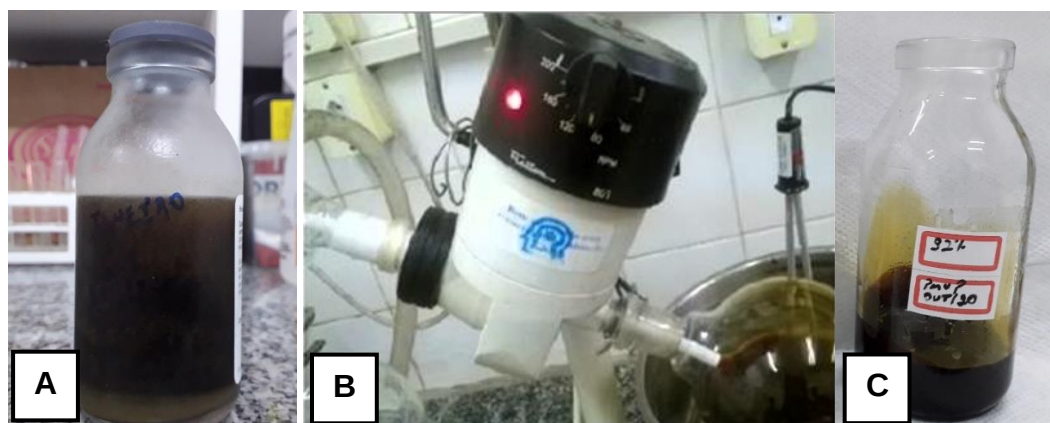
4.2 Obtenção de extratos

A extração das amostras foi realizada pelo método de maceração. Com esse propósito, foram embebidos 15 g de própolis bruta em 50 mL de solução hidroetanólica a 92,8% (m/m), e o sistema extrativo era vigorosamente agitado sempre que havia o primeiro contato entre líquido extrator e amostra. Visto que a extração compreendeu dois ciclos de 48h, foram realizadas ao todo duas agitações. Recolheu-se o

sobrenadante total em frascos de vidro identificados com o mês de coleta de cada amostra, os quais foram imediatamente armazenados sob refrigeração, a 4 °C.

Os extratos líquidos apresentaram precipitação de ceras após sete dias de armazenamento a frio (Figura 9-A). Para as remover, foi necessária uma filtração simples, após a qual foram evaporados dos extratos líquidos os seus solventes, água e etanol, em rotaevaporador (Fisatom, Brasil) (Figura 9-B). Os extratos brutos (EB) (Figura 9-C) produzidos foram acondicionados em pequenos frascos de vidro hermeticamente fechados; em seguida, armazenados sob refrigeração a -10 °C. Assim foram preparados os extratos hidroetanólicos de PMUP (EHE).

Figura 9 (A-C) – Obtenção de EBs a partir do EHE.



A: EHE revelando o precipitado de ceras ao fundo do frasco; **B:** Evaporação rotativa do EHE; **C:** EB antes de ser armazenado.

Fonte: Autor, 2024.

4.3 Ensaios químicos

4.3.1 Reagentes

Os padrões analíticos de catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 2-cumárico, naringenina, pinobanksin, kaempferol, pinocembrina, galangina, pinostrobina, ácido p-cumárico, rutina, resveratrol, cumarina, liquiritigenina, quercetina, luteolina, crisina e artepillin-C foram adquiridos na Sigma-aldrich (St. Louis, EUA). Tanto o metanol grau HPLC quanto o ácido fórmico foram comprados na J. T. Baker (Mallinckrodt, México); a água Milli-Q foi produzida no Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA), na Universidade Federal de Alagoas.

4.3.2 Quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD

Os marcadores químicos que compõem a PMUP foram quantificados nos EHEs por intermédio de CLAE-DAD. As condições experimentais utilizadas por ARRUDA (2018), que realizou no LAFA a CLAE-DAD da PVA, foram adaptadas para separar, identificar e quantificar com boa resolução os compostos bioativos majoritários da PMUP. O cromatógrafo empregado para esse fim, um modelo da Shimadzu, foi constituído de bomba de alta pressão Nexera LC-20ADXR, desgaseificador DGU-20A3R, autoinjeter SIL-20AXR, coluna CTO-20A, detectores de arranjo de diodos SPD-M20A, controlador CBM-20A e programa LabSolutions LC.

Com relação à fase móvel, foi constituída de ácido fórmico a 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B), bombeada a um fluxo de 0,8 mL/min; a fase estacionária consistiu em coluna Júpiter (Phenomenex®) de fase reversa (C₁₈, 250 x 4,6 mm; 5 µm). O forno foi mantido a temperaturas de 30–32 °C durante todas as análises, o volume de injeção foi ajustado para 2 µL. A eluição ocorreu utilizando-se o seguinte gradiente de solventes: 70% de A (0–5 minutos), 64% de A (5–8 minutos), 58% de A (8–11 minutos), 52% de A (11–14 minutos), 52% de B (14–20 minutos), 56% de B (20–24 minutos), 62% de B (24–28 minutos), 68% de B (28–32 minutos), 72% de B (32–36 minutos), 90% de B (36–40 minutos) e 100% de B (40–44 minutos), retornando depois ao gradiente inicial de 70% de A (44–47 minutos).

4.3.2.1 Curvas de calibração

A fim de impedir que alguns dos padrões analíticos coeluissem durante a elaboração da curva de calibração, o que havia sido previsto por uma análise qualitativa preliminar, foram preparadas duas misturas, que abrangeram as concentrações de 0,15 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,5 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL e 75 µg/mL. Para tanto, a solução de 1 mg/mL, obtida após a pesagem de 1 mg de soluto e sua dissolução em 10 mL de metanol grau HPLC, foi diluída. A mistura 1, que gerou o cromatograma disposto no anexo 2 (aferido em 291 nm, relativo à concentração de 60 µg/mL) e as curvas de calibração inseridas no anexo 3 (A-J), foi composta de catequina (anexo 3-A), ácido cafeico (anexo 3-B), ácido ferúlico (anexo 3-C), ácido 2-cumárico (anexo 3-D), naringenina (anexo 3-E), pinobanksin (anexo 3-F), kaempferol (anexo 3-G), pinocembrina (anexo 3-H), galangina (anexo 3-I) e pinostrobina (anexo 3-J). A mistura 2, que gerou o

cromatograma disposto no anexo 4 (aferido em 277 nm, relativo à concentração de 60 µg/mL) e as curvas de calibração inseridas no anexo 5 (A-I), foi constituída de ácido p-cumárico (anexo 5-A), rutina (anexo 5-B), resveratrol (anexo 5-C), cumarina (anexo 5-D), liquiritigenina (anexo 5-E), quercetina (anexo 5-F), luteolina (anexo 5-G), crisina (anexo 5-H), pinostrobin (anexo 5-I). Em razão de não haver, no laboratório, no dia da preparação das misturas, quantidade adequada de artemisinina, o cromatograma (Anexo 6-A), o espectro de absorção UV (Anexo 6-B) e a curva de calibração (Anexo 7) desse composto foram obtidos em outra ocasião. A área do pico dos padrões foi aferida no comprimento de onda em que apresentaram máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$).

4.3.2.2 Análise dos EHEs por CLAE-DAD

Efetua-se a pesagem de 20 mg dos EBs relativos aos 12 meses, os quais foram dissolvidos em 10 mL de metanol grau HPLC, de modo que se conseguiram soluções de extrato a 2 mg/mL. Estas foram, logo depois, diluídas para 200 µg/mL, a fim de serem injetadas no cromatógrafo. Foram realizadas, portanto, a injeção e a análise das amostras, registrando-se a área dos picos e inserindo-as na equação da sua reta correspondente, a qual foi identificada tanto por meio do tempo de retenção (tR) quanto por meio do $\lambda_{\text{máx}}$.

4.3.3 Teor de compostos fenólicos totais

4.3.3.1 Curva de calibração do ácido gálico

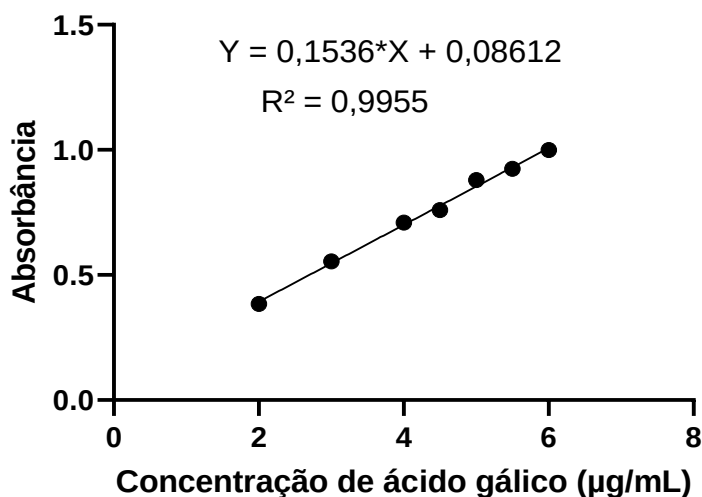
O método de CFT foi realizado de acordo com as condições experimentais descritas por NASCIMENTO et al. (2018), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e algumas soluções. Primeiro se preparou uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% (m/v), com água Milli-Q, depois foi preparada uma solução do padrão analítico de ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) a 1 mg/mL, com etanol 70% (v/v).

A reação ocorreu em um balão volumétrico com capacidade para 10 mL, ao qual foram adicionados 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 3 mL de água Milli-Q e uma alíquota da solução de ácido gálico. Então o balão foi agitado durante um minuto, em seguida, 600 µL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adicionados a ele. No mesmo instante, foi observada mudança na coloração da mistura reacional, que passou do verde-claro do reagente de Folin-Ciocalteu para o azul-claro. O sistema, após ser agitado por mais 30 segundos, foi completado com

água Milli-Q até o traço de aferição. O conteúdo do balão foi transferido para um tubo de ensaio, que foi mantido ao abrigo da luz por duas horas. Esse foi o tempo necessário para o desenvolvimento da reação, que inclui a oxidação de fenóis como o ácido gálico. Transcorrido esse período, verificou-se intensificação da coloração azul da mistura. A absorbância, portanto, foi aferida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1280, modelo empregado em todas as análises colorimétricas desta pesquisa), em comprimento de onda (λ) programado para 750 nm.

Todas as etapas da reação foram replicadas, em triplicata, alterando-se apenas o volume das alíquotas da solução de ácido gálico: 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 45 μ L, 50 μ L, 55 μ L e 60 μ L, a fim de atingir as concentrações de 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 4,5 μ g/mL, 5 μ g/mL, 5,5 μ g/mL e 6 μ g/mL, respectivamente. Com as absorbâncias registradas, foi possível construir uma curva de calibração (Figura 10) que atende aos critérios de precisão, precisão intermediária e exatidão requeridos pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

Figura 10 – Curva de calibração do ácido gálico no ensaio de CFT.



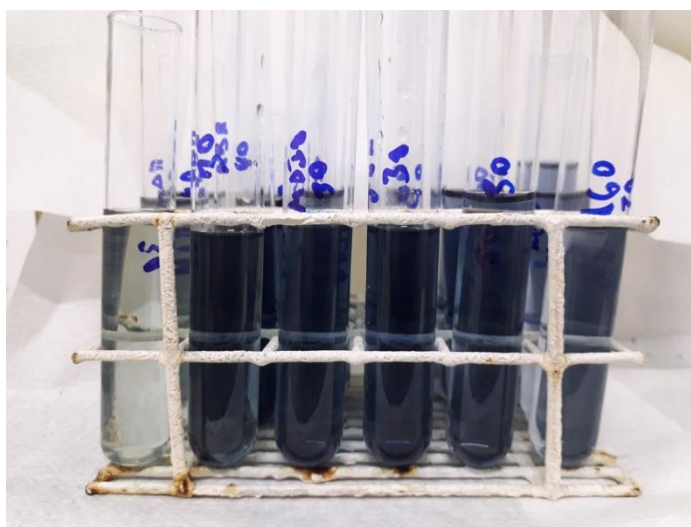
Fonte: Autor, 2024.

4.3.3.2 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais nos EHEs

Cinquenta mg dos 12 EBs foram pesados e reconstituídos em 10 mL de etanol absoluto, em balão volumétrico, de modo que se obtiveram soluções estoque de

extrato de PMUP a 5 mg/mL. A reação propriamente dita foi realizada também em balão volumétrico de 10 mL. Primeiro foram adicionados a ele 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu; em seguida, aproximadamente 3 mL de água Milli-Q e uma alíquota de 100 µL da solução de extrato, dessa vez em substituição ao padrão analítico de ácido gálico. O sistema foi agitado durante um minuto, ao fim do qual foram adicionados 600 µL da solução de Na₂CO₃. Outra agitação, de 30 segundos, foi aplicada ao sistema e, finalmente, o volume do balão foi completado com água Milli-Q, homogeneizando-se a mistura reacional pela última vez. O conteúdo do balão foi transferido para um tubo de ensaio (Figura 11), o qual permaneceu ao abrigo da luz durante duas horas. Esse método (NASCIMENTO et al., 2018) foi realizado em triplicata, resultando na análise de 36 amostras com concentração de 50 µg/mL de extrato de PMUP.

Figura 11 – Tubos de ensaio no ensaio de CFT, após duas horas.



Fonte: Autor, 2024.

A aferição da absorbância das misturas reacionais foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda de 750 nm. As absorbâncias foram então inseridas na equação da reta $y = 0,1536 \cdot x + 0,08612$, que proporcionou concentrações equivalentes de ácido gálico (µg/mL). Utilizou-se, posteriormente, a relação entre essas concentrações e a concentração de extrato de PMUP com a finalidade de obter a porcentagem de compostos fenólicos nas amostras, também equivalente de ácido gálico.

4.3.4 Teor de flavonoides totais

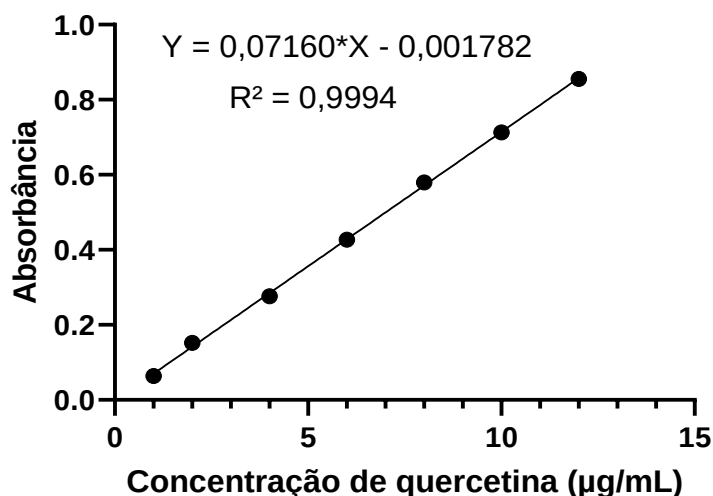
4.3.4.1 Curva de calibração da quercetina

O método seguinte foi realizado, em sua totalidade, de acordo com as condições experimentais utilizadas por NASCIMENTO et al. (2018). Inicialmente foram preparadas uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5% (m/v), com metanol, e uma solução estoque do padrão analítico de quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) a 1 mg/mL, com solvente etanol 70% (v/v).

A reação foi desenvolvida em triplicata, em balões volumétricos de 5 mL, aos quais foram adicionadas alíquotas de 5 μL , 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL , 50 μL e 60 μL da solução estoque de quercetina, para atingir, com o preenchimento dos balões, soluções de trabalho nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ 2 $\mu\text{g/mL}$ 4 $\mu\text{g/mL}$ 6 $\mu\text{g/mL}$ 8 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ e 12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Foram adicionados aos balões 100 μL da solução de AlCl_3 , em seguida, eles foram preenchidos com metanol e, por fim, agitados para a homogeneização da mistura reacional. A reação ocorreu ao abrigo da luz e durou 30 minutos, período após o qual foi verificada a coloração amarela característica dos complexos flavonóide-Al.

O conteúdo dos balões foi inserido em uma cubeta de quartzo e sua absorbância foi aferida em espectrofotômetro UV-Vis, em λ de 425 nm. Elaborou-se, com as absorbâncias obtidas, a curva de calibração da quercetina (Figura 12), a qual atende aos critérios de precisão, precisão intermediária e exatidão requeridos pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

Figura 12 – Curva de calibração da quercetina no ensaio com AlCl_3 .



Fonte: Autor, 2024.

4.3.4.2 Avaliação do teor de flavonoides totais nos EHEs

Foram reconstituídos em 10 mL de etanol absoluto, em balões volumétricos de 5 mL, 50 mg do EB de cada mês, de forma que fossem obtidas soluções de extrato de PMUP na concentração de 5 mg/mL. A reação, realizada em triplicata, seguiu as mesmas condições experimentais empregadas para elaborar a curva de calibração da quercetina, exceto por ter havido a substituição das alíquotas da solução estoque do padrão analítico por alíquotas de 150 µL, 175 µL e 200 µL da solução de extrato de PMUP, para alcançar as concentrações de 150 µg/mL, 175 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente.

Após 30 minutos de reação, houve a aferição da absorbância das misturas reacionais (Figura 13) em espectrofotômetro UV-Vis, em λ de 425 nm. As absorbâncias foram inseridas na equação da reta $y = 0,07160 \cdot x + 0,001782$, a qual proporcionou concentrações equivalentes de quercetina (µg/mL). Utilizou-se, depois, a relação entre essas concentrações e as concentrações de extrato nas soluções de trabalho, com a finalidade de obter a porcentagem de flavonoides nas amostras, também equivalente de quercetina.

Figura 13 – Tubos após 30 minutos, no ensaio com AlCl_3 .



Fonte: Autor, 2024.

4.3.5 Teor de flavanonas e dihidroflavonóis

4.3.5.1 Curva de calibração da pinocembrina

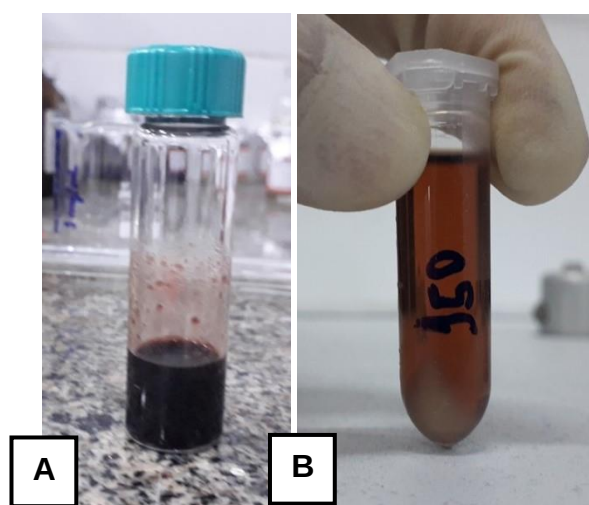
O método para quantificar FD foi empregado conforme as orientações de BANKOVA et al. (2019), com algumas modificações. As seguintes soluções foram preparadas para a realização do ensaio: solução de padrão analítico de pinocembrina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$) a 1 mg/mL, em etanol absoluto; solução de hidróxido de potássio (KOH) a 100 mg/mL, em etanol 70% (v/v); e solução de DNP a 10 mg/mL. Esta última exigiu que fossem pesados 100 mg de DNP após secagem prévia em estufa, a 60 °C, por três horas. A massa de DNP foi dissolvida em 200 µL de ácido sulfúrico 96%, obtendo-se uma solução que foi diluída, subsequentemente, com 10 mL com etanol absoluto.

Com a finalidade de preparar a curva de calibração, foram adicionados 400 µL da solução de DNP a um tubo rosqueado, no qual também foram inseridos 200 µL da solução de pinocembrina. Essa mistura foi homogeneizada e submetida a aquecimento em banho-maria, a 50 °C, durante 50 minutos. Decorrido esse tempo, foi constatada a intensificação da coloração alaranjada da mistura.

O tubo foi retirado do banho-maria para que resfriasse, em seguida, 1,4 mL da solução de KOH foi adicionado a ele, havendo imediato escurecimento da mistura reacional (Figura 14-A), o que indicou a formação de dinitrofenilhidrazonas. Após

homogeneização, alíquotas de 15 μL , 20 μL , 25 μL , 50 μL , 55 μL e 60 μL da mistura foram transferidas para tubos de microcentrífuga, obtendo-se as concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 5,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, após preenchimento dos tubos com etanol absoluto até o volume final de 2 mL. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 3000 rpm, por cinco minutos (Figura 14-B), em minicentrífuga (CAPP, CR-1512). Por fim, os sobrenadantes tiveram a absorbância aferida em espectrofotômetro UV-Vis, em λ de 486 nm.

Figura 14 (A-B) – Mistura reacional escurecida após a adição de KOH.

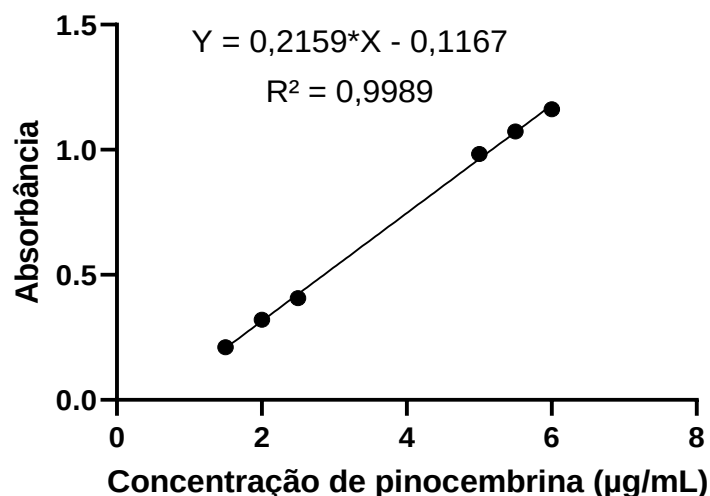


A: Mistura reacional após a adição de KOH; **B:** Mistura reacional após centrifugação, com precipitado ao fundo do tubo.

Fonte: Autor, 2024.

As absorbâncias registradas foram, posteriormente, utilizadas para elaborar uma curva de calibração (Figura 15) que atende aos critérios de precisão, precisão intermediária e exatidão constantes na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

Figura 15 – Curva da pinocembrina no ensaio com DNP.



Fonte: Autor, 2024.

4.3.5.2 Teor de flavanonas e dihidroflavonóis nos EHEs

Em balão volumétrico, 20 mg dos EBs referentes aos 12 meses deste estudo foram reconstituídos com 10 mL de etanol absoluto, produzindo-se soluções de extrato de PMUP a 2 mg/mL. As demais soluções, que foram preparadas para construir a curva de calibração, também foram utilizadas, exceto solução de pinocembrina, que foi substituída pelas soluções de extrato.

A princípio, 200 µL das soluções de extrato de PMUP e, depois, 400 µL da solução de DNP foram transferidos para um tubo rosqueado, o qual foi fechado, agitado e submetido a aquecimento em banho-maria, a 50 °C, durante 50 minutos. Findo esse período, o tubo foi retirado do banho-maria para resfriar até a temperatura ambiente. Somou-se ao seu conteúdo 1,4 mL da solução de KOH, o que ocasionou o instantâneo escurecimento da mistura. Em seguida as alíquotas de 40 µL, 45 µL e 50 µL foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 mL, alcançando-se as concentrações de 4 µg/mL, 4,5 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente, após o seu preenchimento com etanol absoluto. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 3000 rpm, por cinco minutos. A seleção de três concentrações diferentes constituiu a triplicata do ensaio.

A absorbância do sobrenadante dos tubos foi aferida em espectrofotômetro UV-Vis, em λ de 486 nm. As absorbâncias foram inseridas na equação da reta $y =$

$0,2159 \cdot x - 0,1167$, a qual proporcionou concentrações equivalentes de pinocembrina ($\mu\text{g/mL}$). Utilizou-se, posteriormente, a relação entre essas concentrações e as concentrações de extrato a fim de obter a porcentagem de FD nas amostras, também equivalente de pinocembrina.

4.3.6 Capacidade de sequestro de radicais DPPH•

4.3.6.1 Determinação da capacidade de eliminação experimental (%CEE)

O ensaio de DPPH• foi realizado de acordo com a descrição de NASCIMENTO et al. (2018), para avaliar a %CEE do EHE em 12 meses. Nesse sentido, uma solução estoque de DPPH• a 0,1 mM foi preparada mediante a pesagem 4 mg do reagente e sua dissolução em 100 mL de etanol absoluto. Posteriormente, também foram preparadas soluções de extrato de PMUP referentes aos 12 meses de coleta, através da pesagem de 50 mg de EB e sua dissolução em 10 mL de etanol absoluto, alcançando-se a concentração de 5 mg/mL.

Em primeiro lugar, alíquotas de 5 μL , 10 μL , 25 μL , 40 μL , 50 μL , 75 μL e 100 μL das soluções de extrato foram transferidas para balões de 5 mL, com a finalidade de obter concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Depois, foram adicionados a eles 2 mL da solução estoque de DPPH•, e seu volume foi completado com etanol absoluto. Os balões foram, então, conservados ao abrigo da luz durante 30 minutos.

Concluído o tempo de reação, constatou-se que o DPPH• perdeu parte da sua coloração, e o conteúdo dos balões teve sua absorbância aferida em espectrofotômetro UV-Vis, em λ de 518 nm. Posteriormente, as absorbâncias foram inseridas na equação da %CEE, detalhada na figura 16, que estabelece a magnitude do sequestro de DPPH• a partir da quantidade consumida do radical.

Figura 16 – Equação da %CEE.

$$\% \text{ CEE} = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100] / A_{\text{controle}}$$

Fonte: OLIVEIRA, 2015.

4.3.6.2 Estimativa da concentração inibitória de 50% (CI₅₀)

Para calcular a CI_{50} , foram desenvolvidos diagramas de dispersão da %CEE em função da concentração dos EHEs, obtendo-se a equação das retas e seu R^2 . Em seguida, as equações foram utilizadas com a finalidade de quantificar a concentração (x) necessária para haver %CEE (y) de 50%.

4.4 Ensaio microbiológico

A atividade dos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021 contra as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 90028) foi avaliada no teste de microdiluição em caldo, desempenhado no Laboratório de Microbiologia Básica e Clínica, na Universidade Federal de Alagoas.

4.4.1 Preparo dos inóculos bacterianos

As cepas bacterianas foram adquiridas na forma liofilizada. Elas foram inoculadas em tubos de ensaio que continham caldo infusão de cérebro e coração (ICC) e, após isso, incubadas em estufa microbiológica durante 18–24 horas. Concluído esse período, a técnica de esgotamento foi utilizada para semear uma alíquota de cada inóculo em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (AMH). As placas foram, então, incubadas em estufa microbiológica por mais 18–24 horas, após o que foram produzidas suspensões dos inóculos em solução salina estéril (0,85%), a partir da seleção de colônias morfologicamente semelhantes que haviam crescido no AMH. Após agitação em vórtex, a concentração das suspensões foi ajustada de acordo com o padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland, proporcionando a concentração de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, as suspensões foram novamente agitadas em vórtex, depois, diluídas na proporção de 1:10, resultando na concentração de 10^7 UFC/mL. Isso visou à obtenção de concentrações de 5×10^5 UFC/mL depois que fossem inoculados 5 μ L de suspensão em cada poço de microplaca (CLSI, 2018).

4.4.2 Preparo do inóculo fúngico

Leveduras de *C. albicans* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose contido em placas de Petri, as quais foram subsequentemente incubadas a 35 ± 2 °C, por 18–48 horas. Após o cultivo, cinco colônias foram selecionadas e, em seguida,

adicionadas a 3 mL de caldo RPMI, para produzir uma suspensão que foi agitada em vórtex. A sua turbidez, que representa sua densidade celular, foi ajustada em conformidade com a escala 0,5 de McFarland, isto é, visualmente, atingindo a concentração de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Outra agitação em vórtex foi necessária, seguida de diluição na proporção de 1:50, o que modificou a concentração celular da suspensão para 2×10^4 UFC/mL. Tais etapas foram realizadas com o objetivo de alcançar a concentração de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL ao inocular 50 µL da suspensão em cada poço de microplaca (CLSI, 2017).

4.4.3 Preparo dos meios de cultura

O caldo Mueller-Hinton não suplementado (CMH) foi empregado para o ensaio contra bactérias, o caldo RPMI-1640 foi utilizado no teste contra *C. albicans*, de acordo com CLSI (2018) e CLSI (2017), respectivamente. Preparou-se o CMH conforme as recomendações do fabricante: foi autoclavado com calor úmido à temperatura de 121 °C, por 15 minutos, sob vapor constante. Foram pesados 10,4 g do pó do caldo RPMI-1640, os quais em seguida foram dissolvidos em 1 L de água estéril, em bquer que havia sido previamente autoclavado. Por fim, enquanto se transferia o caldo para outro bquer (estéril), ele era filtrado em membrana millipore de 0,22 µm. Todos os preparos e esterilizações dos meios de cultura foram realizados no momento da sua utilização.

4.4.4 Determinação da concentração inibitória mínima

O teste de microdiluição em caldo foi realizado segundo as diretrizes do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018), com a finalidade de gerar as CIMs dos 12 EHEs contra bactérias (M07-A10) e *C. albicans* (M27-A4). Utilizaram-se microplacas estéreis contendo 96 cavidades com fundo em formato de “U”, distribuídas em 12 colunas (1–12) e oito linhas (A–H). Para produzir soluções de extrato de PMUP a 2000 µg/mL, os EBs relativos a cada mês foram pesados e reconstituídos em DMSO a 2%.

O ensaio iniciou com a pipetagem de 100 µL de CMH ou RPMI-1640, conforme o microrganismo que se pretendia avaliar, em todas as cavidades das microplacas. Às colunas da linha A foram adicionados 100 µL das soluções de extrato de PMUP, em seguida, foi feita nos poços a diluição seriada dos extratos mediante a transferência de uma alíquota de 100 µL de cada poço da linha A para o poço B da

mesma coluna, homogeneizando-se a nova mistura. A transferência de igual volume e a homogeneização foram repetidas dos poços da linha B para os poços da linha C, consecutivamente, até a linha H, obtendo-se concentrações gradualmente menores. A linha A, por exemplo, continha concentração de 1000 µg/mL; a B, 500 µg/mL. A concentração diminuiu pela metade até que fossem atingidos 7,8125 µg/mL na linha H. O volume restante na pipeta foi descartado após todas as diluições. Foram transferidos 5 µL das suspensões bacterianas e 50 µL da suspensão de *C. albicans* para os poços.

Colunas designadas para cada tipo de controle: uma para o controle negativo (CMH ou RPMI-1640, DMSO a 2% e inóculo), outra para o controle de viabilidade dos microrganismos testados (CMH ou RPMI-1640 e inóculo) e uma terceira para o controle de esterilidade da placa (CMH ou RPMI-1640). O controle positivo consistiu no emprego de ciprofloxacino contra as bactérias, e de fluconazol contra a levedura.

As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica, a 35 ± 2 °C, durante 24 horas, período após o qual foi realizada a aferição do crescimento microbiano nas suas cavidades. Com esse propósito, foram adicionados a todas elas 20 µL de uma solução aquosa do revelador 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT) a 0,5%, o que tornou necessária outra incubação, dessa feita a 35 °C, por três horas. Enfim, aferiu-se o crescimento microbiano nos poços: a ausência de coloração azul significou sensibilidade do microrganismo a determinada concentração de extrato, enquanto a presença de coloração indicou resistência a ela. A CIM, pois, foi definida como a menor concentração de extrato ou fármaco (controle positivo) capaz de inibir o crescimento de microrganismos nos poços.

4.5 Coeficiente de correlação de Pearson (r)

Todos os cálculos estatísticos realizados para esta dissertação, assim como os gráficos e os dados que eles contêm, foram gerados no programa GraphPad Prism 9 ®. Cada valor médio está descrito $\pm$ o desvio padrão. Calculou-se coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os teores de compostos fenólicos totais, os teores de flavonoides totais, as CI_{50} do ensaio de DPPH• e as CIMs das cepas microbianas no teste de microdiluição em caldo. O teste da correlação de Pearson visa a determinar a associação linear entre duas variáveis quantitativas, avaliando a força com que a capacidade de sequestro de radicais DPPH• e a atividade bacteriostática dos EHEs

estão correlacionadas aos metabólitos totais quantificados. Foi este o critério para classificar as correlações: muito fraca (0–0,19), fraca (0,2–0,39), moderada (0,4–0,69), forte (0,7–0,89) e muito forte (0,9–1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspecto visual dos extratos

Soluções de extrato de PMUP a 1 mg/mL, referentes aos meses de setembro de 2020 a agosto de 2021, foram preparadas por meio da pesagem dos EBs e sua dissolução em etanol absoluto. As soluções manifestaram colorações variadas, com diferentes tonalidades entre o verde e o marrom (Figura 17). A inspeção visual demonstrou que a coloração das soluções não se deve exclusivamente às diferentes características dos diversos apiários onde a própolis foi produzida. O apiário Mata dos Frios, por exemplo, apresentou soluções de coloração esverdeada em setembro de 2020, outubro de 2020, janeiro de 2021 e junho de 2021. No entanto, em abril e maio de 2021, a coloração tendeu ao marrom.

Apenas a inspeção visual não permite que se conclua a causa da mudança de composição. A diferente coloração das soluções, que indica composição variável da PMUP (SILICI; KUTLUCA, 2005), é uma característica possivelmente devida a outros fatores. A disponibilidade de diferentes espécies vegetais em um mesmo apiário, ao longo dos meses, pode ter sido determinante para isso. Por outro lado, sazonalidade, altitude, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, composição atmosférica, ritmo circadiano, herbivoria, teor de água, nutrientes no solo, ataque de patógenos, temperatura e idade da planta podem também ter tido contribuição para a mudança no teor de metabólitos da PMUP (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Portanto, outros estudos químicos, que avaliem e correlacionem a coloração da PMUP, são necessários.

Figura 17 – Variação nas colorações dos EHEs de setembro de 2020 a julho de 2021, da esquerda para a direita.



Fonte: Autor, 2024.

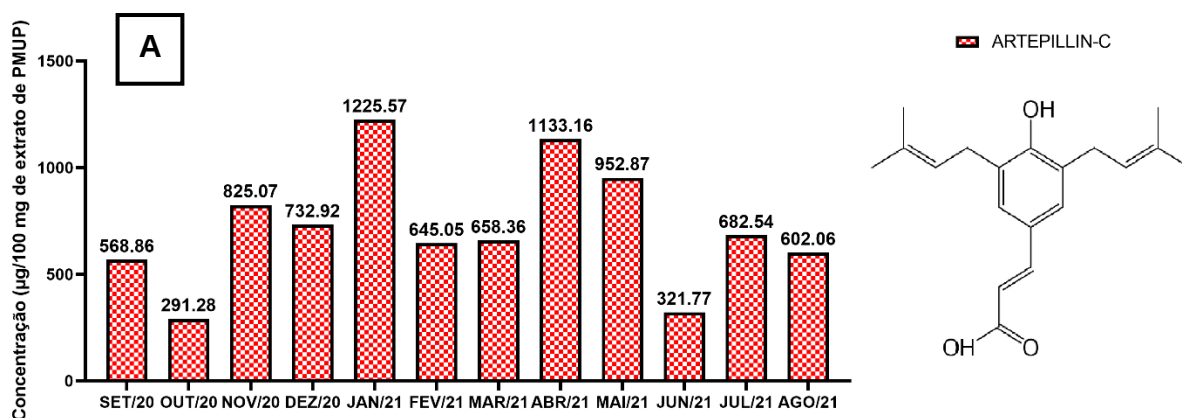
5.2 Ensaio químicos

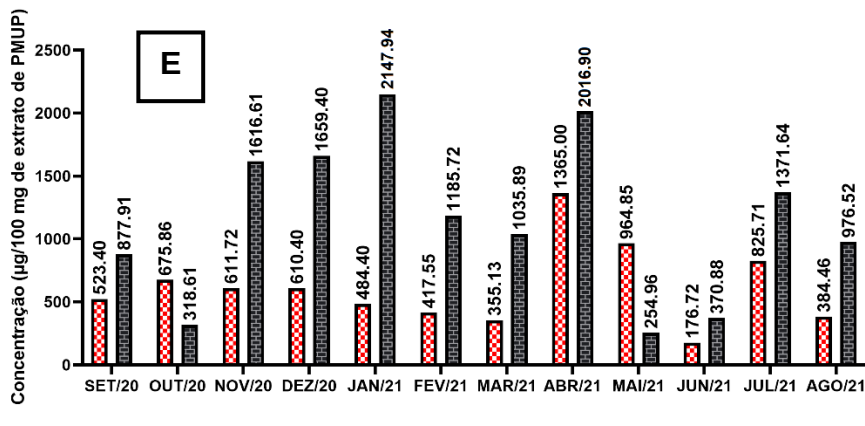
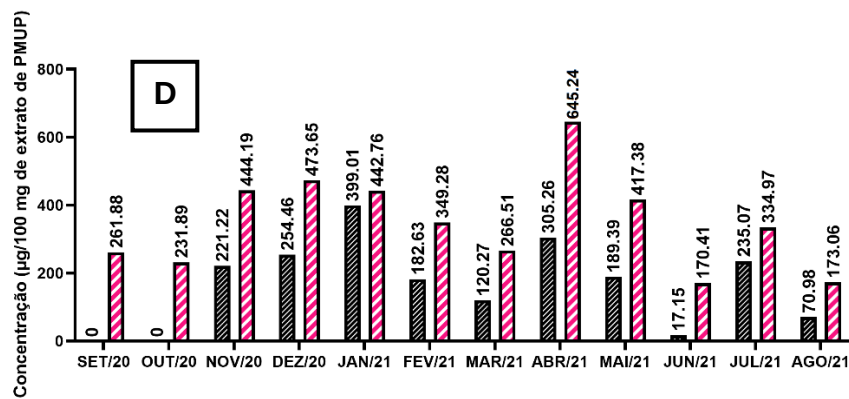
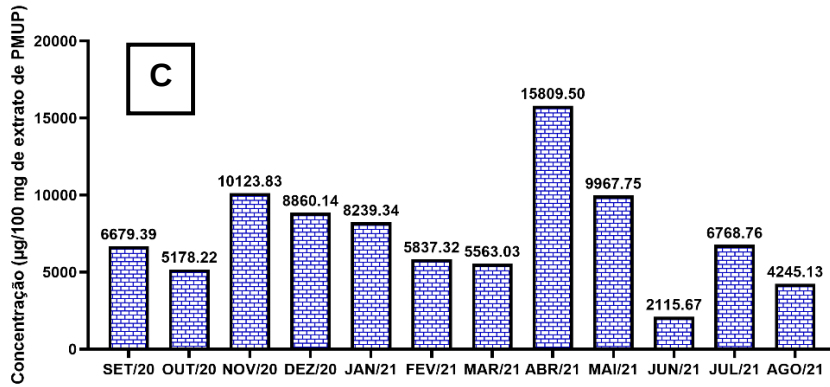
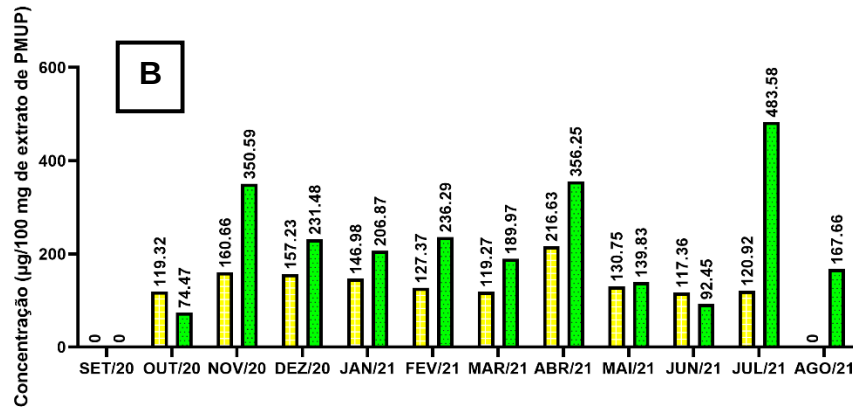
5.2.1 Quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD

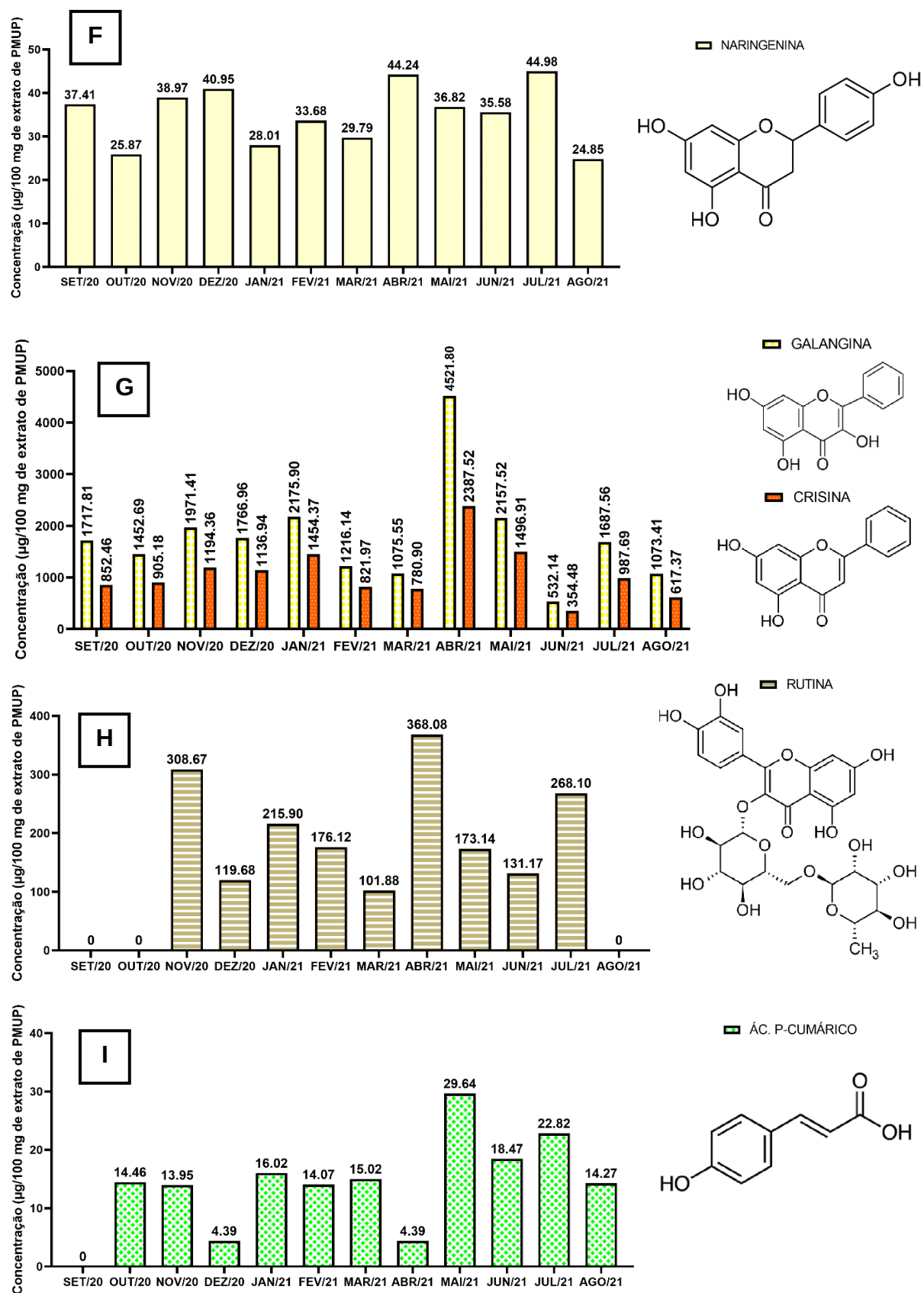
A análise dos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021, em CLAE-DAD, gerou 12 cromatogramas, que foram colocados no anexo 8 (A-L). Entretanto, convém destacar que alguns compostos, como resveratrol e cumarina, apesar de quantificados, não puderam ser visualizados muitos cromatogramas devido à concentração relativamente baixa que apresentaram.

Na etapa de quantificação dos marcadores químicos da PMUP, foram obtidas as concentrações expostas na figura 19 (A-I), que exibe também a estrutura química de cada composto. As substâncias analisadas pertencem à categoria dos ácidos hidroxicinâmicos (artepillin-C, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico), flavonóis (galangina, kaempferol, quercetina, pinobanksina e rutina), flavanonas (pinocembrina, pinostrobina e naringenina) e flavona (crisina). As concentrações foram ajustadas de forma que expressassem os microgramas de composto contidos em cada 100 mg de EB.

Figura 18 (A-I) – Quantificação de marcadores químicos da PMUP, por CLAE-DAD, de setembro de 2020 a agosto de 2021.







A: Concentrações da artepillin-C; **B:** Concentrações dos ácidos ferúlico e cafeico; **C:** Concentrações da pinocembrina; **D:** Concentrações da quercetina e do kaempferol; **E:** Concentrações da pinobanksin e pinostrobin; **F:** Concentrações da naringenina;

G: Concentrações da galangina e crisina; **H:** Concentrações da rutina; **I:** Concentrações do ácido p-cumárico.

Fonte: Autor, 2024.

Alguns padrões analíticos não foram determinados em quantidade suficiente para integrar o estudo de sazonalidade. A luteolina, por exemplo, foi uma flavona cuja concentração permaneceu baixíssima em comparação à dos demais compostos, e invariável todos os meses, exceto em novembro de 2020. Tal perfil sugere que as concentrações dessa substância são inferiores ao limite de quantificação da técnica, o qual não foi avaliado, visto que a validação do método será realizada posteriormente. As concentrações de catequina, ácido 2-cumárico, resveratrol, cumarina e liquiritigenina também foram muito baixas, surgindo apenas em poucos meses. Isso impossibilitou que se avaliasse a variação sazonal da concentração desses compostos.

Todos os gráficos convergem para a detecção de dois períodos de quatro meses em que a concentração de biomarcadores foi alta: o primeiro compreendeu de outubro de 2020 a janeiro de 2021; o segundo, de abril a julho de 2021. Contudo, alguns desses meses requerem interpretação minuciosa e alguma menção. Nesse sentido, o mês de junho de 2021 diferiu não somente dos demais meses do seu ciclo, mas também de modo geral, apresentando por vezes as concentrações mais baixas do estudo. Isso ocorreu com galangina (Figura 18-G), kaempferol (Figura 18-D), pinocembrina (Figura 18-C) e crisina (Figura 18-G). O mês de outubro de 2020 foi aquele em que houve semelhante resultado, com relação ao seu ciclo, isto é, teores relativamente baixos.

A quantidade de rutina, quercetina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido cafeico foi nula no mês de setembro de 2020, o que indica ter sido esse um mês em que a qualidade da PMUP foi reduzida. Outros meses nos quais houve ausência total de certos marcadores químicos foram outubro de 2020, para rutina e quercetina, e agosto de 2021, exclusivamente para a rutina. Em contrapartida, os meses de janeiro (primeiro ciclo) e abril (segundo ciclo) de 2021 tiveram o maior nível de todos os compostos, com apenas poucas exceções.

A pinocembrina, uma flavanona, destaca-se como a substância de teor mais elevado nos EHEs, pois atingiu a concentração de 15,80% em abril de 2021. O teor

médio de pinocembrina foi $7449,00 \pm 3379,93 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ ou $74,49 \pm 32,47 \text{ mg/g}$, notavelmente maior que o teor do flavonoide na própolis marrom de Marechal Deodoro, $1,66 \text{ mg/g}$ de extrato (ANDRADE et al., 2017). Embora a coloração das amostras não tenha sido relatada, a pinocembrina também foi quantificada no EH da própolis de outras regiões brasileiras, com concentrações de $7,3 \text{ mg/g}$ e $16,8 \text{ mg/g}$ em amostras do Rio Grande do Sul, $12,6 \text{ mg/g}$ em uma amostra do Paraná, $0,4 \text{ mg/g}$ em uma amostra de São Paulo, $9,2 \text{ mg/g}$ e $19,6 \text{ mg/g}$ em amostras de Minas Gerais, $1,6 \text{ mg/g}$ em uma amostra de Goiás, e $9,6 \text{ mg/g}$ em uma amostra do Mato Grosso do Sul (PARK et al., 1998).

A pinocembrina também está entre os marcadores químicos da PVA, para os quais um método de quantificação já foi desenvolvido (LÓPEZ, 2017), e compõe outras variedades própolis vermelha, como as provenientes de Sergipe e Cuba (LÓPEZ et al., 2014). A pinocembrina foi identificada tanto no extrato metanólico quanto no extrato obtido com acetato de etila da própolis de Santa Catarina (FERNANDES-SILVA, 2013).

Teores significativos de mais de 10% pinocembrina foram encontrados em própolis do Paraná, cujas amostras se encontravam em uma região com flora exótica, rica em *Populus* sp. (álamo). A análise da planta revelou que seus brotos são os principais produtores da flavanona para a própolis. Sugeriu-se, pois, que a pinocembrina fosse o biomarcador dessa variedade de própolis (ADELMANN et al., 2007).

Há a hipótese, portanto, de que a PMUP tenha atividades biológicas ocasionadas pela ação da pinocembrina, que possui as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, antifibrótica e neuroprotetora (ELBATREEK et al., 2023). Outras propriedades abrangem o tratamento ou prevenção de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais isquêmicos (RASUL et al., 2013). A pinocembrina também inibe as glicosiltransferases do microrganismo cariogênico *Streptococcus mutans* (PARK et al., 1998). A pinocembrina foi a flavanona mais ativa contra *S. mutans*, inibindo-a em $64 \mu\text{g/mL}$ (KOO et al., 2002).

A pinocembrina tem a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (YANG et al., 2012), e sua biodisponibilidade em ratos corresponde a 43% e 58%, para os isômeros S-pinocembrina e R-pinocembrina, respectivamente (SAYRE et al., 2015). Em um modelo de colite ulcerativa, em ratos, a administração de doses baixas

de pinocembrina por uma semana diminuiu a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β e IL-6, citocinas inflamatórias, além de elevar o nível de fator de crescimento transformador (TGF)- β , citocina que promoveu o reparo da mucosa intestinal (HU et al., 2019). A doença de Alzheimer, por exemplo, ativa uma série de processos inflamatórios, os quais a pinocembrina é capaz de inibir, tal como na cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (LIU et al., 2014).

Em células endoteliais microvasculares de cérebro humano, a flavanona, através da inibição das vias inflamatórias MAPK/NF- κ B, teve efeito protetor contra citotoxicidade induzida por β -amilóide (LIU et al., 2014). Além disso, a administração de pinocembrina protege o cérebro contra danos causados por isquemia ou reperfusão focal em ratos, uma vez que as ações antioxidante e antiapoptótica, tais como inibição da síntese de óxido nítrico (ON), inibição da produção excessiva de EROs, estímulo à produção de GSH-px, atividade sequestradora e redução da expressão de caspase-3 aumentam a viabilidade neuronal (LIU et al., 2008).

A pinostrobina tem, como a pinocembrina, as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, antifibrótica e neuroprotetora, e também é hipolipemiante, redutora do ácido úrico, cicatrizante e protetora de múltiplos órgãos, com tropismo tanto pelo fígado quanto pelo trato gastrointestinal (WANG et al., 2023). Tanto a pinostrobina quanto a pinocembrina, apesar de serem ocasionalmente relatadas na composição de amostras brasileiras de própolis, são mais frequentemente encontrados em Regiões Temperadas do Hemisfério Norte e Hemisfério Sul (REIDEL, 2014). Acredita-se que a hidroxila no carbono 7 da pinocembrina, em contraste à metoxila que a pinostrobina possui nesse átomo, é responsável pela sua atividade antimicrobiana, verificada por exemplo contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (CIMS = 125 μ g/mL) (RAMIREZ et al., 2013).

Compostos que, embora em quantidades significativamente menores que as da pinocembrina, mostraram teores relativamente altos incluem artepillin-C, pinobanksina, pinostrobina, galangina e crisina. A concentração média dos compostos quantificados nos EHEs, expressa em microgramas contidos em 100 mg de EB, está exibida na tabela 6.

Tabela 6 – Concentração média dos compostos quantificados por CLAE-DAD, em EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.

Composto químico	Concentração média ($\mu\text{g}/100 \text{ mg de EB}$)
Ácido p-cumárico	$13,95 \pm 7,79$
Naringenina	$35,09 \pm 6,51$
Ácido ferúlico	$118,03 \pm 59,18$
Rutina	$155,22 \pm 116,54$
Quercetina	$166,28 \pm 121,97$
Ácido cafeico	$210,78 \pm 129,28$
Kaempferol	$350,93 \pm 134,45$
Pinobanksin	$616,26 \pm 304,16$
Artepillin-C	$719,95 \pm 271,06$
Crisina	$1082,51 \pm 502,25$
Pinostrobina	$1152,74 \pm 611,78$
Galangina	$1779,07 \pm 950,60$
Pinocembrina	$7449,00 \pm 3379,93$

Fonte: Autor, 2024.

Nesta pesquisa, o teor médio de artepillin-C foi $4,31 \pm 1,62 \mu\text{g/mL}$, e o teor médio de ácido p-cumárico foi $0,08 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$, ou $0,13 \pm 0,07 \text{ mg/g}$. A título de comparação com outras própolis marrons, a análise do extrato obtido com fluido supercrítico (EFSC) da própolis marrom de Santa Catarina revelou concentração de $5,05 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ de ácido p-cumárico, e $106,81 \pm 1,08 \mu\text{g/mL}$ de artepillin-C, valores expressivamente acima da PMUP (MACHADO et al., 2016a). A própolis marrom do Paraná também manteve teores mais altos que a PMUP, com $82,67 \pm 6,12 \mu\text{g/mL}$ de artepillin-C no extrato etanólico, enquanto a extração por fluido supercrítico reteve $315,96 \pm 5,89 \mu\text{g/mL}$ desse ácido hidroxicinâmico (MACHADO et al., 2016a).

A aferição do teor de marcadores, no extrato etanólico da própolis marrom de Santa Catarina, resultou em $2,48 \pm 0,07 \text{ mg/g}$ de ácido p-cumárico, nenhuma quantidade de quercetina e $1,78 \pm 0,12 \text{ mg/g}$ de artepillin-C (MACHADO et al., 2019). O extrato hidroetanólico da própolis marrom do município alagoano de Marechal Deodoro apresentou $3,72 \text{ mg/g}$ de artepillin-C e $2,64 \text{ mg/g}$ de ácido p-cumárico (ANDRADE et al., 2017).

As concentrações de artepillin-C e ácido p-cumárico nos extratos de outras própolis marrons brasileiras são, em geral, mais altas que a média quantificada na PMUP. A literatura científica brasileira carece de mais estudos de sazonalidade das própolis marrons, que se disponíveis permitiriam comparações mais informativas.

Dentre os compostos quantificados, os possíveis biomarcadores, em razão da sua bioatividade e de manifestarem alta concentração durante os 12 meses, são a pinocembrina, galangina, pinostrobin e crisina. Embora a definição categórica de marcadores químicos em própolis exija um maior número de análises químicas e biológicas complexas, tais substâncias demonstram como a PMUP é um tipo promissor de própolis, e ressaltam a importância da continuidade de pesquisas com essa matriz.

Os compostos elucidados neste trabalho se assemelham ao perfil químico da própolis verde brasileira, que possui ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, naringenina, kaempferol, isorhamnetina, sakurametina, pinocembrina, kaempferide e artepillin-C como compostos majoritários (SZLISZKA et al., 2013). Também há semelhança com a própolis verde da África do Sul, em que foram identificados ácido cafeico, ácido p-cumárico, artepillin-C, galangina, pinocembrina e pinobanksin, e com a própolis verde chinesa, na qual ácido cafeico, ácido para-cumárico, ácido ferúlico, pinobanksin, naringenina, kaempferol, pinocembrina e galangina foram detectados (SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

Entre outros fatores, a variação do teor de substâncias bioativas em própolis está associada à pluviosidade na região do apiário, que em altas taxas reduz a concentração de ceras e aumenta o teor de resinas (SILVA et al., 2008). Biomarcadores foram encontrados em maior teor, na PVA, na época de chuvas (BUENO-SILVA et al., 2017). Posteriormente, no estudo de sazonalidade de NASCIMENTO et al. (2019), a concentração de marcadores flavonoídicos da PVA foi elevada pelo período de intensas chuvas e maior umidade relativa do ar.

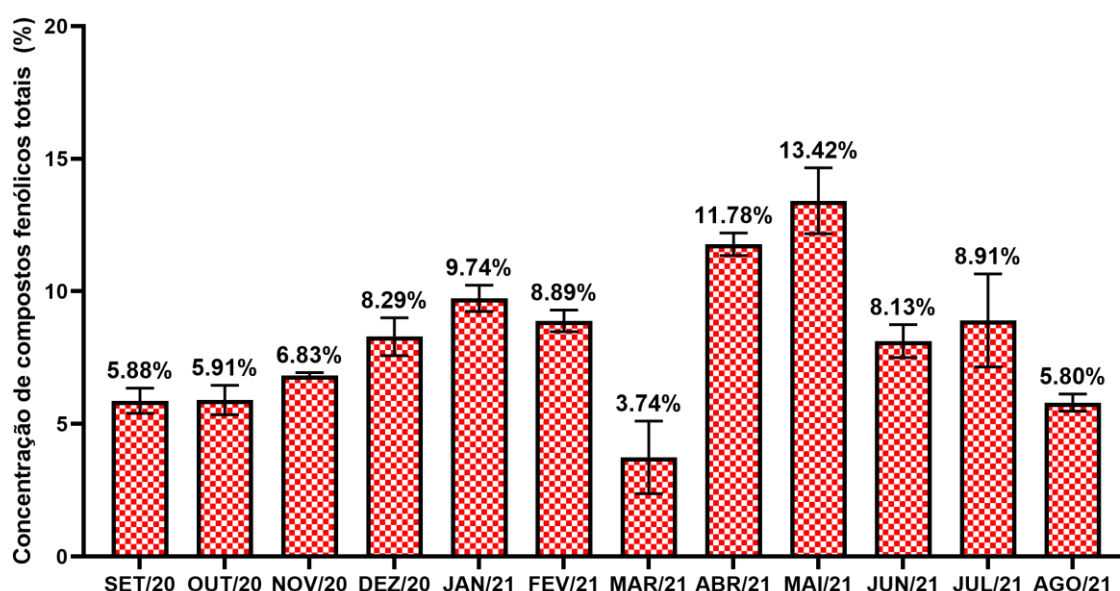
A correlação entre fatores climáticos e a composição química da PMUP será o tema de futuras investigações do nosso grupo de pesquisa. Elas incluirão um estudo mais detalhado para explorar as correlações de modo abrangente. Esperamos que os esforços adicionais nos permitam identificar padrões e compreender como a sazonalidade e as condições climáticas influenciam a composição e as propriedades

da PMUP. Essas informações serão valiosas não apenas para o desenvolvimento de estratégias de manejo e produção mais eficazes.

5.2.2 Teor de compostos fenólicos totais

A quantificação de CFT nos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021 está expressa na figura 19, que especifica a concentração percentual, equivalente de ácido gálico, observada em cada mês do estudo, com seu respectivo desvio padrão.

Figura 19 – Concentração percentual de compostos fenólicos totais nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.



Fonte: Autor, 2024.

Como na análise cromatográfica, também se verificou variação bimodal na concentração de CFT dos EHEs, ou seja, houve dois ciclos em que o teor desses metabólitos foi mais alto. No entanto, neste ensaio, eles abrangeram os meses de novembro de 2020 a fevereiro de 2021, no primeiro ciclo, e de abril a julho de 2021, no segundo ciclo.

Diferentemente do que se observou para pinocembrina (Figura 18-C), kaempferol (18-D), pinobanksin (Figura 18-E) e crisina (Figura 18-G), o mês de junho não apresentou a menor concentração de CFT do estudo, o que sugere haver outros

compostos fenólicos, não quantificados no ensaio cromatográfico, contribuindo expressivamente para essa elevação. A menor concentração foi verificada em março de 2021, mês que separa os dois ciclos, de modo que os EHEs sustentaram teores de CFT relativamente altos durante vários meses consecutivos.

O mês de abril de 2021, embora não tenha tido o melhor desempenho entre todos os meses, apresentou teor de CFT que corroborou a concentração de todos compostos quantificados em CLAE-DAD (Figura 18 A-H), exceto o ácido p-cumárico. A alta ocorreu em maio de 2021, com 13,42%, mês com a maior quantidade de CFT de toda a investigação. Em fevereiro de 2021, do mesmo modo, o teor de CFT se elevou, inserindo esse mês no primeiro ciclo. Convém, ainda, notar que a queda de concentração de agosto de 2021, que se estende até outubro, representa um retorno ao período de baixas concentrações.

A maior concentração CFT do primeiro ciclo foi 9,74% (janeiro de 2021); a média, $8,43 \pm 1,06\%$. A maior concentração CFT do segundo ciclo foi 13,42% (maio de 2021); a média, $10,56 \pm 2,13\%$. O teor médio de CFT, considerando todos os meses pesquisados, foi $8,11 \pm 2,60\%$, ou $81,1 \pm 26,05$ mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de EB. A legislação brasileira exige, para o controle de qualidade da própolis, que esta contenha no mínimo 0,50% de CFT, critério atendido por todos os EHEs (BRASIL, 2001).

Para efeito de comparação, o extrato de própolis marrom do Paraná apresentou CFT de $45,84 \pm 0,82$ mg EAG/g; o extrato de própolis marrom de Minas Gerais, $41,51 \pm 1,46$ mg EAG/g; o extrato de própolis marrom de Sergipe, $17,51 \pm 0,14$ mg EAG/g; e o extrato de própolis marrom da Bahia, $6,12 \pm 0,34$ mg EAG/g (OLEGÁRIO et al., 2019). Em um EE de própolis marrom brasileira, foram quantificados $48,24 \pm 1,09$ mg EAG/g de CFT (BITTENCOURT et al., 2015). Em EHs de própolis marrom do Paraná, foram determinados 8,9 mg EAG/g e 98,8 mg EAG/g (SOUSA et al., 2019). Em outra publicação, os EHs da própolis marrom do Paraná tiveram de 2% a 11% de CFT; os EHs de própolis marrom de Minas Gerais, de 8% a 19%; os EHs de própolis marrom do Rio Grande do Sul, de 2% (COELHO et al., 2017). Além disso, no extrato da própolis marrom de Marechal Deodoro, o teor foi de $55,74 \pm 0,48$ mg EAG/g (ANDRADE et al., 2017). Os 12 EHEs, portanto, demonstram o alto teor de CFT da PMUP em relação a outras própolis marrons do Brasil.

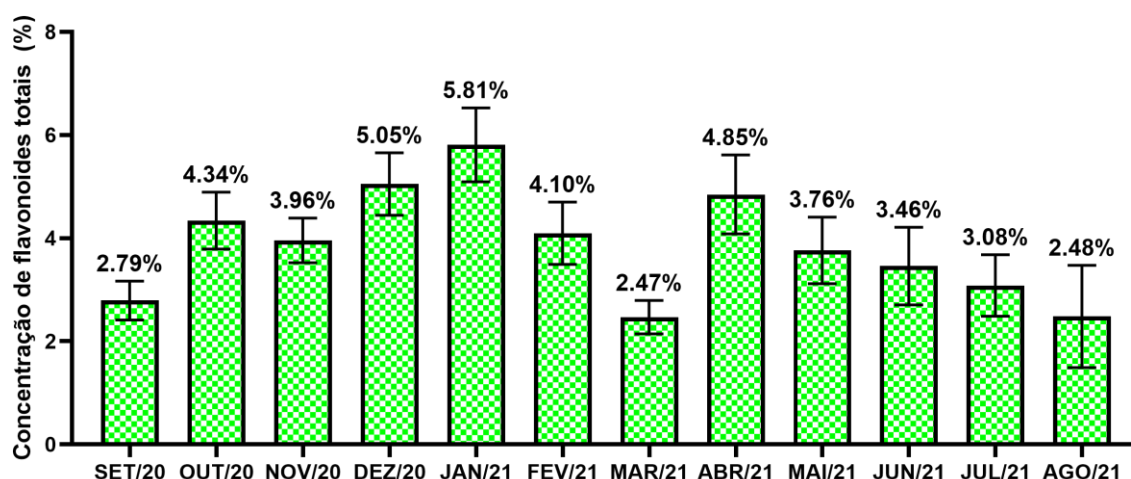
Os compostos fenólicos são fundamentais para as atividades biológicas da própolis (ANDRADE et al., 2017). Eles, que compreendem flavonoides e ácidos fenólicos, realizam significativa atividade antioxidante (SOARES, 2002). Há correlação positiva entre o teor de CFT e a atividade antioxidante de própolis (BITTENCOURT et al., 2015). Os EHEs demonstraram altos níveis desses compostos.

Na própolis vermelha de Pernambuco, observa-se um aumento nos níveis de ácidos diterpênicos em resposta à diminuição dos ácidos fenólicos (NUNES et al., 2009). A concentração de CFT da própolis mexicana é reduzida nas estações da primavera e do inverno, mas se eleva durante o verão e o outono (VALENCIA et al., 2012). Quanto à PVB, seus CFT apresentam teor inversamente proporcional ao de triterpenos, modificando as características organolépticas do apicêutico ao longo do ano (TEIXEIRA et al., 2010).

5.2.3 Teor de flavonoides totais

A determinação quantitativa de FT nos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021 está detalhada na figura 20, que expõe a concentração percentual, equivalente de quercetina, observada em cada mês, com seu respectivo desvio padrão.

Figura 20 – Concentração percentual de flavonoides totais nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.



Fonte: Autor, 2024.

O teor de FT dos EHEs, nos 12 meses, confirmou os resultados anteriores, apresentando dois ciclos de altas concentrações. Devem, todavia, ser ressaltadas algumas observações. Neste ensaio, o primeiro ciclo abrangeu cinco meses, de outubro de 2020 a fevereiro de 2021, enquanto o segundo ciclo compreendeu de abril a julho de 2021. O mês de outubro de 2020 havia revelado menor concentração de CFT que novembro de 2020; com relação ao teor de flavonoides totais, o contrário aconteceu, de forma que outros compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, por exemplo, podem ter contribuído para a elevação em novembro de 2020. Isso se repetiu entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, entre abril e maio de 2021 e entre junho e julho de 2021.

Março de 2021 continuou o mês com menor quantidade relativa de metabólitos, apresentando $24,68 \pm 2,66$ mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de EB, resultado próximo do que se obteve em agosto daquele ano. A maior concentração de flavonoides totais do estudo, bem como do primeiro ciclo, ocorreu em janeiro de 2021, mês no qual foram quantificados $58,09 \pm 5,85$ mg EQ/g. O teor médio de flavonoides totais no primeiro ciclo foi $46,50 \pm 6,91$ mg EQ/g; no segundo ciclo, $37,87 \pm 6,58$ mg EQ/g, com concentração máxima de $48,48 \pm 6,24$ mg EQ/g em abril de 2021. Após segundo pico, em abril de 2021, constatou-se o decaimento gradativo do teor de flavonoides até julho do mesmo ano. Em todo o primeiro ciclo, em contrapartida, houve variações que mantiveram as concentrações relativamente altas, aproximando-se mais ou menos do resultado de janeiro de 2021.

A concentração média de flavonoides totais nos 12 meses consistiu em $38,45 \pm 10,10$ mg EQ/g, ou $3,84 \pm 1,01\%$. Comparativamente, o EH da própolis marrom de Santa Catarina apresentou $27,97 \pm 0,01$ mg EQ/g, o EFSC, $31,38 \pm 0,01$ mg EQ/g. O EH da própolis marrom do Rio Grande do Sul conteve $27,72 \pm 0,01$ mg EQ/g, ao passo que foram aferidos, no EFSC, $29,72 \pm 0,01$ EQ/g. Determinaram-se $24,40 \pm 0,01$ mg EQ/g no EH de própolis marrom do Paraná; no EFSC, $11,55 \pm 0,01$ mg EQ/g (MACHADO et al., 2016a). Outro estudo com o EH de própolis marrom do Paraná encontrou concentrações de 35,0 EQ/g e 63,8 EQ/g de FT (SOUSA et al., 2019). Os EHs de própolis verde do Paraná mostraram FT que variaram de 10 a 26 EQ/g (COTTICA et al., 2011). A própolis marrom de Marechal Deodoro demonstrou concentração de $30,89 \pm 0,20$ mg EQ/g (ANDRADE et al., 2017). Logo, os resultados obtidos para a PMUP, no ensaio de FT, revelam teores próximos de outras própolis

marrons produzidas em território nacional. Além disso, a concentração mínima de 0,25% (m/m) de FT requerida pela legislação brasileira foi alcançada na PMUP (BRASIL, 2001), demonstrando a sua qualidade.

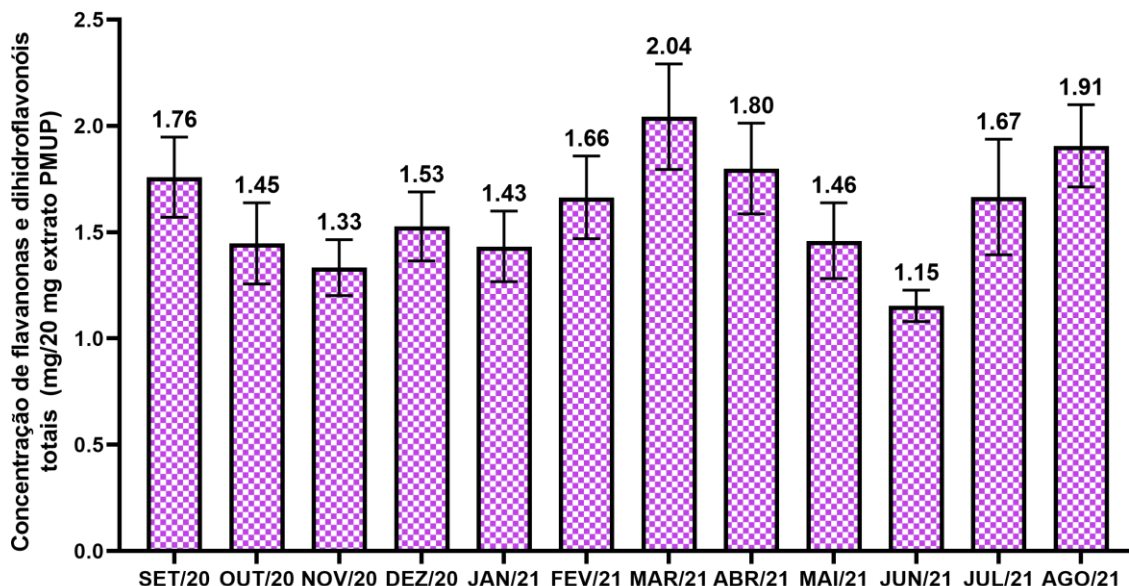
Os flavonoides constituem uma das categorias de compostos biologicamente ativos mais importantes da própolis (CUI-PING; FU-LIANG, 2009). É o grupo de metabólitos secundários cujo teor geralmente se apresenta mais alto no apicêutico. Eles detêm, a título de exemplo, atividade antibacteriana, antiviral, antioxidante, antitumoral e cardioprotetora, que têm promovido a aplicação da própolis como aditivo alimentar, conservante, suplemento de saúde e estimulante imunológico (CUI et al., 2022).

O teor de FT na própolis mexicana diminui durante as estações da primavera e do inverno, mas aumenta durante o verão e o outono (VALENCIA et al., 2012). Um estudo de sazonalidade do nosso grupo de pesquisa indica que períodos caracterizados por baixa umidade relativa do ar submetem as fontes vegetais da PVA a estresse; conseqüentemente, elas ativam mecanismos de defesa que aumentam a produção de metabólitos secundários derivados da via do acetato-malonato e do ácido chiquímico, tais como flavonoides e benzofenonas isopreniladas (NASCIMENTO et al., 2019).

5.2.4 Teor de flavanonas e dihidroflavonóis

A quantificação de FD nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021, está apresentada na figura 21. As concentrações estão expressas em miligramas EP/20 mg de EB, acompanhadas do seu respectivo desvio padrão.

Figura 21 – Concentração de flavanonas e dihidroflavonóis nos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados do ensaio de FD mostram haver uma relação inversamente proporcional entre a concentração desses compostos e a dos demais metabólitos avaliados nesta pesquisa. O período que integra os dois ciclos de maiores teores, verificados nos ensaios anteriores, é marcado pelas concentrações mais baixas de FD. Inversamente, setembro de 2020, março e agosto de 2021 foram meses em que houve a maior concentração dessas subclasses de flavonoides. Mesmo a pinocembrina, flavanona majoritária da PMUP, demonstrou concentração em conformidade com os ensaios de CFT e FT, distanciando-se do perfil de FD, nos 12 meses desta investigação.

O mês com maior teor de FD foi março de 2021, com $2,04 \pm 0,20$ mg EP/20 mg, ainda que seja o mês no qual se verificou o nível mais baixo de CFT e FT. O desempenho mais baixo, $1,15 \pm 0,06$ mg EP/20 mg, foi obtido em junho de 2021, mês que compõe o segundo ciclo de máximo teor nos ensaios anteriores. Fevereiro, março e abril de 2021 constituem um ciclo de alta concentração de FD, cujo teor médio foi $1,83 \pm 0,15$ mg EP/20 mg.

A concentração média dos 12 meses foi $1,59 \pm 0,24$ mg EP/20 mg, ou $7,95 \pm 1,2\%$. Para efeito de comparação, há o relato da concentração de $95,0 \mu\text{g/mL}$ de FD na própolis marrom de Santa Catarina, coletada no outono de 2010, valor acima do observado na PMUP (MENEHELLI et al., 2013). Em contrapartida, a média de FD nos extratos de PMUP foi maior que a verificada em outras publicações: os EHs de própolis marrom de Minas Gerais apresentaram de 3,3% a 5,0% de FD; os EHs de própolis marrom do Paraná, de 0,7% a 5,8%; o EH de própolis marrom de Santa Catarina, 5,1%; e os EHs de própolis marrom do Rio Grande do Sul, de 3,2% a 3,8% (COELHO et al., 2017).

Autores afirmam que a soma dos resultados do ensaio de FD com os resultados do ensaio de flavonas e flavonóis representa a concentração FT na própolis (MĂRGHITAŞ et al., 2007). No entanto, deve haver cuidado quanto à informação que tais técnicas colorimétricas geram, porque quando utilizado em tipos diferentes de própolis, o mesmo ensaio químico pode referir-se ora às flavonas e flavonóis totais, ora aos flavonoides totais (BANKOVA et al., 2019), impossibilitando que se efetue aquela soma.

As flavanonas são as substâncias polifenólicas majoritárias das plantas do gênero *Citrus*, como laranjas, tangerinas, tangores, toranjas e tangelos (KHAN et al., 2014). São compostos quase que exclusivos de frutas de plantas desse gênero, incluindo o limão, conferindo a elas e a seus sucos o sabor amargo (SHEN et al., 2022). Essa informação, juntamente com outras fornecidas pelos apicultores locais, pode orientar novas pesquisas acerca da origem botânica da PMUP.

Uma análise comparativa entre o perfil químico do extrato de PMUP e o perfil químico do extrato de espécies vegetais disponíveis nos apiários onde ela é produzida poderá solucionar a questão da origem botânica. Esse é um trabalho em desenvolvimento, que em breve será publicado pelo nosso grupo de pesquisa.

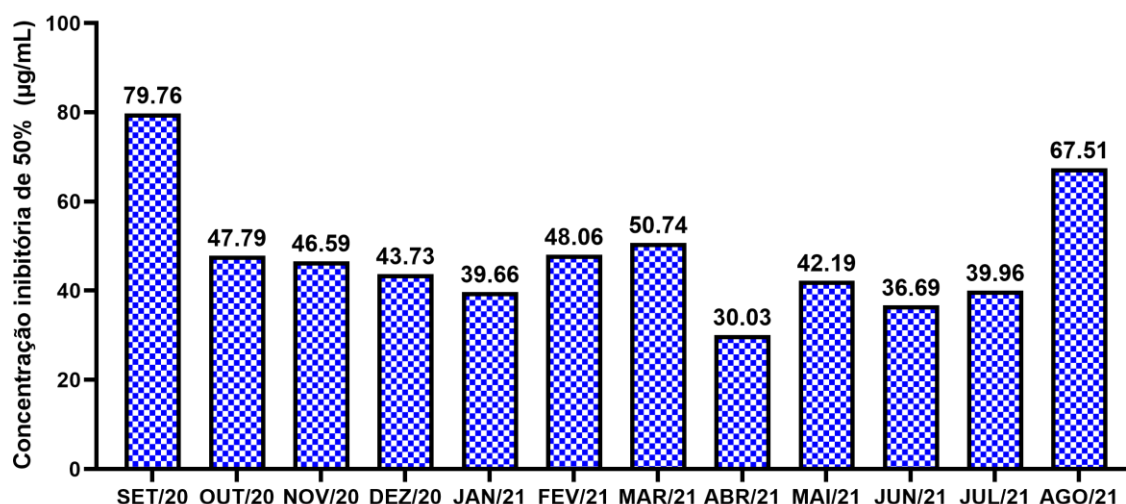
Entre os efeitos biológicos das flavanonas estão a inibição da proliferação celular e da angiogênese, redução do colesterol e dos triglicerídeos, eliminação dos radicais livres, atividade estrogênica, modulação do nível de ON e diminuição da agregação plaquetária e imobilização de linfócitos (BARRECA et al., 2017). A naringenina, por exemplo, flavanona encontrada na PMUP, tem propriedade antioxidante, sequestradora de radicais livres, inibidora da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos induzidos por lipopolissacarídeo, e redutora da produção

de nitrato e nitrito (KARIM et al., 2018). Essa é uma gama abrangente de bioatividades, com significativo potencial de prevenir doenças crônicas. o que confere valor à PMUP.

5.2.5 Capacidade de sequestro de radicais DPPH•

Com resultados do ensaio da capacidade de sequestro de radicais DPPH•, foi elaborado o gráfico que está exposto na figura 22. Ele relata a CI_{50} dos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021, que foi observada em cada mês. Quanto menor a CI_{50} , tanto maior será a atividade antioxidante do extrato, de modo inversamente proporcional aos teores de metabólitos elucidados nos ensaios anteriores.

Figura 22 – CI_{50} dos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021.



Fonte: Autor, 2024.

Novamente ocorreram dois períodos de melhor desempenho. Houve dois ciclos de maior capacidade de sequestro de radicais DPPH•, o primeiro de outubro de 2020 a janeiro de 2021, o segundo de abril a julho de 2021. Ambos compreenderam quatro meses, totalizando oito meses em que a PMUP pode manifestar o efeito antioxidante expressivo.

A melhor CI_{50} do primeiro ciclo, que também foi a segunda menor CI_{50} de todo o estudo, aconteceu em janeiro de 2021, caracterizada por 39,66 µg/mL. Isso corrobora os resultados dos demais ensaios, nos quais janeiro de 2021 foi o mês do

primeiro ciclo que evidenciou as mais altas concentrações de compostos como artepillin-C (Figura 18-A), quercetina (Figura 18-D) e pinostrobin (Figura 18-E).

A CI_{50} média do primeiro ciclo foi $44,44 \pm 3,13 \mu\text{g/mL}$. O segundo ciclo, que apresentou CI_{50} média de $37,21 \pm 4,58 \mu\text{g/mL}$, teve abril de 2021 como o mês de menor CI_{50} , em conformidade com os ensaios de FT e CFT. Além disso, corroborou o ensaio de CLAE-DAD, em que abril de 2021 demonstrou a segunda maior concentração de artepillin-C (Figura 18-A), ácido cafeico (Figura 18-B), quercetina (Figura 18-D), pinostrobin (Figura 18-E) e naringenina (Figura 18-F). Os compostos ácido ferúlico (Figura 18-B), pinocembrina (Figura 18-C), kaempferol (Figura 18-D), pinobanksin (Figura 18-E), galangina (Figura 18-G), crisina (Figura 18-G) e rutina (Figura 18-H) apresentaram o maior teor nesse mês. Portanto, janeiro e abril de 2021 constituíram os meses de mais alta atividade antioxidante dos EHEs.

O fim do segundo ciclo representa um retorno às CI_{50} mais altas, as quais podem ser encontradas em agosto de 2021 e setembro de 2020. Ambas foram as maiores do estudo, até mesmo quando comparadas a fevereiro e março de 2021. A CI_{50} média dos EHEs, nos 12 meses, consistiu em $47,72 \pm 13,02 \mu\text{g/mL}$. Nesse sentido, é menor que os CI_{50} apresentados pelo extrato etanólico ($60,53 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$), pela fração hexânica ($60,37 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$) e pela fração obtida com diclorometano ($31,72 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$) de outra própolis marrom brasileira, cujo estado de origem não foi descrito (BITTENCOURT et al., 2015). De uma amostra de própolis marrom coletada no Mato Grosso do Sul foram preparados extrato hexânico, extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração *n*-butanol, que tiveram CI_{50} de $>1000 \mu\text{g/mL}$, $532,2 \mu\text{g/mL}$, $>1000 \mu\text{g/mL}$, $109,3 \mu\text{g/mL}$ e $38,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A PMUP, pois, teve CI_{50} mais baixos exceto na fração *n*-butanol, cuja CI_{50} foi próxima (FERNANDES et al., 2014). Em Santa Catarina, o EE da própolis marrom apresentou CI_{50} de $163,00 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$, e o EFSC, $331,88 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$. A própolis marrom do Rio Grande do Sul demonstrou CI_{50} de $273,46 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$, em seu EE, enquanto que o EFSC apresentou CI_{50} de $306,91 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$. No Paraná, foi registrado CI_{50} de $164,52 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ no EE de própolis marrom, bem como $373,53 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ no EFSC (MACHADO et al., 2016a). A PMUP tem mostrado atividade antioxidante promissora, maior que a de outras variedades brasileiras de própolis marrom.

MELO et al. (2010) propuseram uma classificação para as CI_{50} segundo a qual extratos brutos vegetais, avaliados no mesmo ensaio de sequestro de radicais DPPH•, possuem atividade antioxidante boa quando sua CI_{50} é $<65 \mu\text{g/mL}$, moderada quando sua CI_{50} $<152 \mu\text{g/mL}$ e baixa quando sua CI_{50} $>152 \mu\text{g/mL}$. Desse modo, apesar de haver breves períodos em que a atividade antioxidante é moderada (setembro de 2020 e agosto de 2021), tanto a CI_{50} média dos EHEs quanto a CI_{50} em 10 meses caracterizaram boa atividade antioxidante.

Quando plantas superiores têm de desenvolver-se sob condições de estresse, que aumentam o nível de EROs nas suas células, um dos seus mecanismos de defesa consiste em elevar o teor de compostos antioxidantes, a fim de corrigir o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, contendo os danos às moléculas, células e tecidos vegetais (BULBOVAS et al., 2005; LÓPEZ-ORENES et al., 2017).

O estresse oxidativo, que pode ocorrer por meio da peroxidação de lipídios de membrana celular, inativação da enzima sulfidril, cross-linking de proteínas ou quebra de DNA humano, ocasiona doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e câncer, assim como inflamações e doença coronariana (AHN et al., 2007). Consequentemente, espera-se que a boa atividade antioxidante da PMUP represente uma proteção contra processos oxidativos, prevenindo essas doenças. A significativa atividade antioxidante dos EHEs indica a necessidade de estudos que explorem a farmacodinâmica da PMUP no organismo humano, visto que não há nenhuma publicação na literatura a esse respeito.

5.3 Ensaio microbiológico

O teste de microdiluição em caldo gerou CIMs que foram inseridas na tabela 6. Ela exibe a CIM apresentada por cada EHE, de setembro de 2020 a agosto de 2021, relacionando-a com o microrganismo contra o qual houve efeito. As CIMs dos meses de janeiro e abril de 2021 estão em negrito para destacar que esses foram os meses com as maiores atividades antimicrobianas do estudo. Considerando que a CIM significa a menor concentração de extrato em que se inibe o crescimento microbiano, a atividade antimicrobiana será tanto mais intensa quanto menor for a CIM.

Tabela 7 – CIMs dos EHEs, de setembro de 2020 a agosto de 2021, no ensaio de microdiluição em caldo.

Microrganismos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)											
	Mês de coleta											
	Set/20	Out/20	Nov/20	Dez/20	Jan/21	Fev/21	Mar/21	Abr/21	Mai/21	Jun/21	Jul/21	Ago/21
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva)	256	256	128	256	64	256	128	128	128	128	128	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram-positiva)	128	128	128	128	64	128	128	128	128	128	128	128
<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa)	512	1024	512	1024	256	512	512	512	512	512	512	512
<i>Candida albicans</i> (Levedura)	256	128	256	128	64	256	256	64	128	128	128	128

Fonte: Autor, 2024.

A atividade antibacteriana da própolis verde brasileira é atribuída a altas concentrações de compostos como galangina, kaepferol, pinostrobin e pinocembrina (GRENHO et al., 2015), metabólitos que também foram quantificados na PMUP. A galangina e a pinocembrina, quando majoritários em própolis, conferem a ela propriedade antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2006). Os flavonoides quercetina, galangina e pinocembrina, bem como ácido cafeico e artemillin-C, atuam contra microrganismos possivelmente através da inibição da RNA polimerase bacteriana, ou do dano à membrana ou parede celular. Além disso, compostos fenólicos, de modo geral, conferem atividade antimicrobiana à própolis (KUJUMGIEV et al., 1999).

Galangina e pinocembrina, dois flavonoides encontrados neste estudo em concentrações relativamente altas, possuem efeito antimicrobiano expressivo (UZEL et al., 2005). A galangina, por exemplo, foi eficaz contra *S. aureus* resistente a 4-quinolona com CIM de 50 µg/mL, com mecanismo possivelmente relacionado à topoisomerase IV (CUSHNIE; LAMB, 2006).

As CIMs dos EHEs, quando interpretadas mais abrangentemente, demonstram tendência a resultados, no período de abril a julho de 2021, melhores que aqueles de outubro de 2020 a janeiro de 2021. Entretanto, a definição de ciclos não é possível, devido à presença de CIMs relativamente altas de outubro a dezembro de 2020,

especialmente contra *E. coli* e *C. albicans*. Contra *E. faecalis*, por exemplo, as CIMs são invariáveis no que foi o primeiro ciclo nos ensaios anteriores.

Os EHEs foram mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas que contra a bactéria Gram-negativa, em concordância com a observação de PINTO et al. (2001) para a PVB. É importante, também, observar o mês de janeiro de 2021, que se destacou por revelar as menores CIMs da pesquisa contra todas as espécies de microrganismos. O segundo mês com desempenho notável foi abril de 2021, que atingiu 64 µg/mL de CIM contra *C. albicans* e valores também baixos contra os demais microrganismos.

Tanto janeiro quanto abril de 2021 tiveram as mais altas atividades antioxidantes no ensaio de DPPH• (Figura 22). Abril de 2021 compôs o ciclo de altas concentrações de FD (Figura 21). Em janeiro de 2021 houve o maior teor de FT (Figura 20). O segundo maior nível de CFT foi encontrado em abril de 2021 (Figura 19). Além disso, em CLAE-DAD, janeiro e abril de 2021 foram os meses com melhor desempenho para artepillin-C (Figura 18-A), quercetina (Figura 18-D), pinostrobin (Figura 18-E) e galangina (Figura 18-G). Em abril de 2021, houve maior teor de ácido ferúlico (Figura 18-B), pinocembrina (Figura 18-C), kaempferol (Figura 18-D), pinobanksin (Figura 18-E), galangina (Figura 18-G), crisina (Figura 18-G) e rutina (Figura 18-H). Portanto, resultados dos demais ensaios estão em conformidade com a atividade antimicrobiana dos EHEs.

A bactéria anaeróbica facultativa *E. faecalis* foi sensível aos EHEs em 128 µg/mL por 11 meses, porém houve um pico de atividade em janeiro de 2021, equivalente a 64 µg/mL. Convém perceber que o pico de atividade contra essa bactéria aconteceu no mesmo mês em que os FTs apresentaram a sua maior concentração. A atividade antimicrobiana da própolis pode ser explicada pela eficiência com que se extraem compostos fenólicos (MARCUCCI et al., 2001), e isso pode explicar a relação com os FT. Em contrapartida, a variação que se constatou nas quantificações de metabólitos totais e de marcadores químicos não foi refletida no ensaio microbiológico contra *E. faecalis*.

Não obstante, contra *E. faecalis*, os EHEs tiveram CIMs consideravelmente mais baixos que o EH da própolis marrom do Mato Grosso, cuja CIM foi 1000 mg/mL (PIMENTA et al., 2015). Em outra publicação, a própolis marrom do Mato Grosso teve menor atividade que a PMUP, inibindo o crescimento da *E. faecalis* a partir da

concentração de $5,00 \pm 0,12$ mg/mL (ARRUDA et al., 2020). O EE de própolis marrom do Paraná apresentou atividade contra *E. faecalis* em 860 µg/mL (MACHADO et al., 2016b). A avaliação da atividade do EE de 44 amostras de própolis coletadas no Paraná contra *E. faecalis* (ATCC 29212) demonstrou que somente 36% das amostras realizaram algum efeito, em concentrações que variaram de 156 µg/mL a 625 µg/mL (MACHADO et al., 2021). Em geral, a PMUP demonstrou maior eficácia que outros tipos de própolis contra essa bactéria.

A *E. faecalis* é o agente etiológico de cerca de 90% das infecções humanas enterocócicas (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2013). Está associada a infecções endodônticas primárias, nas quais tem prevalência de 40%, e infecções endodônticas persistentes, nas quais a sua prevalência corresponde a 24–77% (HEDGE, 2009).

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* é capaz de ocasionar desde infecções simples, na pele e em tecidos moles, até infecções mais graves, as quais podem comprometer a vida do paciente, tais como bacteremia e septicemia (KOBAYASHI; MALACHOWA; DELEO, 2015). É o agente etiológico principal de infecções do trato respiratório, como a pneumonia, além de infecções em sítios cirúrgicos, articulações protéticas, cardiovasculares e bacteremias nosocomiais (TONG et al., 2015). A ineficácia de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro em combater o biofilme de *S. aureus* suscita doenças infecciosas crônicas (REFFUVEILLE et al., 2017).

Nesta pesquisa, o crescimento da *S. aureus* foi inibido, inicialmente, com 256 µg/mL de EHE. Houve, então, os meses de novembro de 2020 e janeiro de 2021; no primeiro ocorreu uma queda da CIM de 256 µg/mL para 128 µg/mL, no último, foi observado o pico de atividade antibacteriana, com 64 µg/mL. Em seguida a CIM foi alterada para 128 µg/mL, em março de 2021, mantendo-se assim até julho do mesmo ano.

O EH de 44 amostras de própolis marrom do Paraná foi avaliado contra *S. aureus* (ATCC 6538), observando-se atividade antibacteriana em 156 µg/mL, para 80% das amostras (MACHADO et al., 2021). Mesmo nos sete meses em que a PMUP demonstrou CIM inferior (128 µg/mL), não o fez com diferença expressiva. Possivelmente por conterem compostos bioativos altamente concentrados, as frações do EH de própolis marrom, cuja região de origem não foi mencionada, apresentaram maior atividade contra *S. aureus* (ATCC 6538) que a PMUP, com CIM de 15,62 µg/mL

nas frações etanólica, hexânica e diclorometano (BITTENCOURT et al., 2015). Contra *S. aureus* (ATCC 29213), o EH da própolis marrom da Bahia revelou CIM de 800–400 µg/mL, enquanto o EFSC demonstrou 1600–800 µg/mL (DEVEQUI-NUNES et al., 2018). Há, pois, variável atividade das própolis marrons distribuídas no Brasil contra *S. aureus*.

A bactéria Gram-negativa *E. coli* foi o microrganismo menos sensível aos EHEs, para a qual foram obtidas as CIMs mais altas deste estudo. A maior suscetibilidade da bactéria foi verificada em janeiro de 2021, mês em que a CIM foi 256 µg/mL. A CIM mais frequente consistiu em 512 µg/mL, observada em nove EHEs, de fevereiro a agosto de 2021. Isso significa que a atividade contra a *E. coli* é invariável durante um período relativamente longo. Outubro e dezembro de 2020, meses que participam do período com menor efeito bacteriostático contra os microrganismos testados, manifestaram CIM de 1024 µg/mL. No entanto, o único mês que apresentou a CIM mais baixa foi janeiro de 2021, já mencionado como o EHE de maior atividade antimicrobiana.

A análise microbiológica contra a *E. coli* (ATCC 8739) de 44 amostras de própolis marrom coletadas no Paraná revelou que, em apenas 32% dos EHs, a CIM foi de 312 µg/mL, com muitos EHs ineficazes (MACHADO et al., 2021). Outra publicação corroborou esses resultados, em que a própolis marrom do Paraná, foi inativa contra *E. coli* (ATCC 8739) (MACHADO et al., 2016b). Semelhantemente, o EH e o EFSC da própolis marrom de Santa Catarina, do Rio Grande do Sul e do Paraná não manifestaram atividade contra a cepa *E. coli* (ATCC 25922) (DANTAS-SILVA et al., 2017). Contra *E. coli* (ATCC 25922), o EH e o EFSC da própolis marrom da Bahia geraram CIMs de 1600–800 µg/mL e 1600 µg/mL, respectivamente (DEVEQUI-NUNES et al., 2018). Foram poucos, portanto, os estudos em que a própolis marrom brasileira apresentou atividade contra *E. coli*, de modo que se pode confirmar a qualidade da PMUP.

As cepas *E. coli* são causadoras de diversas patologias, tanto intestinais quanto extra-intestinais, que abrangem infecções do trato urinário, de tecidos moles, intra-abdominais, pulmonares, dérmicas, meningites de recém-nascidos e bacteremia. Além disso, as infecções podem ocasionar diarreias, síndromes urêmicas e hemolíticas. A bactéria provoca infecções muito comuns, como a infecção do trato urinário, estando associada a alta morbidade e mortalidade. Quando pacientes são

acometidos por bacteremia ocasionada por *E. coli*, a taxa de mortalidade ~15% (DENAMUR et al., 2021).

Candida albicans é a espécie fúngica que mais comumente causa infecções sistêmicas e em mucosas, em comparação aos demais fungos do seu gênero. Aproximadamente 70% das infecções fúngicas, em todo o mundo, são causadas por ela (MORAD et al., 2018). A candidemia tem uma taxa de mortalidade de 43,6%, e há uma alta proporção de pacientes com candidíase como efeito da infecção por *C. albicans* (MORAN et al., 2010). Quase todos os seres humanos são colonizados por esse fungo, capaz de se tornar um patógeno de infecções oportunistas que põem em risco a vida de pacientes (FORD et al., 2015). Quando invasivas, as infecções por *C. albicans* demandam internações prolongadas, que podem durar de três a 30 dias e estão associadas a custos hospitalares elevados (MÍMICA et al., 2009).

Neste estudo, as CIMs da *C. albicans* foram variáveis. Houve, todavia, dois meses em que a atividade antifúngica se mostrou maior: janeiro e abril de 2021, os meses com melhores resultados nos ensaios anteriores. A partir de abril de 2021, passaram a ocorrer as CIMs mais baixas, que no máximo atingiram 128 µg/mL. Em contrapartida, esses meses são precedidos por outros em que se constataram CIMs de 256 µg/mL, a menor atividade antifúngica da pesquisa, em setembro e novembro de 2020, e em fevereiro e março de 2021.

Tanto o EH quanto o EFSC da própolis marrom do Paraná, do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina não demonstraram atividade contra *C. albicans* (ATCC 1880) nas concentrações testadas (DANTAS-SILVA et al., 2017). Embora testado contra outra cepa, novamente se mostrou ineficaz contra *C. albicans* (ATCC 90028) o EH da de própolis marrom, dessa vez obtida no estado de São Paulo (RIBEIRO et al., 2021). Para a *C. albicans* (ATCC 90028), o EH da própolis marrom do Mato Grosso gerou CIM de $5,00 \pm 0,12$ mg/mL (ARRUDA et al., 2020). Em outras palavras, as CIMs observadas para a PMUP expressam a significativa e alta atividade contra *C. albicans*, o que a torna um tipo promissor de própolis, que certamente será abordado em novas pesquisas com outras espécies fúngicas.

O EH da própolis de Santa Catarina revelou maior atividade contra *S. aureus* (ATCC 25923) nas estações de primavera, outono e inverno (FIORDALISI; HONORATO; KUHNEN, 2019). NETO et al. (2017) compararam as CIMs de EHs de amostras de própolis vermelha coletadas nos períodos chuvoso e seco, em

Pernambuco, e confirmaram que no período seco há maior atividade contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *S. aureus*.

5.4 Coeficiente de correlação de Pearson (r)

A tentativa de estabelecer correlação linear entre a concentração de compostos fenólicos totais, de flavonoides totais e os resultados do ensaio de microdiluição em caldo e de DPPH• produziu os valores de r contidos na tabela 8. O objetivo era validar, por meio dessa análise, o que relata a literatura científica sobre o papel tanto dos ácidos fenólicos quanto dos flavonoides nas atividades antioxidante e antimicrobiana da própolis.

Tabela 8 – Valores de r para ensaios químicos e microbiológicos deste estudo ($p \leq 0,01$).

Ensaio	Flavonoides totais	Compostos fenólicos totais
DPPH•	-0,5870	-0,5976
<i>S. aureus</i>	-0,2195	-0,3869
<i>E. faecalis</i>	-0,5863	-0,1883
<i>E. coli</i>	0,1427	-0,2186
<i>C. albicans</i>	-0,5246	-0,5577

Fonte: Autor, 2024.

Em concordância com a literatura científica, os r demonstraram correlação linear negativa entre os teores de CFT e FT e os resultados dos ensaios de DPPH• e de microdiluição em caldo. Houve apenas uma exceção: o r entre os teores de FT e as CIMs para *E. coli*. Quanto maior a concentração de CFT e FT em própolis, menor a concentração de extrato bruto necessária para realizar atividade antioxidante ou antimicrobiana, tornando a correlação linear negativa. Os valores de r foram determinados com um nível de significância em que $p \leq 0,01$, e todas as variáveis testadas tiveram correlação significativa.

A *E. coli* revelou correlação fracamente negativa entre suas CIMs e os teores de CFT (-0,2186), enquanto que o r entre suas CIMs e os teores de FT teve valor positivo (0,1427). Os teores de FT e CFT correlacionaram-se moderadamente com a

capacidade de sequestro de radicais DPPH•, com r de -0,5870 e -0,5976, respectivamente. Ambas as quantificações de metabólitos totais apresentaram, além disso, correlação moderada com as CIMs da *C. albicans* (-0,5246 para FT e -0,5577 para CFT), e se correlacionaram apenas fracamente com as CIMs da *S. aureus* (-0,2195 para FT e -0,3869 para CFT). Quanto às CIMs da *E. faecalis*, houve diferença entre os valores de r , que evidenciaram correlação muito fraca com os teores CFT (-0,1883) e correlação moderada com os teores de FT (-0,5863), indicando maior participação dos flavonoides na inibição do crescimento de *E. faecalis*.

6. CONCLUSÃO

O método de CLAE-DAD foi capaz de monitorar a variação sazonal dos compostos majoritários da PMUP. Os possíveis biomarcadores dessa variedade de própolis são pinocembrina, galangina, pinostrobin e crisina.

Os ensaios de CFT, FT e FD revelaram que a PMUP é uma fonte promissora de compostos bioativos, apresentando altos teores, que atendem à legislação brasileira.

A capacidade de sequestro de radicais DPPH• caracterizou boa atividade antioxidante da PMUP, corroborando os ensaios químicos anteriores.

O teste de microdiluição em caldo demonstrou que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis à PMUP que a bactéria Gram-negativa. As atividades antimicrobianas foram mais altas em janeiro e abril de 2021, meses com as maiores concentrações em CLAE-DAD.

Todos os resultados convergiram para a detecção de dois períodos de melhor desempenho: de outubro de 2020 a janeiro de 2021 (1), e de abril a julho de 2021 (2).

Esta é a primeira pesquisa de sazonalidade da PMUP, um tipo de própolis recentemente descoberto, para o qual os estudos são ainda escassos. Portanto, será a base para abordagens futuras do nosso grupo de pesquisa, que pretendem correlacionar dados climatográficos, georreferenciar os apiários e a flora predominante na região, estabelecer a origem botânica e desenvolver materiais com PMUP para aplicações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. et al. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 1, p. 174-178, 2007.
- AHANGARI, Z.; NASERI, M.; VATANDOOST, F. Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. **Iranian endodontic journal**, v. 13, n. 3, p. 285, 2018.
- AHN, M. R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.
- ANDRADE-FERREIRA, F. B. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.
- ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695-1703, 2019.
- ARRUDA, D. L. P. et al. Green and brown propolis as antioxidant, antimicrobial and inhibitors of matrix metalloproteinases in endodontics. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 7, n. 10, 2020.
- ARRUDA, R. E. S. **Efeito da sazonalidade na composição química e atividades antimicrobiana, antioxidante e tripanossomicida de extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas**. 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.
- AYDIN, Z. U. et al. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. **Brazilian oral research**, v. 32, p. e119, 2018.
- BANKOVA, V. Determining quality in propolis samples. **Journal of the American Apitherapy Society**, v. 7, n. 2, p. 50-55, 2000.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 3-4, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361-367, 1998.

BANKOVA, V. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1-49, 2019.

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

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 4, p. 471-474, 1983.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. The phytochemistry of the honeybee. **Phytochemistry**, v. 155, p. 1-11, 2018.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: A review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734-743, 2021.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BARBOSA, S. R. M. **Sazonalidade ambiental no teor de fenólicos e atividade antioxidante de própolis em áreas de floresta e savana de Roraima**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

BARRECA, D. et al. Flavanones: *Citrus* phytochemical with health-promoting properties. **BioFactors**, v. 43, n. 4, p. 495-506, 2017.

BAYRAM, N. et al. Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari, Turkey. **Records of Natural Products**, v. 12, n. 6, 2018.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V.; JORDÀ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 529-532, 1994.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa Publicações Eletrônicas, 2017. 22p. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 25 out. 2023.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 42, 29 de agosto de 2013**. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Brasília: Anvisa Publicações Eletrônicas, 2013. 17p. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.pdf>. Acesso em: 25 out. 2023.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 2001. Disponível em:< https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/copy_of_suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-mel-e-produtos-apicolas>. Acesso em: 25 out. 2023.

BRIDI, R. et al. International Regulations of Propolis Quality: Required Assays do not Necessarily Reflect their Polyphenolic-Related *In Vitro* Activities. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. C1188-C1195, 2015.

BUENO-SILVA, B. et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural product research**, v. 31, n. 11, p. 1318-1324, 2017.

BULBOVAS, P. et al. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil). **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, p. 687-696, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of medical and Biological research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

CAVENDISH, R. L. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127-133, 2015.

CHANG, C.-C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of food and drug analysis**, v. 10, n. 3, 2002.

CHEN, C.-N. et al. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2004.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 4th ed. CLSI

standard M27. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

COELHO, J. et al. Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and south Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 21-31, 2017.

COTTICA, S. M. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 929-935, 2011.

CUI, J. et al. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review. **Fitoterapia**, v. 157, p. 105106, 2022.

CUI-PING, Z.; FU-LIANG, H. U. Flavonoids in Propolis. **Natural Product Research & Development**, v. 21, n. 6, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 187-191, 2006.

DANTAS-SILVA, R. P. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

DEMOGURSKI, D. S. O. et al. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food research international**, v. 111, p. 661-673, 2018.

DEMIR, S. et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 1, p. 165-172, 2016.

DENAMUR, E. et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021.

DEVEQUI-NUNES, D. et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018.

DRESCHER, N. et al. A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0210594, 2019.

DUKE, C. C. et al. A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated p-coumarate ester and stilbenes. **Phytochemistry**, v. 134, p. 87-97, 2017.

EASTON-CALABRIA, A.; DEMARY, K. C.; ONER, N. J. Beyond pollination: honey bees (*Apis mellifera*) as zootherapy keystone species. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 161, 2019.

ECEM-BAYRAM, N. et al. Effects of processing methods and extraction solvents on the chemical content and bioactive properties of propolis. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, p. 905-916, 2020.

ELBATREEK, M. H. et al. Current advances on the therapeutic potential of pinocembrin: an updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, p. 114032, 2023.

ELNAKADY, Y. A. et al. Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 41453, 2017.

EROĞLU, Ö.; YÜKSEL, S. Propolis from past to present. **Journal of Social, Humanities and Administrative Sciences**, v. 6, n. 26, p. 623-629, 2020.

FERNANDES, F. H. et al. Assessment of the (anti) genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v. 62, p. 20-26, 2014.

FERNANDES-SILVA, C. C. **Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileiras. Isolamento de substâncias e teste das atividades antioxidante e anti-HIV**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FERNANDES-SILVA, C. C. et al. Cytotoxic Activity of Six Samples of Brazilian Propolis on Sea Urchin (*Lytechinus variegatus*) Eggs. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 619361, 2013.

FIORDALISI, S. A. L.; HONORATO, L. A.; KUHNEN, S. Seasonal variation of propolis from southern Brazil: phytochemical screening, antimicrobial activity, and effects on bovine mammary epithelial cells. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 1, p. e149146-e149146, 2019.

FINGER, D. et al. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, p. 259-264, 2014.

FORD, C. B. et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 4, p. e00662, 2015.

FORMA, E.; BRYŚ, M. Anticancer activity of propolis and its compounds. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2594, 2021.

FRANCHIN, M. et al. Food-grade delivery systems of Brazilian propolis from *Apis mellifera*: From chemical composition to bioactivities in vivo. **Food Chemistry**, v. 432, p. 137175, 2023.

GAO, W. et al. Serum antioxidant parameters are significantly increased in patients with type 2 *diabetes mellitus* after consumption of Chinese propolis: a randomized controlled trial based on fasting serum glucose level. **Diabetes Therapy**, v. 9, p. 101-111, 2018.

GEBARA, E. C. E. et al. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. **Oral health & preventive dentistry**, v. 1, n. 1, 2003.

GECKIL, H. et al. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 27-31, 2005.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOPU, V.; MEENA, C. K.; SHETTY, P. H. Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: *in-vitro* and *in-silico* evidence. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0134684, 2015.

GRENHO, L. et al. *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. **Biomedical materials**, v. 10, n. 2, p. 025004, 2015.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 395-402, 2002.

HEGDE, V. *Enterococcus faecalis*; clinical significance & treatment considerations. **Endodontology**, v. 21, n. 2, p. 48-54, 2009.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HESAMI, S. et al. Administration of Iranian Propolis attenuates oxidative stress and blood glucose in type II diabetic patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. **Caspian journal of internal medicine**, v. 10, n. 1, p. 48, 2019.

HU, L. et al. Pinocembrin protects against dextran sulfate sodium-induced rats colitis by ameliorating inflammation, improving barrier function and modulating gut microbiota. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 464792, 2019.

HUANG, S. et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries research**, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

IRIGOITI, Y. et al. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 297-306, 2021.

KARIM, N. et al. A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 35-54, 2018.

KASOTE, D. M. Propolis: A neglected product of value in the Indian beekeeping sector. **Bee World**, v. 94, n. 3, p. 80-83, 2017.

KASOTE, D.; BANKOVA, V.; VILJOEN, A. M. Propolis: Chemical diversity and challenges in quality control. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 6, p. 1887-1911, 2022.

KĘDZIA, B. The origin of propolis in the theories and scientific research. **Herba Pol**, v. 54, p. 179-186, 2008.

KĘDZIA, B. et al. Pinocembrin–flavonoid component of domestic propolis with delaying effect of the development of Alzheimer's disease. **Postępy Fitoterapii**, v. 18, p. 223-228, 2017.

KHAN, M. K. et al. A comprehensive review on flavanones, the major *citrus* polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85-104, 2014.

KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 6, p. 1518-1527, 2015.

KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KUREK-GÓRECKA, A. M. et al. Antioxidant activity of ethanolic fractions of Polish propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 67, n. 11-12, p. 545-550, 2012.

KUREK-GÓRECKA, A. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78-101, 2013.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LEV-YADUN, S. Why Is the Bark of Common Temperate *Betula* and *Populus* Species White?. **International Journal of Plant Sciences**, v. 180, n. 6, p. 632-642, 2019.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008.

LIN, W. C. et al. Pulmonary tumour with high carcinoembryonic antigen titre caused by chronic propolis aspiration. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 6, p. 1227-1230, 2007.

LIU, R. et al. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both *in vivo* and *in vitro*. **Brain research**, v. 1216, p. 104-115, 2008.

LIU, R. et al. Pinocembrin protects human brain microvascular endothelial cells against fibrillar amyloid- β 1–40 injury by suppressing the MAPK/NF- κ B inflammatory pathways. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174-180, 2014.

LÓPEZ, B. G. C. **ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS VERMELHA**. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LÓPEZ-ORENES, A. et al. Seasonal changes in antioxidative/oxidative profile of mining and non-mining populations of Syrian beancaper as determined by soil conditions. **Science of the total environment**, v. 575, p. 437-447, 2017.

MACHADO, B. A. S. et al. 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**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016a.

MACHADO, C. S. et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 6057650, 2016b.

MACHADO, C. S. et al. In house validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of specific bioactive compounds in southern Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 1, p. 104-113, 2019.

MACHADO, C. S. et al. Seeking the regional identity of brown propolis produced in southern Brazil and linked to total levels of bioactive compounds and biological activity. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 176-185, 2021.

MAFF, U.K. Analysis of bee products for heavy metals. **Joint Food Safety and Standards Group, Food Surveillance, Information Sheet**, v. 53. 1995.

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

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

MARCUCCI, M. C. et al. Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Revista Virtual Química**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2021.

MĂRGHITAȘ, L. Al et al. Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. **Bulletin USAMV-CN**, v. 63, p. 64, 2007.

MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracajú, 2011.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an *in vitro* and *in vivo* study. **Microvascular Research**, v. 88, p. 1-11, 2013.

MÍMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 17-23, 2009.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1097-1103, 2007.

MORAD, H. O. J. et al. Pre-clinical imaging of invasive Candidiasis using ImmunoPET/MR. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1996, 2018.

MORAN, C. et al. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. **American journal of infection control**, v. 38, n. 1, p. 78-80, 2010.

MOTȚ, A. C.; SOPONAR, F.; SÂRBU, C. Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: geographical variation in Romanian samples. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1010-1015, 2010.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NAKAJIMA, Y. et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life sciences**, v. 80, n. 4, p. 370-377, 2007.

NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 246-254, 2018.

NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18293, 2019.

NASCIMENTO, T. G. **Memorial descritivo das atividades acadêmicas de Ticiano Gomes do Nascimento**. 2023. 75 f. Memorial Acadêmico (Concurso para Professor Titular : Classe E) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

NATTAGH-ESHTIVANI, E. et al. Does propolis have any effect on rheumatoid arthritis? A review study. **Food science & nutrition**, v. 10, n. 4, p. 1003-1020, 2022.

NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669-4674, 2004.

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

NNA, V. U. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin–induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 305-320, 2018.

NOVA, M. A. V. et al. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM DE UNIÃO DOS PALMARES. 2022. Disponível em: <https://reunioes.sbpcnet.org.br/74RA/inscritos/resumos/1109_1935e340e0f4dba14173938148fd5794.pdf>. Acesso em: 25 de janeiro de 2024.

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

OKAWA, M. et al. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 10, p. 1202-1205, 2001.

OLEGÁRIO, L. S. et al. Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. **Food Research International**, v. 123, p. 481-502, 2019.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH[•]: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

ONCAG, O. et al. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. **General dentistry**, v. 54, n. 5, p. 319-322, 2006.

PAMPLONA-ZOMENHAN, L. C. et al. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1259-1264, 2011.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2013.

PARK, Y. K. et al. Investigations of the flavonoid aglycones of propolis collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arq. Biol. Technol**, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current microbiology**, v. 36, p. 24-28, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PASUPULETI, V. R. et al. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-21, 2017.

PAULINO, N. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Medica**, v. 72, n. 10, p. 899-906, 2006.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. S7-S20, 2002.

PIMENTA, H. C. et al. *In vitro* effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian oral research**, v. 29, p. 1-6, 2015.

PINTO, M. S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 278-283, 2001.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. **Trends in food science & technology**, v. 83, p. 53-62, 2019.

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 15, n. 4, p. 235-240, 2004.

POPOVA, M. et al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 221-228, 2005.

- POPOVA, M. et al. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 21, n. 2, p. 186-191, 2010.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.
- RAGHUKUMAR, R. et al. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 8, p. 1181-1187, 2010.
- RAMIREZ, J. et al. Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 370-373, 2013.
- RASUL, A. et al. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- REFFUVEILLE, F. et al. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. **The rise of virulence and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus**, v. 11, p. 187, 2017.
- REGUEIRA-NETO, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 572-580, 2017.
- REIDEL, R. V. B. **Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre isolados patogênicos de espécies de candida não-albicans**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- RIBEIRO, V. P. et al. Phytochemical, antiplasmodial, cytotoxic and antimicrobial evaluation of a Southeast Brazilian Brown Propolis produced by *Apis mellifera* bees. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 9, p. e2100288, 2021.
- RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian Brown Propolis: an Overview About Its Chemical Composition, Botanical Sources, Quality Control, and Pharmacological Properties. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 33, n. 2, p. 288-299, 2023.
- RIVERA-YAÑEZ, N. et al. Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis of Chihuahua in a model of experimental diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 4360356, 2018.
- SAEED, F. et al. Propolis to curb lifestyle related disorders: An overview. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 2, p. 420-437, 2016.
- SAKAMOTO, H. T. et al. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher

(Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1396-1401, 2005.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Scientific note: Often quoted, but not factual data about propolis composition. **Apidologie**, v. 52, p. 312-314, 2021.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, p. 1192-1199, 2016.

SAMENI, H. R. et al. Effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes and anti-oxidant defense of kidney in a rat model for type 1 *diabetes mellitus*. **Journal of diabetes investigation**, v. 7, n. 4, p. 506-513, 2016.

SANTOS, F. A. et al. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 9-15, 2002.

SANTOS, V. R. et al. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 7, p. 652-654, 2005.

SAWICKA, D. et al. The anticancer activity of propolis. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 50, n. 1, p. 25-37, 2012.

SAYRE, C. L. et al. Pre-clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of selected chiral flavonoids: pinocembrin and pinostrobin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 368-395, 2015.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.

SEIBERT, J. B. et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food chemistry**, v. 287, p. 61-67, 2019.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V.; KUROPATNICKI, A. K. Medical benefits of honeybee products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 2702106, 2017.

SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 19-29, 2002.

SHI, Y. et al. Seasonal variation influences flavonoid biosynthesis path and content, and antioxidant activity of metabolites in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg. **Plos one**, v. 17, n. 4, p. e0265954, 2022.

SHIBATA, T. et al. Propolis, a Constituent of Honey, Inhibits the Development of Sugar Cataracts and High-Glucose-Induced Reactive Oxygen Species in Rat Lenses. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, p. 1917093-1917093, 2016.

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

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 5, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. O. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 170, p. 66-71, 2015.

SILVA, L. R. O. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom da região de União dos Palmares (Alagoas)**. 2023. 75 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, p. 206439, 2015.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102-1108, 2010.

SIMONE-FINSTROM, M. et al. Propolis counteracts some threats to honey bee health. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 46, 2017.

SON, N. T.; RIBEIRO, V. P.; BASTOS, J. K. Flavonoids from green propolis of the Northeastern Brazilian Caatinga *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.: A chemotaxonomic aspect. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 104, p. 104473, 2022.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, J. P. L. M. et al. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019.

STAN, L.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D. Quality criteria for propolis standardization. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 137-140, 2011.

SZLISZKA, E. et al. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A. 1 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 976415, 2013.

TAZAWA, S. et al. Discovery of a novel diterpene in brown propolis from the state of Parana, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2, p. 201-205, 2016.

TEIXEIRA, E. W. et al. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, p. 85-92, 2005.

TEIXEIRA, E. W. et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 307-315, 2010.

TELES, F. et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015.

TOMAZZOLI, M. M. et al. Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L. **Scientia Agricola**, v. 77, p. e20180258, 2020.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TÜRKEZ, H.; YOUSEF, M. I.; GEYIKOGLU, F. Propolis protects against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity in rat hepatocytes. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2142-2148, 2012.

TYSZKA-CZOCHARA, M. et al. Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis. **Biological trace element research**, v. 160, p. 123-131, 2014.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.

VALENCIA, D. et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food chemistry**, v. 131, n. 2, p. 645-651, 2012.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 86-92, 2011.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

WALLER, S. B. et al. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017.

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WANG, Z. et al. Research Progress on the Pharmacological Effects and Molecular Mechanisms of Pinostrobin. **Natural Product Communications**, v. 18, n. 11, p. 1934578X231215934, 2023.

YANG, Z. et al. Uptake characteristics of pinocembrin and its effect on p-glycoprotein at the blood–brain barrier in *in vitro* cell experiments. **Journal of Asian natural products research**, v. 14, n. 1, p. 14-21, 2012.

YANG, L. et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

ZABAIYOU, N. et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, p. 214-222, 2017.

ZHAO, L. et al. Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 *diabetes mellitus*. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 5, p. 498, 2016.

ZHU, W. et al. Protective effects of Chinese and Brazilian propolis treatment against hepatorenal lesion in diabetic rats. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1246-1255, 2011.

ZIELINSKA, D. et al. Use of cyclic voltammetry, photochemiluminescence, and spectrophotometric methods for the measurement of the antioxidant capacity of buckwheat sprouts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 24, p. 9891-9898, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Comprovante de cadastro de acesso ao SisGen.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A2F5549

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A2F5549**
 Usuário: **UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**
 CPF/CNPJ: **24.464.109/0001-48**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Mimosa hostilis
Croton heliotropiifolius
Spondias tuberosa
Spondias lutea
Citrus sinensis
Citrus limonum
Citrus aurantium
Citrus aurantiifolia

Título da Atividade: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico de bioprodutos da Própolis Marrom da região de União dos Palmares, Vale do Mundaú e Região dos Quilombos em Alagoas**

Equipe

Ticiano Gomes do Nascimento **UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Emanoel Guilhermino da Silva Júnior	Universidade Federal de Alagoas
João Victor Lessa de Oliveira	Universidade Federal de Alagoas
Lucas Rafael de Oliveira Silva	Universidade Federal de Alagoas
Monique Almeida Vila Nova	Universidade Federal de Alagoas
Mailde Jéssica Liodorio dos Santos	Universidade Federal de Alagoas
Jennifer McLaine Duarte de Freitas	Universidade Federal de Alagoas
Arthur Luy Tavares Ferreira Borges	Universidade Federal de Alagoas
Salvana Priscylla Manso Costa	Universidade Federal de Alagoas
Matheus Vinícius Guimarães de Melo	Universidade Federal de Alagoas

Parceiras Nacionais

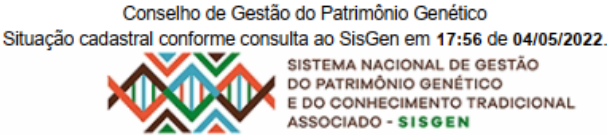
10.825.373/0001-55 / INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALAGOAS - IFAL

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

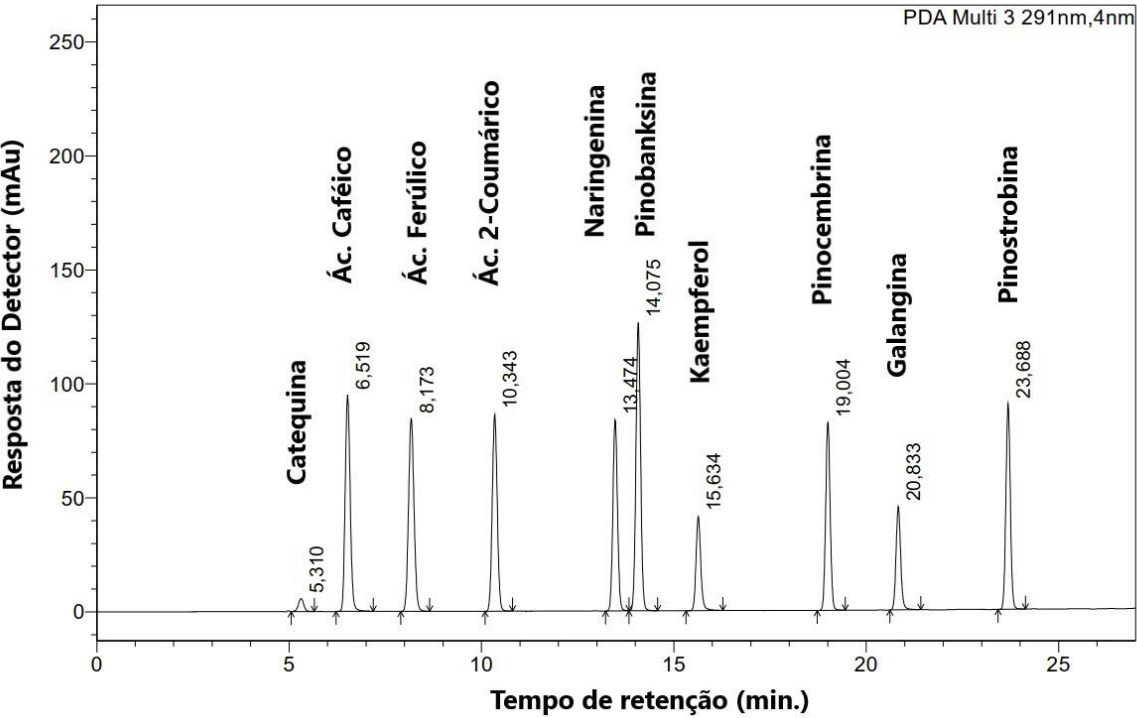
Identificação do meio onde foi divulgado: Comunicação oral microcapsulas de própolis r

Data do Cadastro: 04/05/2022 17:54:24
Situação do Cadastro: Concluído



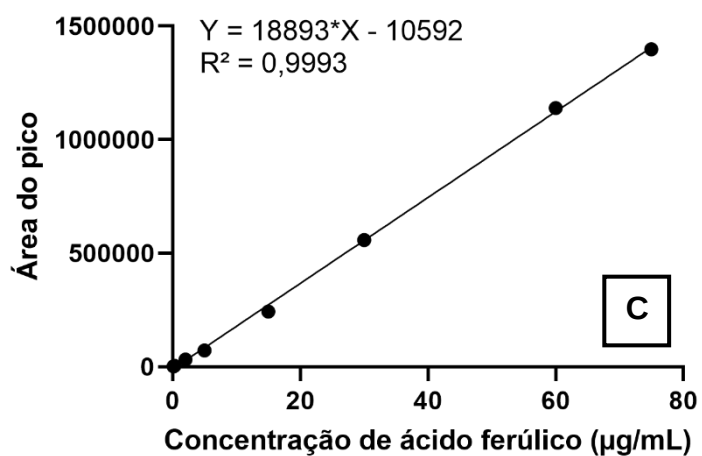
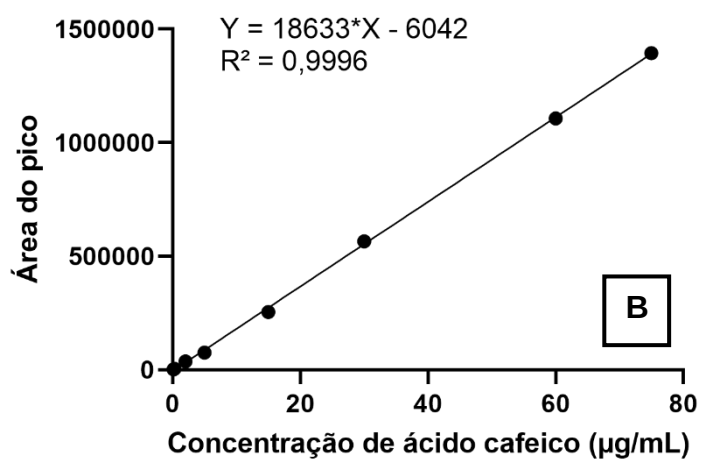
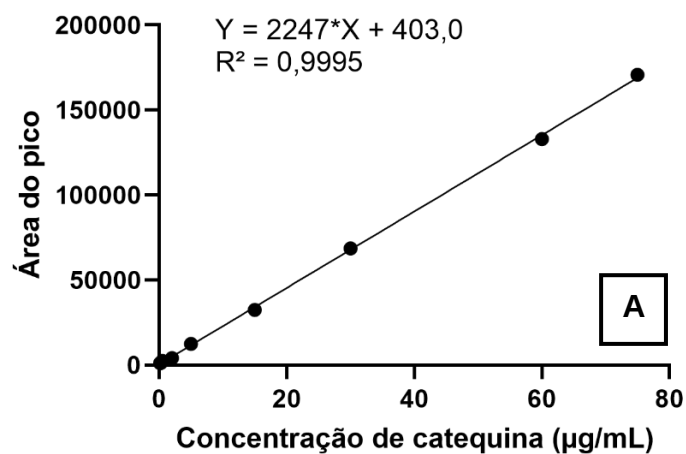
Fonte: Autor, 2024.

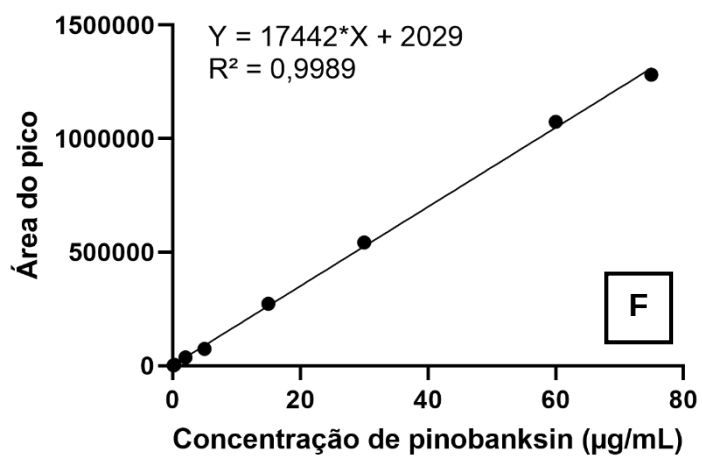
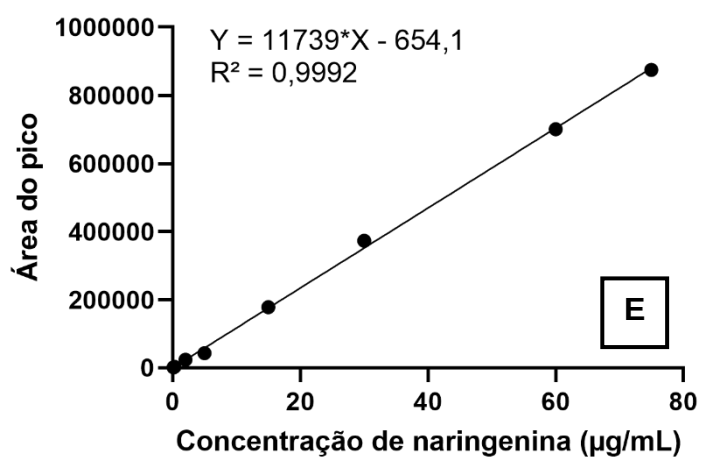
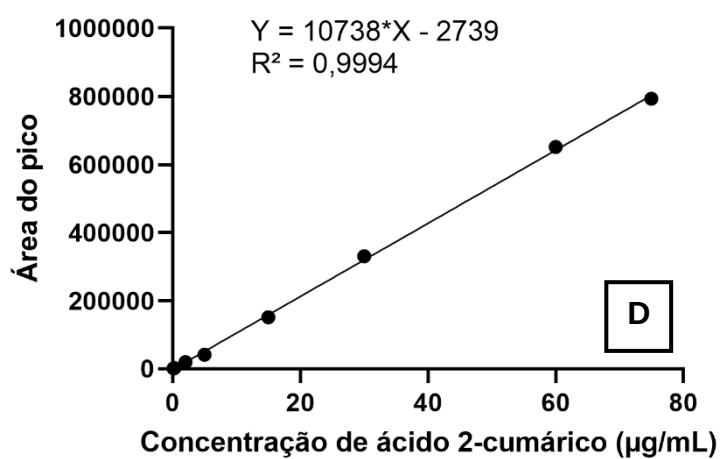
Anexo 2 – Cromatograma da mistura 1 de padrões analíticos (leitura em 291 nm, concentração de 60 µg/mL).

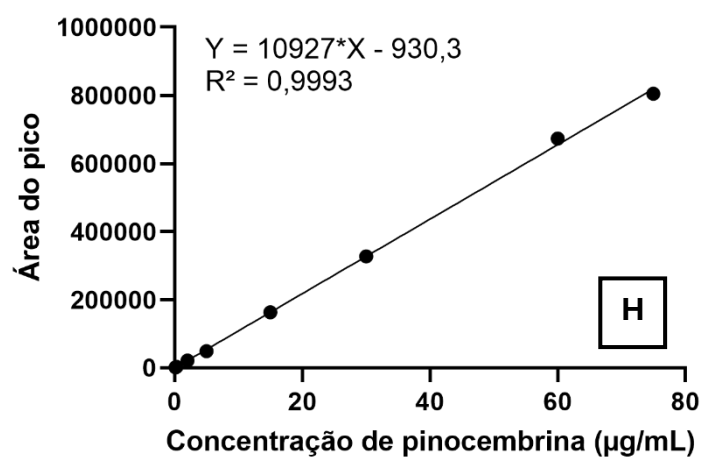
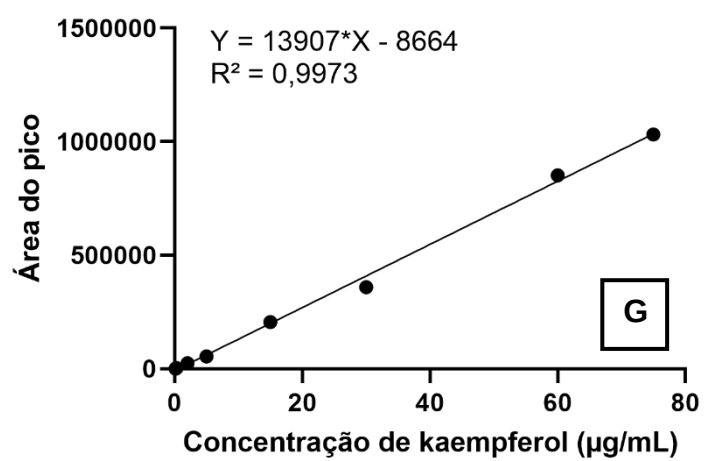


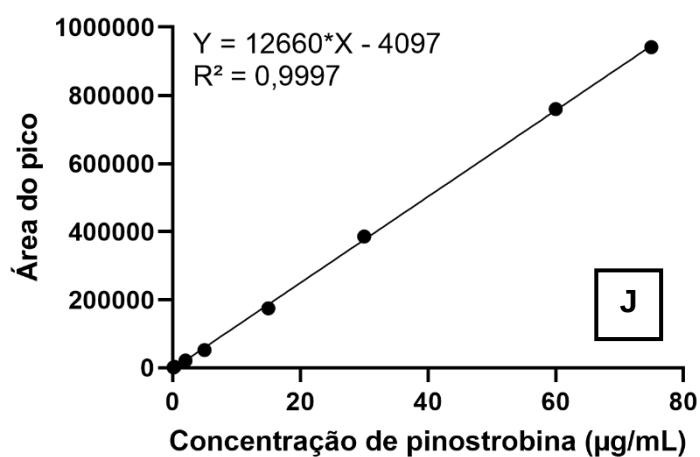
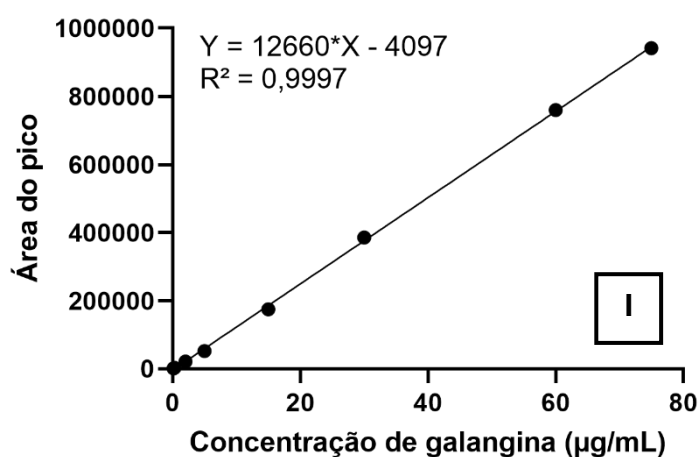
Fonte: Autor, 2024.

Anexo 3 (A-J) – Curva de calibração, em CLAE-DAD, dos padrões analíticos da mistura 1.





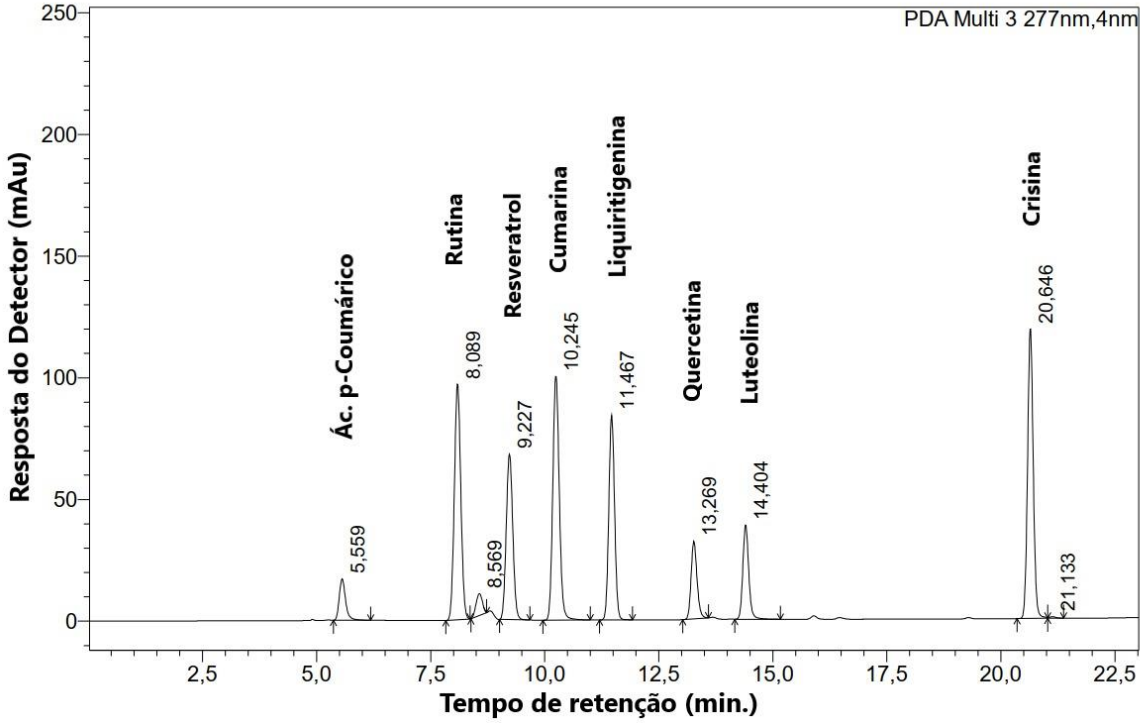




A: Curva de calibração da catequina; **B:** Curva de calibração do ácido cafeico; **C:** Curva de calibração do ácido ferúlico; **D:** Curva de calibração do ácido 2-cumárico; **E:** Curva de calibração da naringenina; **F:** Curva de calibração da pinobanksin; **G:** Curva de calibração do kaempferol; **H:** Curva de calibração da pinocembrina; **I:** Curva de calibração da galangina; **J:** Curva de calibração da pinostrobin.

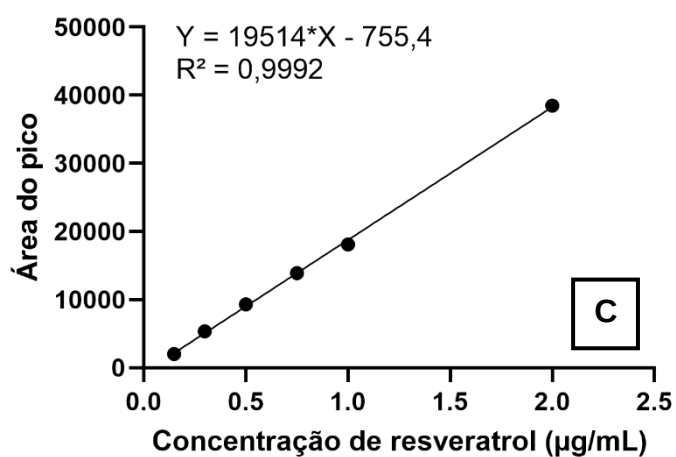
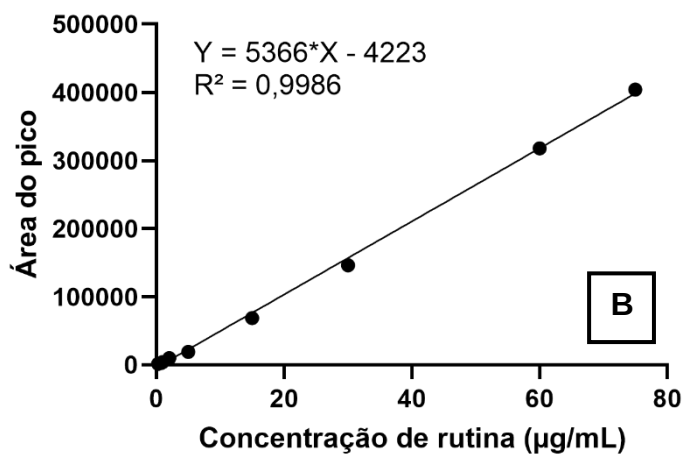
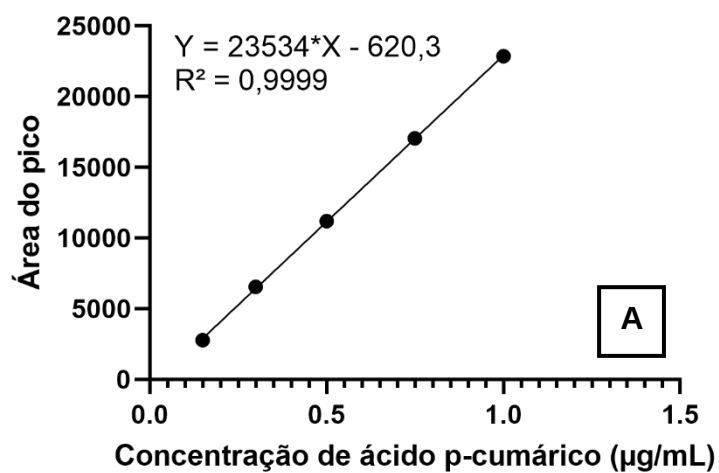
Fonte: Autor, 2024.

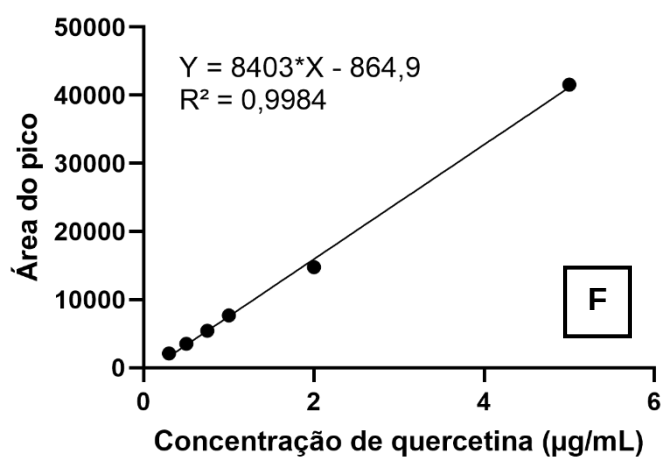
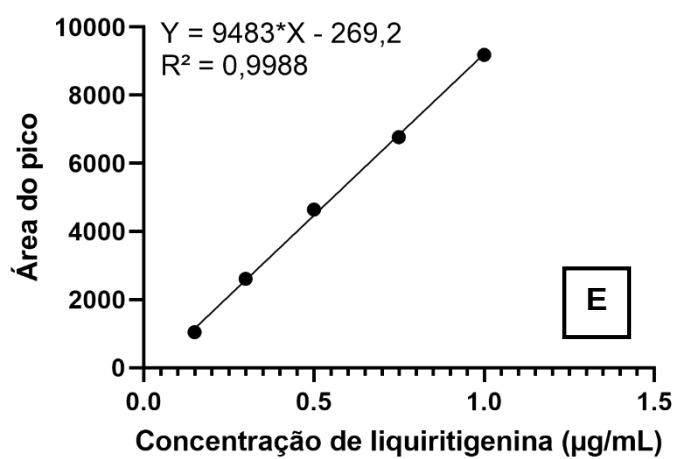
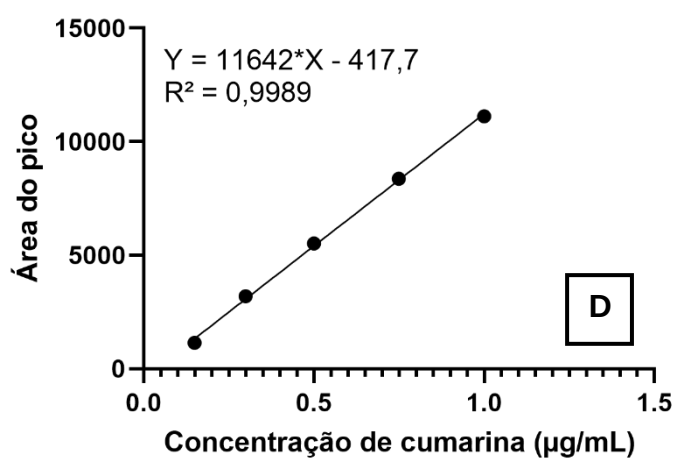
Anexo 4 – Cromatograma da mistura 2 de padrões analíticos (leitura em 277 nm, concentração de 60 µg/mL).

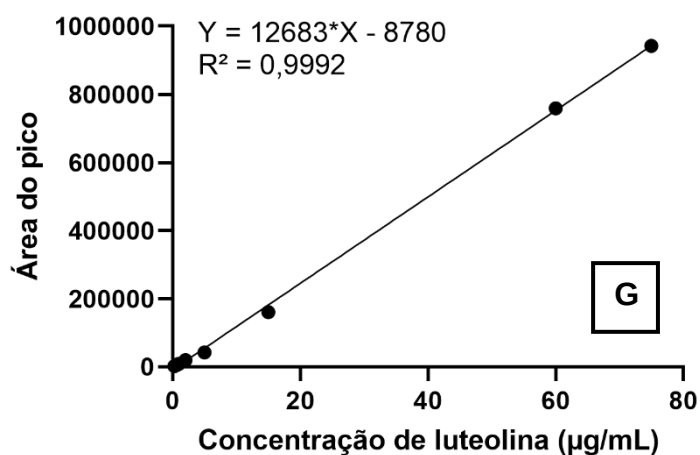


Fonte: Autor, 2024.

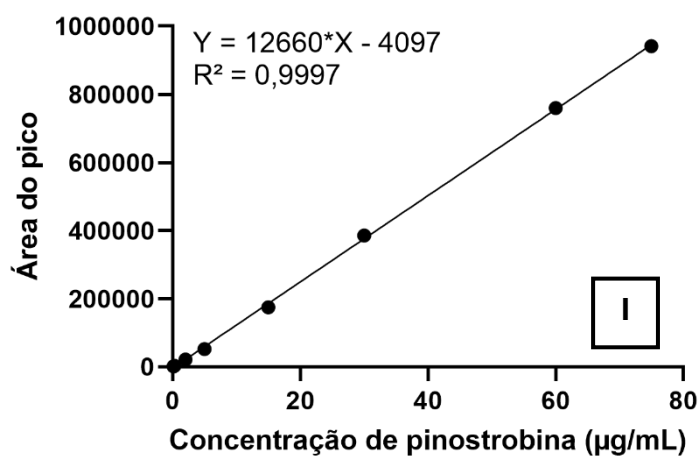
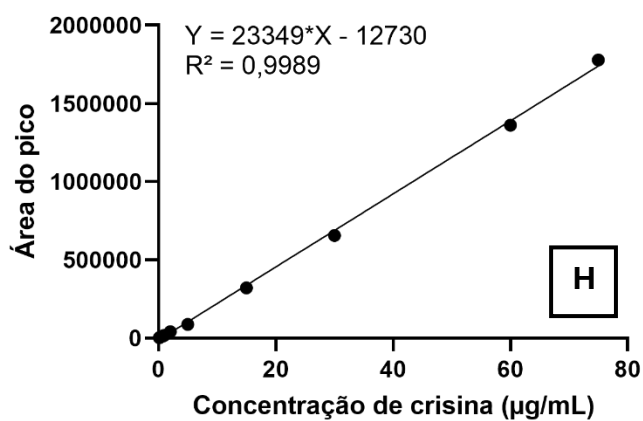
Anexo 5 (A-I) – Curva de calibração, em CLAE-DAD, dos padrões analíticos da mistura 2.





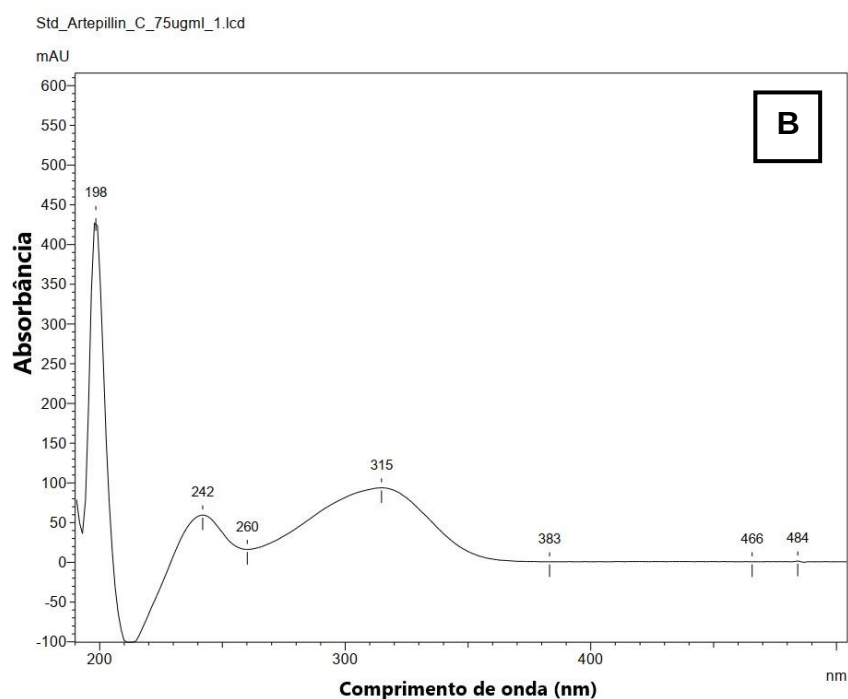
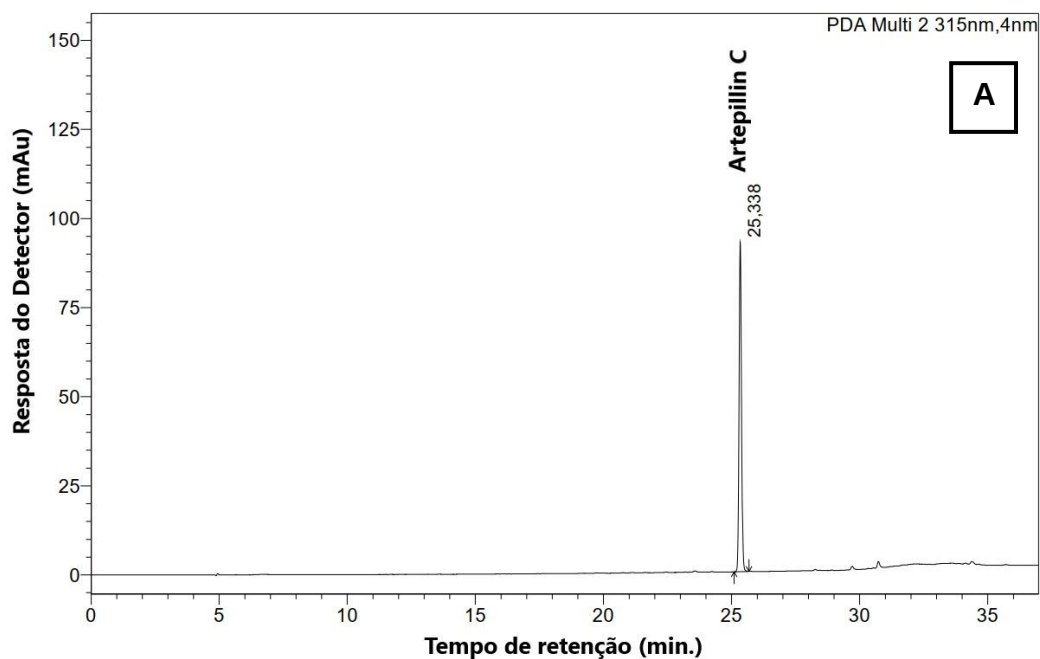


Curva crisina



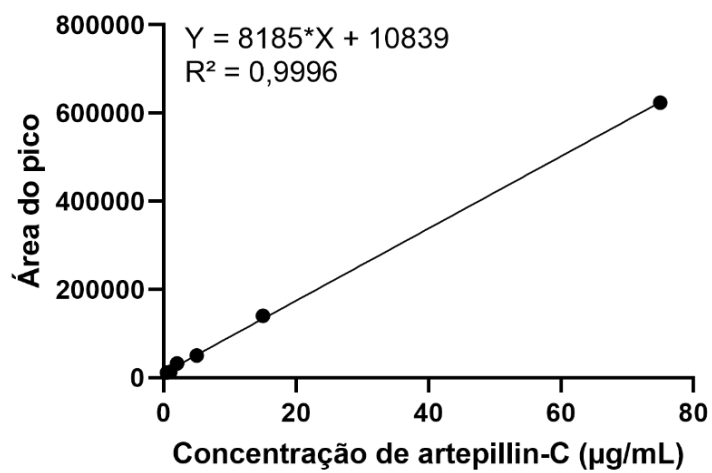
A: Curva de calibração do ácido p-cumárico; **B:** Curva de calibração da rutina; **C:** Curva de calibração do resveratrol; **D:** Curva de calibração da cumarina; **E:** Curva de calibração da liquiritigenina; **F:** Curva de calibração da quercetina; **G:** Curva de calibração da luteolina; **H:** Curva de calibração da crisina. **I:** Curva de calibração da pinostrobin.

Fonte: Autor, 2024.

Anexo 6 (A-B) – Resultados observados em CLAE-DAD para a artepillin-C.

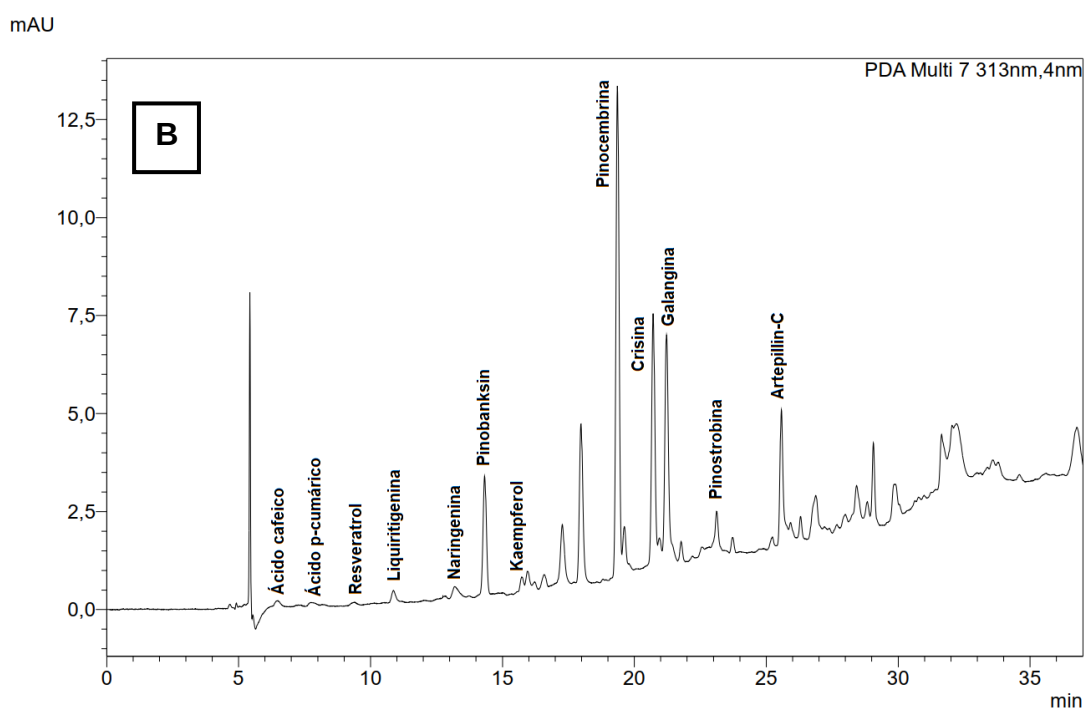
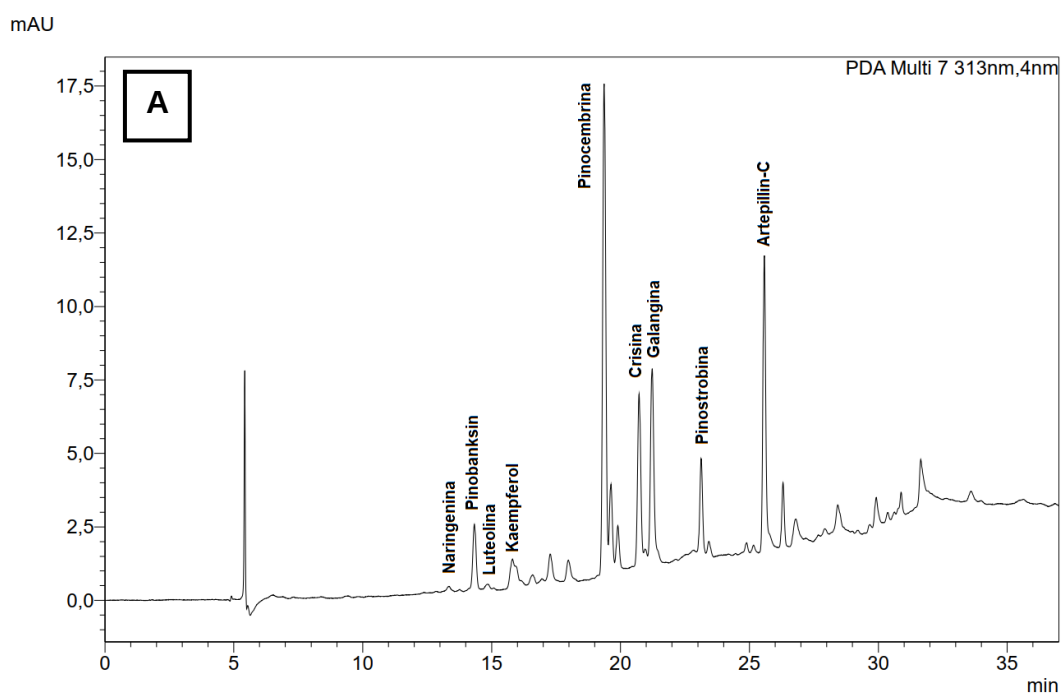
A: Cromatograma da artepillin-C, no λ de 315 nm, na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$; **B:** Espectro de absorção UV da artepillin-C em CLAE-DAD.

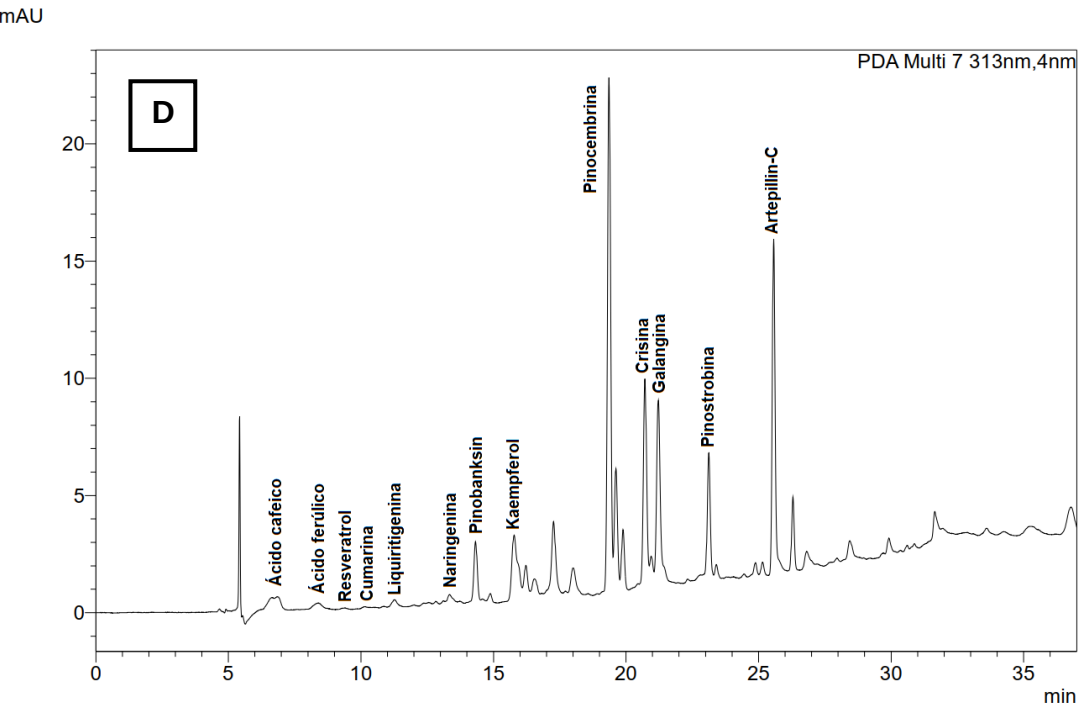
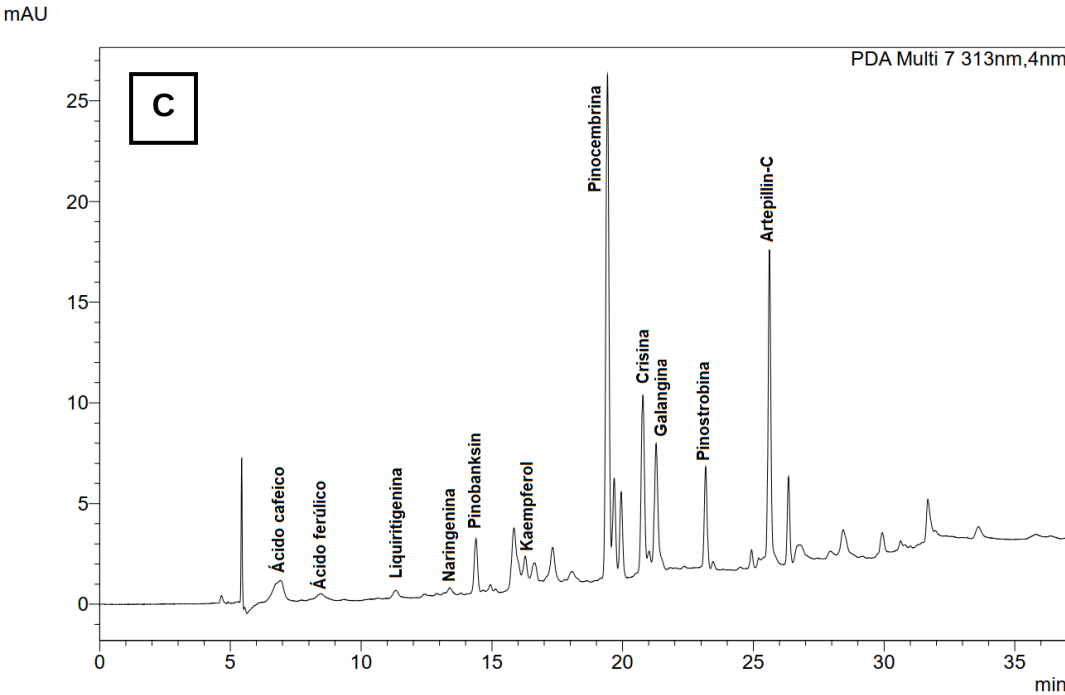
Fonte: Autor, 2024.

Anexo 7 – Curva de calibração, em CLAE-DAD, do padrão analítico de artepillin-C.

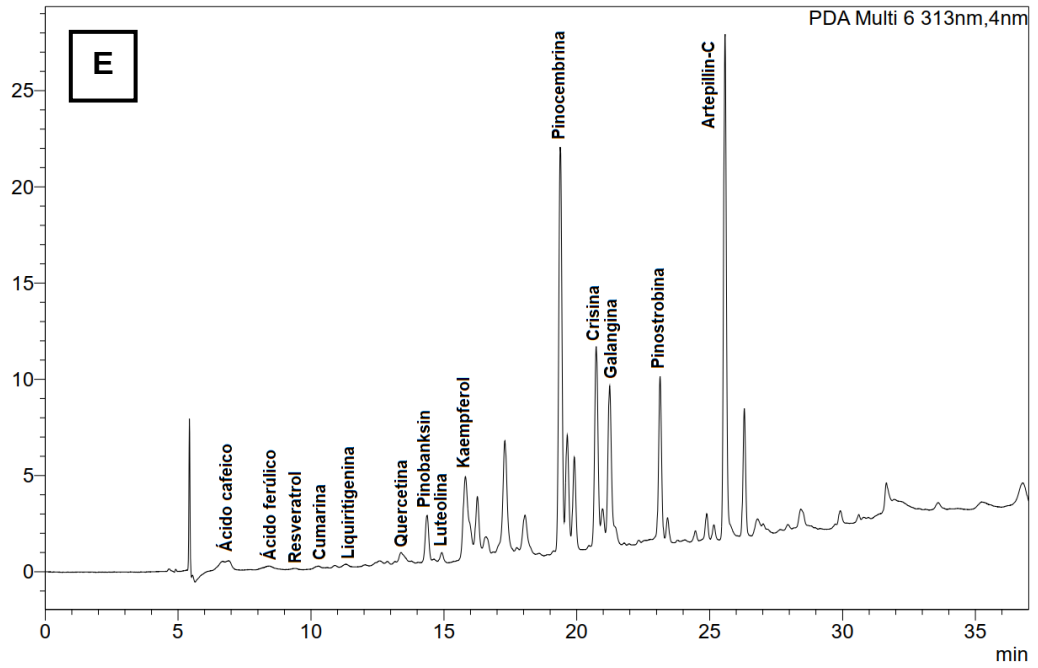
Fonte: Autor, 2024.

Anexo 8 (A-L) – Cromatograma dos EHEs de setembro de 2020 a agosto de 2021, aferidos no λ de 313 nm.

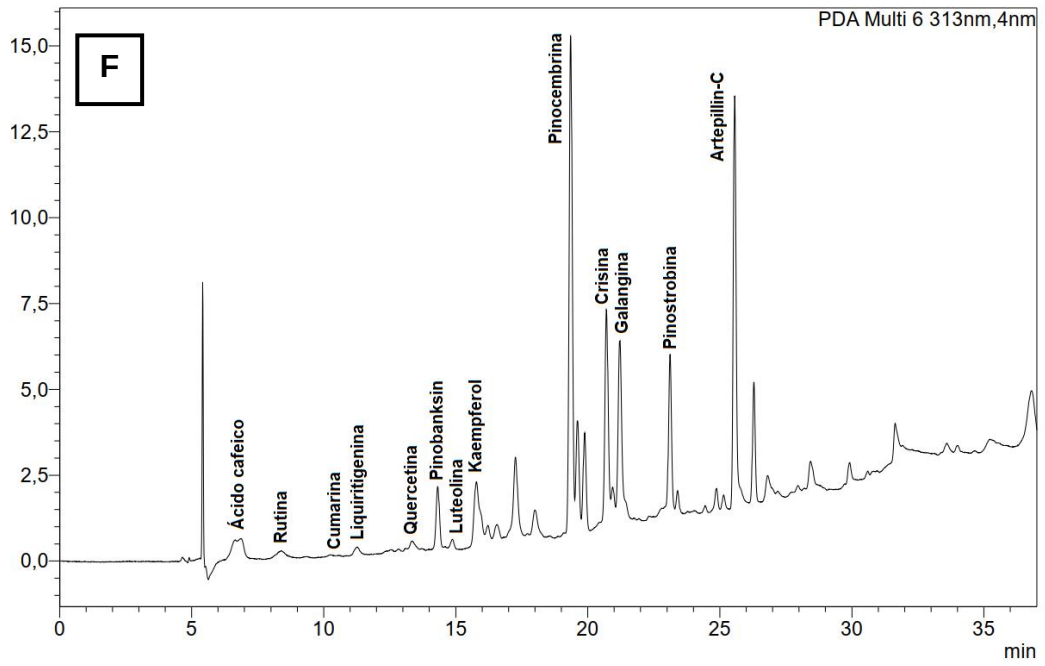


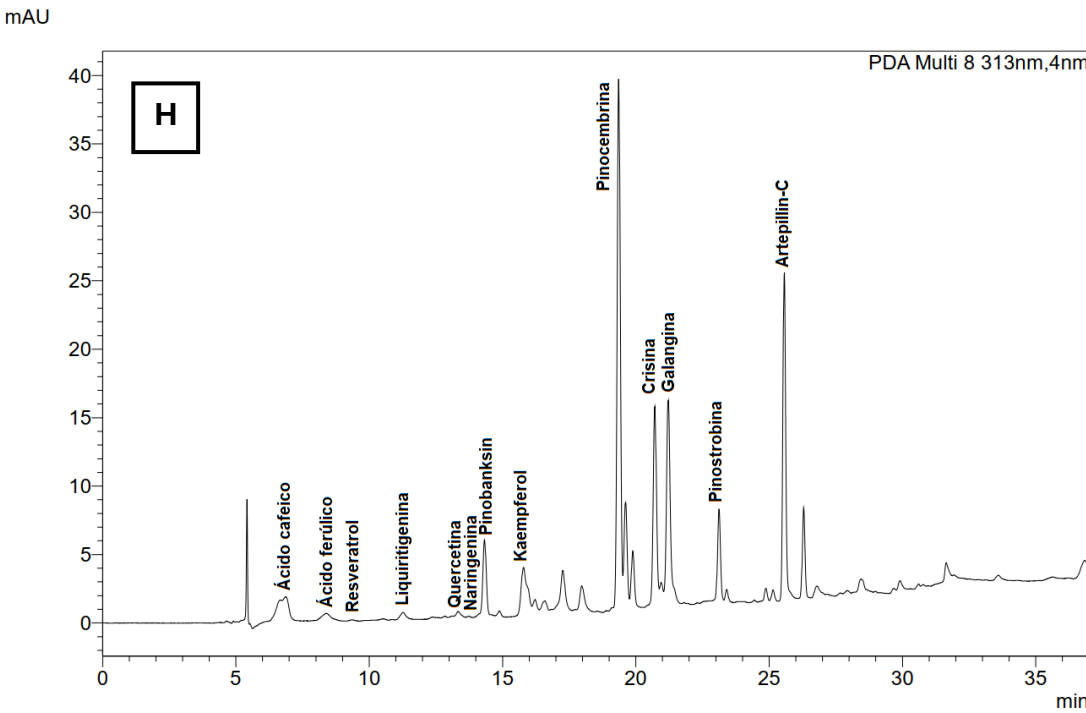
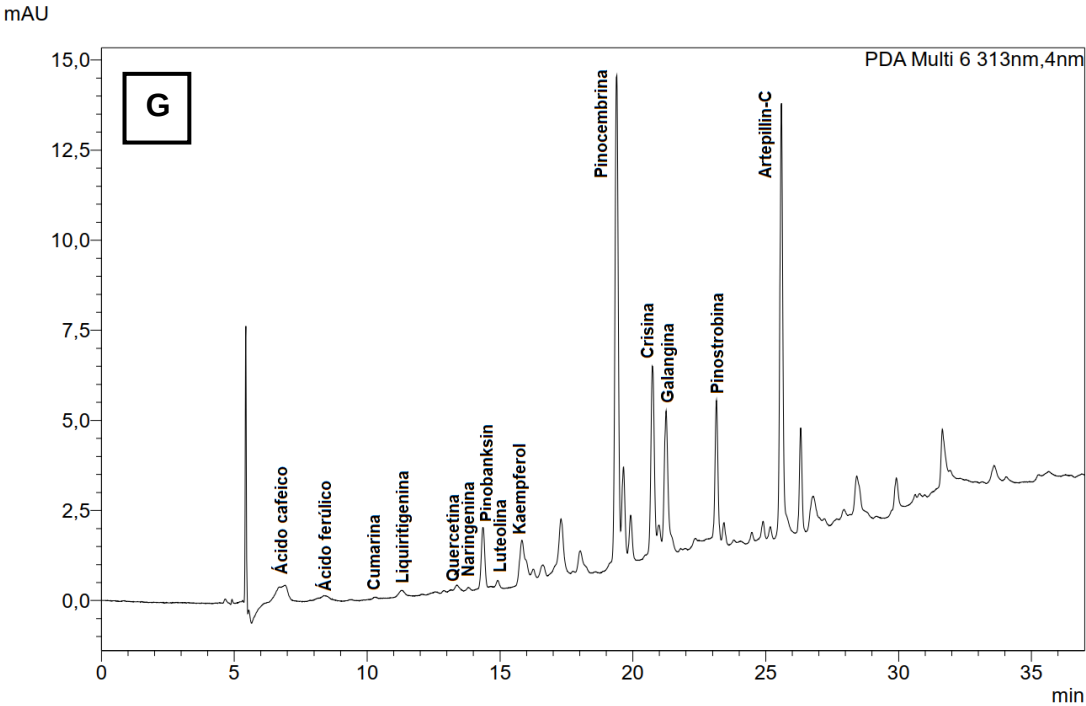


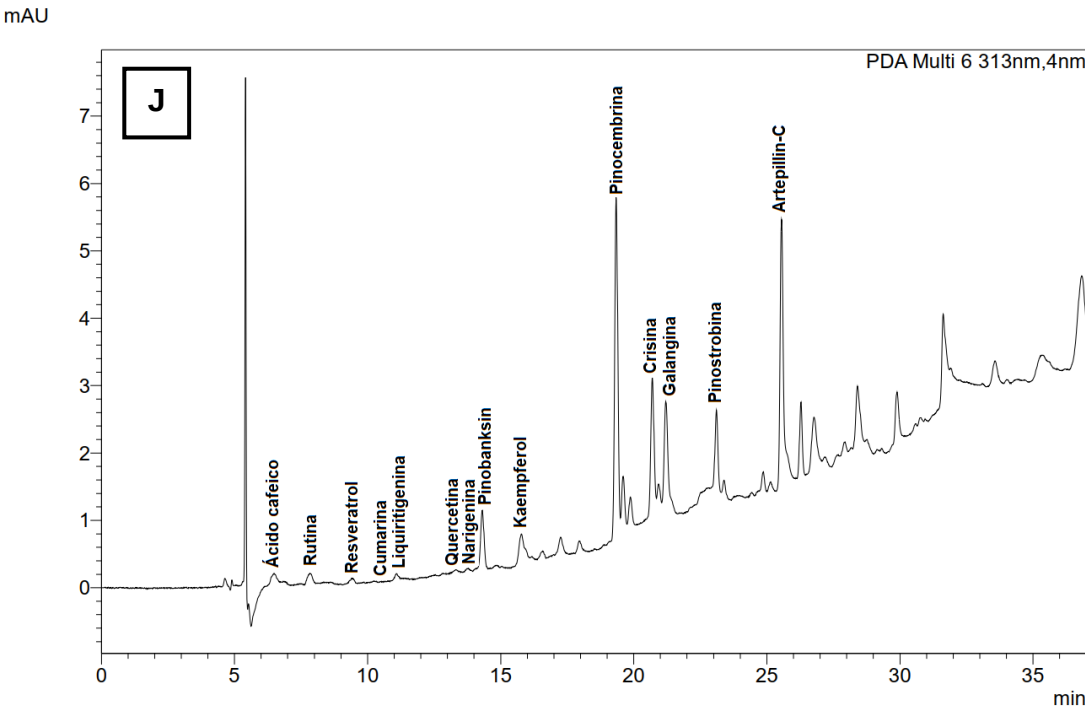
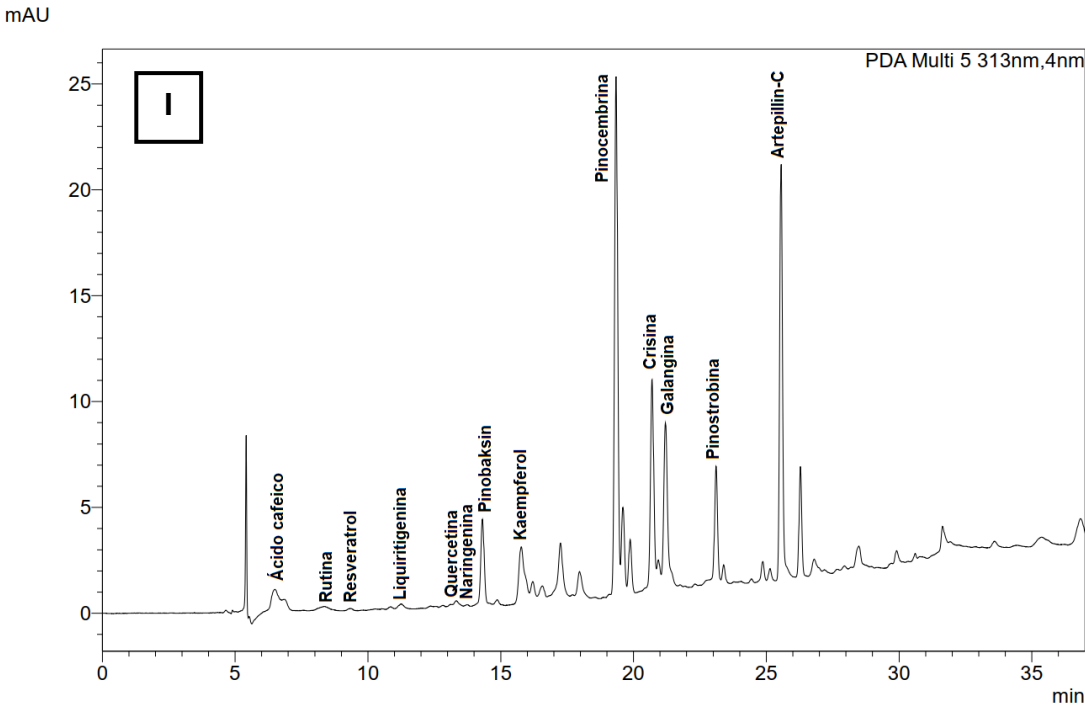
mAU

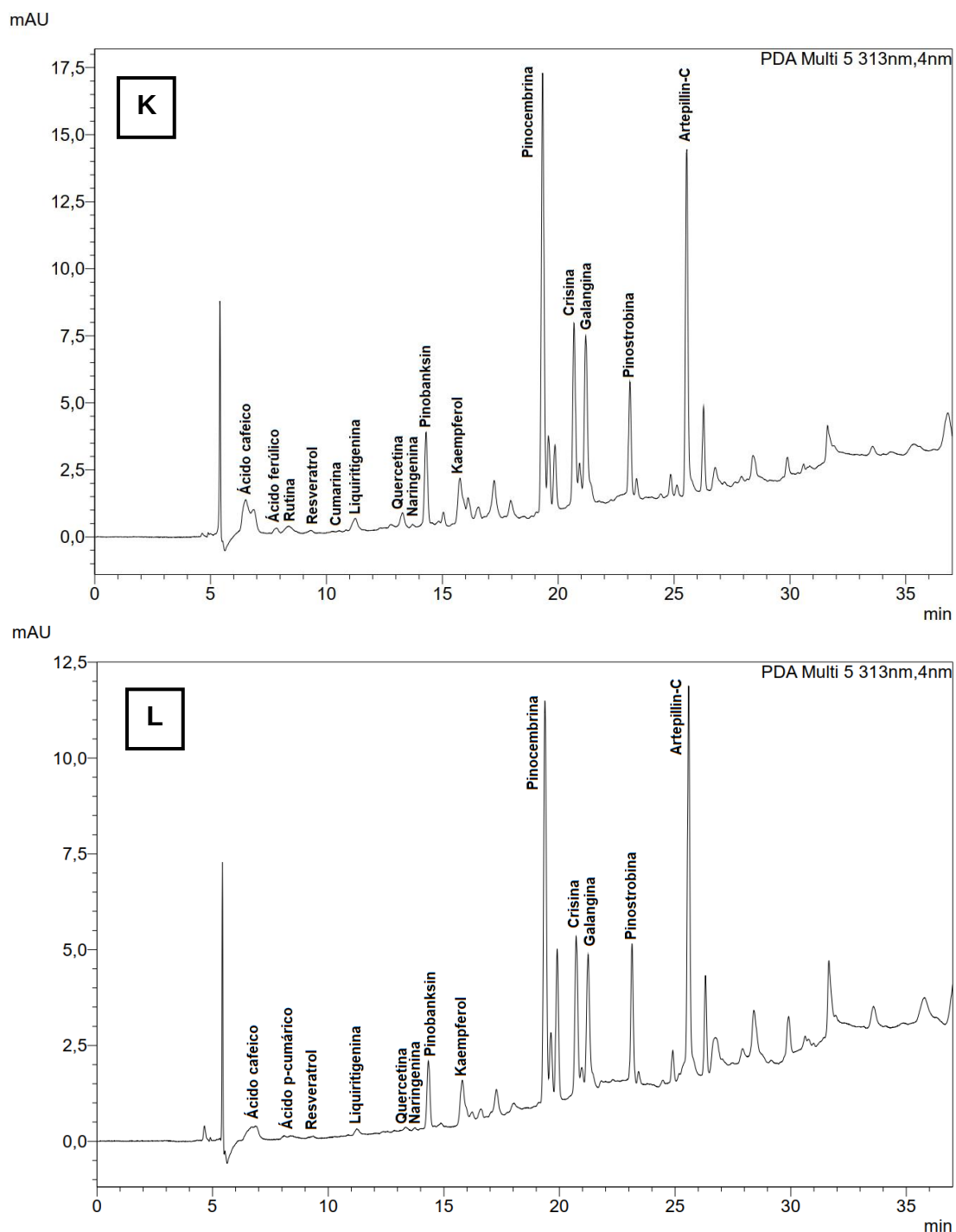


mAU









A: Setembro de 2020; **B:** Outubro de 2020; **C:** Novembro de 2020; **D:** Dezembro de 2020; **E:** Janeiro de 2021; **F:** Fevereiro de 2021; **G:** Março de 2021; **H:** Abril de 2021; **I:** Maio de 2021; **J:** Junho de 2021; **K:** Julho de 2021; **L:** Agosto de 2021.

Fonte: Autor, 2024.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Graduação – Especialização – Mestrado – Doutorado – Memorial acadêmico – Relatório científico/Pós-doutorado

Na qualidade de titular dos direitos autorais deste trabalho, concedo ao Repositório Institucional da Universidade Federal de Alagoas, doravante nomeado RI/UFAL, o direito não-exclusivo de depositá-lo em sua base de dados (<http://www.repositorio.ufal.br>) e de distribuí-lo mundialmente, na íntegra e sem ressarcimento dos direitos autorais, conforme as permissões abaixo assinaladas, como também, de acordo com a Lei n. 9.610/98, **para fins não comerciais, leitura, impressão, download e demais usos que se fizerem necessários para a divulgação da produção científica brasileira a partir desta data.**

1 Tipo do trabalho

☐	Dissertação + Produto Educacional
☒	Dissertação
☐	Tese
☐	Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)
☐	Trabalho de Conclusão de Curso (especialização)
☐	Memorial Acadêmico
☐	Relatório Científico/Pós-doutorado

2 Identificação do trabalho:

1º Autor(a)	Emanoel Guilhermino da Silva Junior
Lattes ¹	http://lattes.cnpq.br/5662408528134259
2º Autor(a) ²	
Lattes ¹	
Orientador(a)	Ticiano Gomes do Nascimento
Lattes ³ Orientador(a)	http://lattes.cnpq.br/6296388037177344
Coorientador(a)	

1 Este campo deve ser **obrigatoriamente** preenchido com o link do currículo Lattes do(a) autor(a), no caso de **relatórios científicos de pós-doutorado, trabalhos de conclusão de curso (TCC) oriundos de pós-graduação lato sensu (especialização), teses, dissertações e memoriais acadêmicos**; sendo **opcional** para TCC provenientes de cursos de graduação.

2 Em caso de coautoria (mais de um autor) ou autoria coletiva (vários autores), todos os nomes devem ser informados, assim como os respectivos currículos Lattes (informação **obrigatória** para **dissertação e tese**).

3 Este campo deve ser **obrigatoriamente** preenchido com o link do currículo Lattes do(a) orientador(a), no caso de **relatórios científicos de pós-doutorado, TCC oriundos de pós-graduação (lato sensu), TCC provenientes de graduação, dissertações e teses**. Este item **não se aplica** a memoriais acadêmicos.



Membros da Banca:

1º Membro	Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura
2º Membro	Profa. Dra. Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto
3º Membro	Profa. Dra. Salvana Priscylla Manso Costa
4º Membro	Profa. Dra. Louisianny Guerra da Rocha
5º Membro	Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Ferreira

Data da Defesa:	27 de março de 2024
------------------------	---------------------

Título do trabalho no idioma original:

VARIAÇÃO SAZONAL DA PRÓPOLIS MARROM-ESVERDEADA DE UNIÃO DOS PALMARES DURANTE 2020–2021: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Palavras-chave no idioma original:

Própolis. Compostos Fenólicos. Capacidade de Absorbância de Radicais de Oxigênio. Produtos com Ação Antimicrobiana. HPLC.

Título do trabalho em outro idioma (quando houver):

SEASONAL VARIATION OF BROWN-GREENISH PROPOLIS FROM UNIÃO DOS PALMARES DURING 2020–2021: CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

Palavras-chave em outro idioma (quando houver):

Propolis. Phenolic Compounds. Oxygen Radical Absorbance Capacity. Products with Antimicrobial Action. HPLC.



Curso de graduação/Programa de pós-graduação/Unidade:

Mestrado em Ciências Farmacêuticas/Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/Instituto de Ciências Farmacêuticas

Agência de fomento (Capes, CNPq, Fapeal, etc.) / Preencha quando houver e informe qual:

CAPES

4 Informação de acesso ao documento:

Liberação para publicação:	Total	☒
	Embargado ⁴	☐

Em caso de acesso embargado, justifique no campo abaixo:

--

5 Endereço do depositante para contato:

Logradouro:	Loteamento Jardim Santa Amélia		
Nº	16	Compl.:	QD A
		CEP:	57063-310
Cidade:	Maceió	Estado:	Alagoas
Tel.(s):	(82) 98106-5503		
E-mail:	emanoel.junior@icf.ufal.br		
Data de entrega do documento:	10 de junho de 2024		

4 O embargo poderá ser mantido por até 01 (um) ano a partir da data de entrega do documento, informada no termo de autorização, salvo o resumo e os metadados (elementos referenciais) que ficarão sempre disponibilizados, em cumprimento à Portaria nº 13/2006 da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A prorrogação do prazo do embargo deverá ser feita no transcurso do primeiro ano do embargo, sendo necessária a justificativa junto ao RI/UFAL. A falta do requerimento da prorrogação do embargo dentro do prazo mencionado resultará na liberação imediata e automática de todo o conteúdo da produção científica.



Declaro, para os devidos fins, que:

☒

O documento entregue é meu trabalho original, sobre o qual ainda detenho o direito exclusivo de dispor dos direitos autorais, sem infringir direitos de terceiros.⁵

☒

O documento fornecido se trata da versão final do trabalho, devidamente corrigida conforme as recomendações da banca examinadora (quando for o caso).

☐

O documento entregue contém material de titularidade de terceiros, para o qual foi(ram) obtida(s) a(s) devida(s) autorização(ões) do(s) detentor(es) dos direitos autorais com o fim licenciar o documento conforme as permissões atribuídas. O material de titularidade de terceiros está devidamente identificado e expresso no documento entregue.⁶

☒

O documento fornecido foi elaborado com base em trabalho financiado/apoiado por instituição de fomento, sendo todas as obrigações estipuladas no contrato ou acordo integralmente cumpridas.⁷

☒

No documento submetido não há divulgação de dados sensíveis, estando o trabalho em conformidade com as disposições da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei n. 13.709/2018).⁸

Declaro, por fim, que estou ciente de que o conteúdo submetido é de minha inteira responsabilidade.

Documento assinado digitalmente
gov.br EMANOEL GUILHERMINO DA SILVA JUNIOR
Data: 10/06/2024 19:26:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) depositante

5 Esse item deve ser assinalado quando o documento possuir apenas um(a) autor(a).

6 Esse item deve ser assinalado quando o documento possuir mais de um(a) autor(a).

7 Esse item deve ser assinalado sempre que o trabalho tiver o financiamento de alguma agência de fomento.

8 Saiba sobre o conteúdo da LGPD em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/lei/l13709.htm