



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ICF  
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUCAS ADRIEL TAVARES SANTOS

CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS COMERCIALIZADOS  
EM MACEIÓ

MACEIÓ

2020

LUCAS ADRIEL TAVARES SANTOS

CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS COMERCIALIZADOS  
EM MACEIÓ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de ciências farmacêuticas da  
Universidade Federal de Alagoas como  
requisito parcial de conclusão de Graduação  
em farmácia.

Orientador: Prof. Msc. Valdemir da Costa Silva

MACEIÓ

2020

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto –  
CRB-4 – 1767

S237c Santos, Lucas Adriel Tavares.

Controle de qualidade e atividade antimicrobiana de extratos da própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió / Lucas Adriel Tavares Santos. – 2021.  
71 f. : il. color.

Orientador: Valdemir da Costa Silva.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 60-71.

1. Controle de qualidade. 2. Própolis vermelha. 3. Fenóis. 4. Antioxidantes. 5. *Escherichia coli*. I. Título.


CDU: 615.28(813.5)

FICHA DE APROVAÇÃO

LUCAS ADRIEL TAVARES SANTOS


CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS COMERCIALIZADOS  
EM MACEIÓ

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao  
curso de Farmácia do Instituto de ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal de  
Alagoas e aprovado em 02 de Março de  
2020

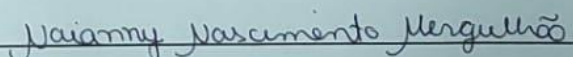


Prof. Msc. Valdemir da Costa Silva - ICF/UFAL (Orientador)

BANCA AVALIADORA



Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior - ICF/UFAL (Avaliador)



Msc. Naianny Lívia Oliveira Nascimento Mergulhão - ICF/UFAL (Avaliador)

Maceió

2020

## Resumo

A própolis é uma substância de composição complexa, de aspecto gomoso e balsâmico, rica em fenóis e flavonoides. A crescente busca por produtos naturais como alternativa aos medicamentos alopáticos, fez da própolis vermelha de Alagoas um produto cobiçado por muitos, devido a atividade biológica proveniente dos seus constituintes químicos. Nesse sentido, o elevado consumo desencadeou o aumento de produtores, assim como, desse produto no mercado, dificultando o trabalho dos órgãos fiscalizadores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar o controle de qualidade de extratos de própolis vermelha comercializados em Maceió - AL, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana desses. Os extratos hidroalcoólicos de PV (A, B, C, D e E) foram adquiridos em estabelecimentos que comercializam produtos naturais. O controle de qualidade dos extratos foi realizado quanto aos aspectos organolépticos, teor de sólidos solúveis e pH. O perfil fitoquímico foi avaliado por métodos colorimétricos determinando fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante pelos métodos Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio tal e radical DPPH, respectivamente. O espectro de absorção (UV-vis) dos extratos foram obtidos na faixa de 200 a 500nm. A avaliação antimicrobiana foi avaliada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*. Pôde-se notar que apenas três, PVC, PCD e PVE estavam registradas, das quais somente a PVE apresentou teor de extrato seco de 11 % de acordo com a orientação do MAPA. Os pHs das amostras demonstraram variação de 4,21 a 4,8. A determinação de fenóis totais revelou quantidade 120,3 mgEAG.g<sup>-1</sup> a 210,4 mgEAG.g<sup>-1</sup> para PVA e PVB, respectivamente. Para flavonoides totais notou-se variação de 27,1 mgEQ.g<sup>-1</sup> a 118 mgEQ.g<sup>-1</sup> para PVA e PVC, respectivamente, estando de acordo com a legislação vigente. A determinação da atividade antioxidante revelou que na concentração de 1 µg/mL a PVA e PVE não apresentaram diferença significativa entre si, inibindo somente 4,6 % ± 2,20 % e 6,5 % ± 0,62 %, respectivamente. Novamente a PVA obteve desempenho inferior inibindo na concentração de 40 µg/mL, apenas 65,4 % ± 1,57 %. A PVC demonstrou inibição de 50 % do radical DPP na concentração de 13,18 µg/mL. No espectro, as mostras apresentaram pico na faixa de 290 a 295 nm correspondente aos flavonoides e fenóis presentes nas estruturas dos flavonoides. As menores concentrações inibitórias mínimas pertenceram a PVC, PVD e PVE, onde inibiram *E. coli* e *S. aureus* em 15,625 µg/mL. Diante do exposto, verifica-se que todas as amostras apresentaram bom desempenho, tendo em vista que os valores estão de acordo com o MAPA, mas destacou-se das demais a PVE por ter sido a única com teor de extrato seco de 11 %, ter apresentado bom desempenho em atividade antioxidante e por ter obtido a menor CIM frente a mais de uma bactéria.

**PALAVRAS CHAVES:** controle de qualidade, própolis vermelha, compostos fenólicos, atividade antioxidante, *Escherichia coli*.

## Abstract

Propolis is a substance of complex composition, with a gummy and balsamic aspect, rich in phenols and flavonoids. The growing search for natural products as an alternative to allopathic medicines, made the red propolis from Alagoas a product coveted by many, due to the biological activity derived from its chemical constituents. In this sense, the high consumption triggered the increase of producers, as well as, of this product in the market, hindering the work of the inspection agencies. Thus, the objective of this work was to carry out the quality control of red propolis extracts sold in Maceió - AL, as well as to evaluate their antimicrobial activity. The hydroalcoholic extracts of PV (A, B, C, D and E) were purchased from establishments that sell natural products. The quality control of the extracts was carried out in terms of organoleptic aspects, soluble solids content and pH. The phytochemical profile was evaluated by colorimetric methods determining phenols, total flavonoids and antioxidant activity by the Folin-Ciocalteu methods, aluminum chloride such and DPPH radical, respectively. The absorption spectrum (UV-vis) of the extracts was obtained in the range of 200 to 500nm. The antimicrobial evaluation was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*. It was noted that only three, PVC, PCD and PVE were registered, of which only PVE had a dry extract content of 11% according to MAPA's guidance. The pHs of the samples showed a variation from 4.21 to 4.8. The determination of total phenols revealed an amount of 120.3 mgEAG.g<sup>-1</sup> to 210.4 mgEAG.g<sup>-1</sup> for PVA and PVB, respectively. For total flavonoids, there was a variation from 27.1 mgEQ.g<sup>-1</sup> to 118 mgEQ.g<sup>-1</sup> for PVA and PVC, respectively, in accordance with current legislation. The determination of antioxidant activity revealed that at a concentration of 1 µg/mL, PVA and PVE did not show any significant difference between themselves, inhibiting only 4.6% ± 2.20% and 6.5% ± 0.62%, respectively. Again, the PVA obtained a lower performance, inhibiting the concentration of 40 µg/mL, only 65.4% ± 1.57%. PVC demonstrated 50% inhibition of the DPP radical at a concentration of 13.18 µg/mL. In the spectrum, the samples showed a peak in the range of 290 to 295 nm corresponding to the flavonoids and phenols present in the structures of the flavonoids. The lowest minimum inhibitory concentrations belonged to PVC, PVD and PVE, where they inhibited *E. coli* and *S. aureus* by 15.625 µg/mL. In view of the above, it appears that all samples performed well, considering that the values are in accordance with MAPA, but PVE stood out from the others because it was the only one with a dry extract content of 11 %, having performed well in antioxidant activity and having obtained the lowest MIC against more than one bacterium.

KEY WORDS: quality control, red propolis, phenolic compounds, antioxidant activity, *Escherichia coli*.

## **Agradecimentos**

### **“Até aqui o Senhor tem me sustentado”**

Então Samuel pegou uma pedra e a ergueu entre Mispá e Sem; e deu-lhe o nome de Ebenézer, dizendo: "Até aqui o Senhor nos ajudou". 1 Samuel 7:12

Agradeço a Deus por ter cuidado de mim, pela oportunidade de ter chegado até aqui e ter cumprido todas as minhas metas com excelência.

Toda Honra e Glória devem ser dadas somente a Ti, Senhor dos senhores, o grande EU SOU, que criou os céus e a terras e tudo que neles há.

Dessa forma agradeço a todos que fizeram parte da minha pequena história:

Ao meu primeiro amor, minha mãe, Rita de Cássia Tavares Santos, dona do coração mais bondoso que um dia um ser humano possuiu. Se manteve forte e relutante, e nos momentos de dificuldade esteve sempre presente para me fortalecer, cuidar de mim, aconselhar com a sua maravilhosa sabedoria. A minha conquista é sua! Amo a senhora, mainha!

A minha avó, “dona” Luzia, minha segunda mãe e segundo amor. Agradeço por ser uma mulher de fibra, humilde, bondosa, que tanto me ensinou ao longo de todos esses anos. Ela que fica esperando a minha chegada de braços abertos. Obrigado pelo apoio e por querer sempre o melhor para mim. Amo a sra., vó!

Ao meu avô, sr. Luiz, que tinha os melhores conselhos e histórias, que sempre quando sentávamos para conversarmos, as horas pareciam curtas (*in memória*). Saudades, vô!

A minha família que sempre torceu por mim, meu irmão, todos os meus tios e tias paternos, maternos e os de coração, bem como todos os meus primos, em especial, aos meus primos Xoxinha e Samara, que estiveram comigo desde o início, compartilhando todos os momentos.

Em especial a minha tia, Dona Zefinha e minha prima Vera, por participarem ativamente da minha educação, por estarem sempre dispostas a ajudar, por tudo que a família de vocês fez pela minha.

Ao Pr. Paulo e Ana Cláudia por estarem sempre atentos a minha família e por estarem com o coração disponíveis, sempre dispostos a nos ajudar.

Aos meus tios, tio Dernival, tia Gilda e tio Josimario por terem feito parte da minha história. Com tio Dernival eu aprendi a ser manso de coração, com tia Gilda eu aprendi a amar o ser humano sem esperar receber nada em troca e com tio Josimario eu aprendi a sorrir, porque a felicidade não está nos bens temos, mas na família. (*in memoriam*). Saudades, tia e tios!

Aos irmãos da IPB, Selma, tia Adígena, Jarciete, Adelma, entre tantos outros, por cada oração, por cada palavra amiga, por estarem torcendo por mim.

Ao meu amigo irmão Toninho, que cresceu comigo, acompanhou minha evolução, bem como minhas dificuldades e apesar da distância, se mantém presente até hoje. Posso afirmar com plena convicção, existem amigos mais chegados do que irmãos.

Ao meu grande amigo Valdemir, que sempre esteve comigo compartilhando as labutas da vida, desde o início da graduação. Que me ajudou durante todo o percurso e em nenhum momento desistiu de me incentivar. Agradeço por ter aprendido muito com você, meu amigo. Espero que a nossa amizade nunca mude. Agradeço a DEUS por ter colocado um amigo tão bom como você na minha vida, “tmj véi”!

Ao meu amigo Saulo, que é parceiro para todas as horas, que sempre me apoia em tudo, que deseja sempre o melhor para mim. Agradeço a Deus por ter conhecido você, meu amigo, “tmj véi”!

Aos meus grandes amigos Mário, Vilca e o pequeno Joaquim, por terem feito parte da minha formação desde o início e pelos bons momentos vividos.

Aos meus amigos do ensino médio “Wagner beizola”, “Alex véia”, por todos os momentos bons vividos e histórias. Levo vocês no meu coração e os considero demais!

A todos que fazem parte do Labtcom que durante esses poucos anos de convivência e se fizeram presentes na construção do meu aprendendo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente somaram nessa minha pequena trajetória. Obrigado a todos!



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2. OBJETIVO GERAL.....   | 16 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 16 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 17 |
| 3.1.1. Própolis.....   | 17 |
| 3.1.2. Composição química .....  | 20 |
| 3.2. <b>Atividades biológicas</b> .....                                  | 22 |
| 3.2.1. Antioxidante .....  | 22 |
| 3.2.2. Anti-inflamatória .....   | 23 |
| 3.2.3. Antimicrobiana .....  | 23 |
| 3.2.4. Cicatrizante.....   | 24 |
| 3.2.5. Imunomodulatória .....  | 24 |
| 3.2.6. Antiparasitária .....   | 24 |
| 3.3. <b>Classificação das própolis brasileiras</b> .....                 | 25 |
| 3.3.1 Própolis Verde .....   | 26 |
| 3.3.2 Própolis Marrom.....   | 27 |
| 3.3.3 Própolis Preta .....   | 28 |
| 3.3.4 Própolis Amarela.....  | 29 |
| 3.3.5 Própolis vermelha .....  | 30 |
| 3.4. <b>Delimitação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas</b> ..... | 32 |
| 3.4.1. História.....   | 32 |
| 3.4.2. Território .....  | 32 |
| 3.4.3. Benefícios .....  | 33 |
| 3.4.4. Indicação Geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas .....        | 33 |
| 3.5. <b>Produtos Naturais</b> .....                                      | 34 |
| 3.5.1. Própolis um produto natural emergente .....                       | 35 |
| 3.5.2 Controle de qualidade de produtos naturais .....                   | 36 |
| 3.5.2.1. Cromatografia gasosa.....                                       | 37 |
| 3.5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência .....                  | 37 |
| 3.5.2.3. Espectrofotometria por UV-Vis.....                              | 37 |
| 3.6. <b>Controle de qualidade da própolis vermelha</b> .....             | 38 |
| 3.6.1. Exame organoléptico .....   | 38 |
| 3.6.1. Perda por dessecação em balança IV .....                          | 38 |
| 3.6.2. Métodos cromatográficos.....                                      | 39 |
| 3.6.3. Métodos espectrofotométricos .....                                | 39 |
| 3.6.4. Principais análises físico-químicas .....                         | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>4. METODOLOGIA</b> .....  | 42 |
| 4.1. Obtenção e caracterização organoléptica dos extratos hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPVA) ..... | 42 |
| 4.1.1. Determinação do Potencial Hidrogeniônico - pH.....  | 42 |
| 4.1.2. Determinação de sólidos solúveis.....   | 42 |
| 4.1.3. Perfil fitoquímico dos EHPVA.....   | 42 |
| 4.1.5. Espectro UV-vis .....   | 42 |
| 4.1.6. Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....                                      | 43 |
| 4.1.7. Teor de fenóis totais dos EHPVA.....  | 43 |
| 4.1.8. Determinação do teor de flavonoides totais .....  | 44 |
| 4.1.9. Teor de flavonoides dos extratos de própolis vermelha de alagoas....  | 44 |
| 4.1.10. A atividade sequestrante do radical DPPH .....   | 45 |
| 4.1.11. Atividade Antimicrobiana.....  | 46 |
| 4.1.12. Análises estatísticas.....   | 47 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....  | 48 |
| 5.1. Embalagens e rotulagens .....   | 48 |
| 5.1.1. Características organolépticas.....   | 48 |
| 5.1.2. Determinação do Potencial Hidrogeniônico - pH.....  | 49 |
| 5.1.3. Determinação da umidade e teor de sólidos solúveis .....  | 50 |
| 5.1.4. Determinação do conteúdo de fenóis e flavonoides totais .....   | 51 |
| 5.1.5. Atividade sequestrante do radical DPPH .....  | 53 |
| 5.1.6. UV-vis .....  | 55 |
| 5.1.7. Atividade Antimicrobiana.....   | 56 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 60 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 61 |

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Classificação da própolis brasileira quanto ao grupo, cor, substâncias solúveis, origem e classes químicas. ....  | 19 |
| <b>Tabela 2.</b> Indicação geográfica da Própolis vermelha de Alagoas.....   | 34 |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros adotados para o controle de qualidade do extrato própolis vermelha.....  | 41 |
| <b>Tabela 5.</b> Peagâmetria dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió. ....  | 50 |
| <b>Tabela 6.</b> Teores de umidade e sólidos solúveis dos extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió.....  | 50 |
| <b>Tabela 7.</b> Conteúdos de fenóis totais encontrados em amostras de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas comercializada em Maceió. ..                                 | 52 |
| <b>Tabela 8.</b> Conteúdos de flavonoides totais encontrados em amostras de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas comercializada em Maceió. ..                            | 53 |
| <b>Tabela 9.</b> Curvas padrão dos EHPVA como agentes antioxidantes frente ao radical DPPH, expressos em percentual de atividade antioxidante em função da concentração dos extratos. .... | 55 |
| <b>Tabela 10.</b> Espectros de absorção na região UV-vis dos extratos da própolis vermelha de Alagoas (PVA, PVB, PVC, PVD e PVE). ....   | 56 |
| <b>Tabela 11.</b> Concentração inibitória mínima dos extratos de própolis vermelha frente a microorganismos gram positivos e gram negativo. ....   | 58 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Amostra de própolis marrom (A), verde escura (B), verde seiva (C), laranja (D) e marrom escura (E).....   | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura química básica dos flavonoides e derivados.....   | 21 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura do 3-prenilcinamato de alila. ....  | 27 |
| <b>Figura 4.</b> Estruturas químicas de importantes constituintes da própolis marrom brasileira.....   | 28 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura química do ácido 3,4-dihidroxibenzoico, componente majoritário da própolis preta.....   | 29 |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura química do mirtenol (A), alfa-terpineol (B), 1-trans-pinocarveol (C), verbenona (D), viridiflorol (E), spatulenol (F), (+) - aromadendreno (G).....   | 30 |
| <b>Figura 7.</b> <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , Inflorescência panícula, multiflora (A); <i>Apis melífera</i> coletando exsudato (B) e (C); <i>Apis melífera</i> vendando frestas da colmeia (D); Própolis bruta (E). .... | 31 |
| <b>Figura 8.</b> Características visuais dos extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió. ....  | 49 |
| <b>Figura 9.</b> Curvas padrão. Para fenóis totais (9-A) e para flavonoides totais (9-B). ....   | 51 |

## **Siglas**

CIM – Concentração inibitória mínima;

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;

EHPVA - Extratos hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas;

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

PVA - Própolis vermelha A;

PVB - Própolis vermelha B;

PVC - Própolis vermelha C;

PVD - Própolis vermelha D;

PVE - Própolis vermelha E;

UV-VIS - Ultravioleta – visível;

IV- Infravermelho.

## 1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância química natural de composição complexa. É produzida por diversas espécies de abelhas. A própolis vermelha de alagoas (PVA) foi classificada como a 13ª própolis brasileira e a última a ser descoberta. É produzido pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, e tem sua origem botânica oriunda da *Dalbergia ecastophyllum*, dessa forma, é considerada um opoterápico.

Alguns grupos químicos encontrados nas própolis brasileiras, como os fenóis e flavonoides (antocianidinas, flavonas, flavonóis, auronas, chalconas, isoflavonas) são responsáveis pelas atividades biológicas. A PVA destaca-se por possuir constituintes químicos exclusivos das demais, do tipo isoflavona (dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, 4,7-dimethoxi-2-isoflavona e medicarpina) que confere atividades biológicas como: antioxidante, anticâncer, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária. A presença desses compostos a torna diferente de todas as própolis estudadas até o momento.

Nesse cenário, o uso da própolis vermelha surge como alternativa preventiva de terapias que utilizam medicamentos alopáticos, que na maioria das vezes provocam efeitos colaterais. Dessa maneira, a torna um produto natural emergente, com grande potencial medicinal, visto que lhes são atribuídas propriedades bioativas e ausência de problemas relacionados ao seu uso.

Nesse sentido, a sociedade contemporânea tem como predileção a saúde, e é justamente por essa razão que tem sido mais frequente o interesse em adotar o uso de produtos naturais associados a uma alimentação saudável e equilibrada, visando ação preventiva e curativa (DIPIERRI, 2004; OMS, 2013 Apud REDONDO). No entanto, alguns produtos naturais são comercializados sem registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o que torna duvidosa a eficácia e segurança, uma vez que controle de qualidade de produtos naturais apresenta lacunas no ponto de vista quantitativo para fiscalização.

Dessa forma, para a própolis, o mapa preconiza testes de controle de qualidade: análises sensoriais de aroma, sabor, cor, flavor; testes físico-químicos como teor de umidade, sólidos solúveis e pH; técnicas como espectrofotometria

UV (métodos para determinação de fenóis e flavonoides totais), percentual de inibição do reagente , 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - DPPH, e teste antimicrobiano.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho tem como finalidade a realização de perfil de qualidade e atividade antimicrobiana de extratos da própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de qualidade de extratos da própolis vermelha comercializados em Maceió e ação antimicrobiana.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- **Verificar se as embalagens e rotulagens estão de acordo com a legislação.**
- **Caracterização organoléptica:**  
Cor, aroma, sabor, homogeneidade;
- **Caracterização físico-química:**  
Determinação do Potencial Hidrogeniônico – pH;  
Determinação da perda de umidade em balança por dessecação UV.
- **Perfil fitoquímico:**  
Espectro UV-vis;  
Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais;  
Atividade sequestrante do radical DPPH.
- **Atividade antimicrobiana dos EHPVAs**



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1.1. Própolis

A palavra própolis deriva do grego onde “pro” significa para ou em “prol” e “polis” comunidade. Dessa forma, as abelhas a utilizam para proteger a colmeia, reparar frestas e embalsamar invasores ou abelhas mortas (“Se não é possível remover uma abelha morta de dentro da colmeia, as outras a embalsamam para preservar a saúde de todas”) (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Desse modo, a própolis é considerada como uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores. Além desses, na colmeia as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (FRANCO *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002; *apud* LUSTOSA, 2008. Nesse sentido, é conceituada como a mais importante "arma química" das abelhas contra os microrganismos e agentes patogênicos (BANKOVA, 2005).

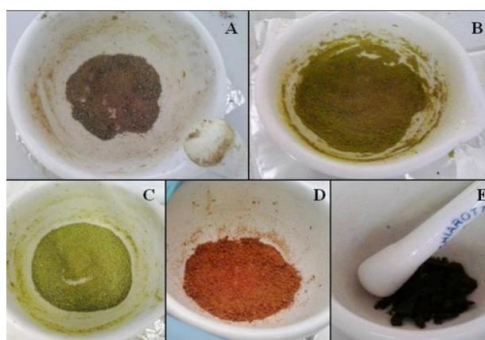
O uso da própolis é muito antigo, os primeiros relatos de sua utilização datam do antigo Egito e Mesopotâmia. Seu emprego foi relatado no papiro de Ebers, escrito em 1700 a.C. No antigo Egito era utilizada para embalsamar os mortos no processo de mumificação (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011). Os gregos e romanos a aplicavam em feridas e contusões. Na Idade Média foi utilizada como antisséptico e cicatrizante para o tratamento de feridas. Os Incas a administravam como um agente antipirético (TORETI *et al.*, 2013), infecções de gargantas e enfermidades dentários (FERRO, 2006 *apud* FRANCO, 2011). A partir do século XVII a própolis se tornou muito popular na Europa devido a sua atividade antibacteriana (TORETI *et al.*, 2013). Na África do Sul, na guerra, ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (PEREIRA *et al.*, 2002). No continente Europeu, América do Norte e Oeste da Ásia, a origem botânica dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus sp.*). Entretanto, na América do Sul, existe uma grande diversidade vegetal que possibilita grande variedade de própolis, de acordo com

a fonte botânica consultada para extração da matéria prima (PARK *et al*, 2002; LACERDA; TIVERON; ALENCAR, 2011).

Dessa forma, existem diversos tipos de própolis brasileira, incluindo própolis verde, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela, própolis vermelha, e a geoprópolis. Segundo KERR (1987), as abelhas da espécie *Melipona fasciculata* Smith coleta material resinoso das plantas e traz para sua colmeia, mistura com cera e barro ou terra, formando a geoprópolis.

As própolis brasileiras são diferenciadas pela cor, odor e consistência e, suas características estão associadas à planta de origem e à espécie de abelha produtora (Luz; Fraga, 2016). Já foram identificadas algumas plantas que as abelhas visitam para a produção de própolis, como o assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), a aroeira (*Schinus molle* L.), o eucalipto (*Eucalyptus*) e o alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), fonte botânica da própolis verde (CORDEIRO *et al.*, 2015). Sendo assim, os tons de própolis (Ver fig. 1) podem variar desde o amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro (KAWAKITA *et al.*, 2015). De acordo com os autores PARK *et al*, (2000) e COSTA *et al*, (2013) foi possível classifica-las (Ver tab. 1) quanto ao grupo, cor, substâncias solúveis, origem e classes químicas.

**Figura 1.** Amostra de própolis marrom (A), verde escura (B), verde seiva (C), laranja (D) e marrom escura (E).



Fonte: FERREIRA 2015; *apud* SILVA, (2018).

**Tabela 1. Classificação da própolis brasileira quanto ao grupo, cor, substâncias solúveis, origem e classes químicas.**

| Extrato Etanólico de Própolis |                            |                          |                                   |   |  |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Grupos*                       | Cor                        | Substâncias Solúveis (%) | Origem da própolis                | Classes Químicas  | Autor  |
| Grupo 1                       | Amarelo                    | 63                       | Sul do país (RS)                  | Ácido murônico, mirtenol, 1-alfa terpineol, junipeno, 1-transpinocarveol, verbenona, viridiflorol, spatulenol, (+)-aromadendreno  | ALENCAR, (2002).   |
| Grupo 2                       | Castanho Claro             | 57                       | Sul do país (RS)                  | -   | PARK <i>et al.</i> , (2000); COSTA <i>et al.</i> , (2013).   |
| Grupo 3                       | Castanho Escuro            | 65                       | Sul do país (PR)                  | -   | PARK <i>et al.</i> , (2000); COSTA <i>et al.</i> , (2013).   |
| Grupo 4                       | Castanho Claro             | 54,5                     | Sul do país (PR)                  | -   | PARK <i>et al.</i> , (2000); COSTA <i>et al.</i> , (2013).   |
| Grupo 5                       | Marrom esverdeado          | 58,7                     | Sul do país (PR)                  | Ácido oleico, ácido linoleico, palmitato, polifenóis, ácido cumárico, flavonoides artepilina C,   | KIMOTO <i>et al.</i> , (2001); SHIMIZU <i>et al.</i> , (2004.); MACHADO <i>et al.</i> , (2016)   |
| Grupo 6                       | Marrom avermelhado         | 45,9                     | Nordeste do país (BA)             | Ésteres de ácidos graxos, anéis aromáticos, terpenoides e flavonoides   | PARK <i>et al.</i> , (2000); COSTA <i>et al.</i> , (2013).   |
| Grupo 7                       | Marrom esverdeado          | 43,8                     | Nordeste do país (BA)             | -   | PARK <i>et al.</i> , (2000); COSTA <i>et al.</i> , (2013).   |
| Grupo 8                       | Castanho Escuro            | 41,3                     | Nordeste do país (PE)             | -   | PARK <i>et al.</i> (2000); COSTA <i>et al.</i> (2013).   |
| Grupo 9                       | Amarelo                    | 46,7                     | Nordeste do país (PE)             | Hisperetina, ácido cumárico   | ALENCAR, (2002).   |
| Grupo 10                      | Amarelo Escuro             | 24,1                     | Nordeste do país (CE)             | Ácido cumárico  | ALENCAR, (2002).   |
| Grupo 11                      | Amarelo                    | 23,1                     | Nordeste do país (PI)             | Apigenina, ácido cumárico   | ALENCAR, 2002).  |
| Grupo 12                      | Verde ou marrom esverdeado | 61                       | Sudeste do país (SP)              | 3-prenilcinamato de alila, ácidos fenólicos, nerolidol, germacreno-d, artepilina C, ácidos cumárico e ferúlico, Ácido p-cumárico, flavonóides   | NEGRI <i>et al.</i> , (2003); SIMÕES <i>et al.</i> , (2004).   |
| Grupo 13                      | Vermelha                   | -                        | Nordeste do país (AL, BA, PB, SE) | Flavonoides: pinocem-brina, formononetina, rutina, quercetina, dal-bergina, dihidroxiisoflavona, homopterocarp 4,7-dimethoxi-2-isoflavona medicarpina; ácidos fenólicos (ácido felúrico); isoflavonas: (dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'- isoflavona); gutiferonas e terpenos; Isoflavonoides: formononetina, medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina e daidzeína; galangina ácido feniléster caféico | OTA <i>et al.</i> (2001); DAUGSCH <i>et al.</i> , (2007); ALENCAR <i>et al.</i> , (2007); SILVA <i>et al.</i> , (2008); SIQUEIRA, (2008); MENDONÇA <i>et al.</i> , (2015). |

Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, (2000); COSTA *et al.*, (2013).

### 3.1.2. Composição química

De modo geral, a própolis contém 50 – 60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (Burdock, 1998; Woisky *et al.*, 1998 Park *et al.*, 2002, *apud* LUSTOSA, 2008).

A literatura científica evidencia mais de trezentas substâncias identificadas em própolis: os flavonoides (galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), além dos aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ZHANG *et al.*, 2014; SALGUEIRO, CASTRO 2016), (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico), ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, alcoóis, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides e proteínas (ROCHA *et al.*, 2003; OZKUL *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; *apud* LUSTOSA, 2008; SALGUEIRO, CASTRO, 2016).

Os flavonoides (Ver fig. 2) são compostos presentes no reino vegetal, um dos mais importantes grupos farmacológicos encontrados no chá verde (*Camellia sinensis*) e na própolis, o seu percentual irá depender da região onde é coletada (VIEIRA, 2008; SOHRABI, DARABI, 2016). Segundo Ferreira *et al.* (2008), os compostos fenólicos são produtos orgânicos produzidos pelos vegetais cujas funções estão ligadas a proteção contra fatores externos como radiação, ataques de microorganismos, coloração em flores por exemplo, como forma de atração de polinizadores e, dessa forma, não estão ligados as funções primárias das plantas, como: respiração, transporte de solutos, fotossíntese, entre outras funções

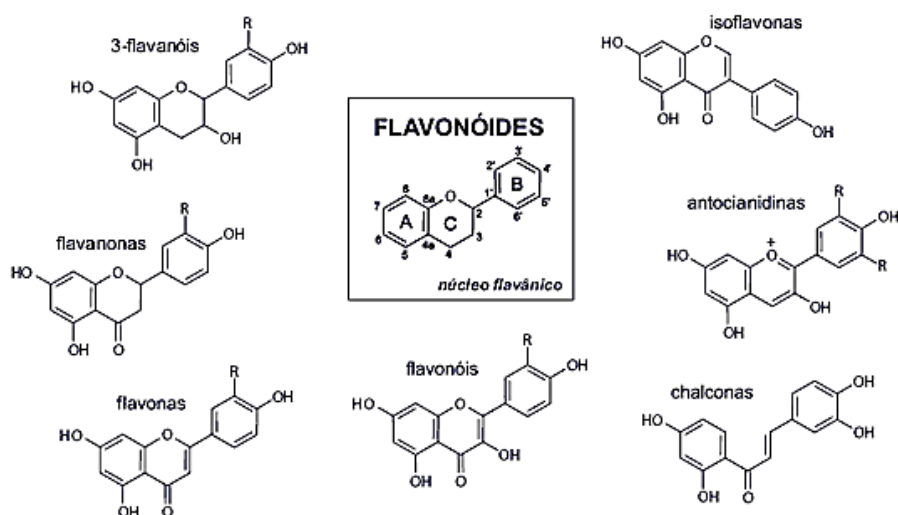
A atividade antioxidante é atribuída aos radicais fenólicos presente na estrutura dos flavonóides e, dessa forma, é uma das diversas propriedades biológicas, as quais é característica da própolis, (OLIVEIRA, ESPESCHIT, PELUZIO, 2006), mas também, pode-se atribuir a esses compostos, outras atividades, como: ação anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, antialérgica e

vasodilatadora, que por sua vez, estão associados à prevenção de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares (BATISTA *et al*, 2012).

A estrutura química dos flavonóides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos (Ver fig 2). O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (AHERNE, O'BRIEN, 2002).

Dependendo do número, lugar e combinação dos grupamentos participantes da molécula, os flavonóides podem ser classificados em: antocianidinas, flavonas, flavonóis, auronas, chalconas, isoflavonas, flavononas, catequinas e dihidroflavonois (OLIVEIRA, ESPESCHIT, PELUZIO, (2006).

**Figura 2.** Estrutura química básica dos flavonoides e derivados.



Fonte: SOHRABI, DARABI, (2016).

À vista disso, esses compostos químicos são responsáveis por uma gama de propriedades biológicas, tais como: antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV, anticariogênica, dentre outras (BATISTA *et al*, 2012).

## 3.2. Atividades biológicas

### 3.2.1. Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes serem enzimáticos ou não enzimáticos, tais como:  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonoides) (HALIWELL, 2001; SOUSA *et al.*, 2007).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Os radicais livres são formados espontaneamente por processos metabólicos no nosso organismo em quantidades moderadas, porém, a produção em excesso resulta no estresse oxidativo e consequente dano potencial. O detrimento oxidativo das biomoléculas está relacionado com surgimento de patologias, tais como: doenças crônicas neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (WISEMAN *et al.*, 2001; LIAO *et al.*, 2001; JAVANMARDI *et al.*, 2002; LU & YEAP, 2002; KIM *et al.*, 2003; MENDEL & YOUNG, 2004).

Portanto, sabendo que os Flavonóides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes nos diversos tipos própolis, é possível fazer uma correlação entre o alto conteúdo de flavonóides totais e compostos fenólicos e a atividade anti-radicais livres em extratos de própolis, sobretudo, na própolis vermelha de Alagoas (AHN *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a atividade antioxidante dos fenóis está intimamente ligada às suas propriedades de oxirredução, que permitem agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio singlete (SOUSA *et al.*, 2007; GUERRA, 2001).

### 3.2.2. Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória observada na própolis parece ser devida à presença de flavonoides, especialmente galangina. Este flavonoide apresenta atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. Tem sido relatado também que o ácido feniléster caféico, possui atividade anti-inflamatória por inibir a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (BORRELLI *et al.*, 2002).

A própolis tem demonstrado ação anti-inflamatória também por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC *et al.*, 2005).

### 3.2.3. Antimicrobiana

Estudos apontam que a própolis (ou os seus derivados) apresenta toxicidade contra células procariontas, bactérias gram-positivas (AZEVEDO *et al.*, 1986; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2000; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2005; KHALIL, 2006 *apud* JUNIOR *et al.*, 2012).

Em estudo realizado, amostras de própolis vermelha brasileira da região Nordeste apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159), bem como, o extrato etanólico na concentração de 1%, inibiu também os microrganismos *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, o que demonstra uma maior atividade da própolis vermelha da região alagoana (DAUGSCH *et al.* 2007; ALENCAR *et al.* 2007).

Entretanto, não se tem dados que respondam o porquê desta menor atividade dos extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas. Estas bactérias possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e um teor lipídico maior, o que pode explicar essa maior resistência (VARGAS *et al.*, 2004).

O mecanismo de atividade antibacteriana da própolis é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonoides, hidroxíácidos e sesquiterpenos, no entanto, o mecanismo ainda não foi bem elucidado (KROL *et al.*, 1993 *apud* JUNIOR *et al.*, 2006).

#### **3.2.4. Cicatrizante**

Quando ingeridos, os flavonoides e ácidos fenólicos interferem em alguns processos fisiológicos do organismo, como a absorção de ferro e de vitaminas, e estimulam a cicatrização tissular, e, além disso, possuem ação regenerativa de cartilagens e ossos (ARVOUET-GRAND *et al.*, 1994; CHEN; ZANG; XIE, 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006 *apud* VIEIRA, 2008).

Foi demonstrado que os ferimentos tratados com própolis apresentaram menos inflamação e mais rápida cicatrização do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY *et al.*, 2002).

#### **3.2.5. Imunomodulatória**

Sy *et al.* (2006) evidenciaram que o tratamento com extrato de própolis atenua as inflamações das vias aéreas em ratos, provavelmente por sua habilidade em modular a produção de citocina. Sendo assim, seria um novo agente no tratamento da asma. Assim como também, ORSOLIC *et al.* (2004) ratificaram que derivados hidrossolúveis de própolis, ácido caféico, éster feniletil do ácido caféico e quercetina poderiam ser extremamente úteis no controle do crescimento tumoral em modelos experimentais.

Portanto, nos últimos anos muitos estudos têm demonstrado a atividade da própolis no sistema imunológico (ativando macrófagos, aumentando a atividade lítica contra células tumorais, estimulando anticorpos, etc) como apresentado numa extensa revisão realizada por SFORCIN, (2000), todavia, cita que os mecanismos envolvidos na quimioprevenção ainda não são completamente conhecidos.

#### **3.2.6. Antiparasitária**

Os estudos envolvem a própolis coletada em apiários dos Estados de Sergipe, Pernambuco e Alagoas, entre os anos de 2007 e 2018 e tratam-se em sua maioria de estudos *in vitro*. DANTAS *et al.*, (2006). Os estudos são direcionados a atividade antiprotozoária, mais especificamente aos causadores da leishmaniose (*Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, e *L. i. chagasi*) e da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e um estudo relatou atividade contra o *Trichomonas vaginalis* (MERGULHÃO, 2019).



O extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (EEPV, continha alta concentração de compostos prenilados e benzofenônicos, e dessa forma foi o extrato mais ativo contra a *Leishmania amazonensis*, quando comparado aos extrato etanólico de própolis verde do Estado. Estudo realizado sugere que os constituintes da própolis intensificam o mecanismo de ativação macrofágica, levando à morte de *L. amazonensis*, e não por uma ação direta sobre a viabilidade do parasito (AYRES, MARCUCCI, GIORGIO, 2007).

De forma oposta, o extrato hidroalcoólico de própolis verde do estado de Sergipe apresentou efeito direto sobre a viabilidade das promastigotas da *L. amazonensis* e valor de IC<sub>50</sub> de 9,73 µg/mL (após 24 horas). Os marcadores da própolis vermelha de Sergipe foram as isoflavonas, formononetina, biochanina - A, daidzeína - 22 e pinocembrina, o que pode explicar os diferentes resultados entre própolis de um mesmo tipo (ARAUJO *et al.*, 2018).

### **3.3. Classificação das própolis brasileiras**

Diversos tipos de própolis brasileiras (própolis verde, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela e vermelha, descoberta recentemente) foram catalogadas e subdivididas em 13 grupos, de acordo com a transição de tonalidade, odor e consistência.

- A própolis verde provém de ápices vegetativos da planta *Baccharis Dracunculifolia* (alecrim-do-campo) (BASTOS; OLIVEIRA, 2000);
- A própolis marrom pode ser encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Possui atividade antimicrobiana e antioxidante e é oriunda das plantas de origem botânica “alecrim-do-campo” (*B. dracunculifolia*) e “assa-peixe” (*Vernonia polyanthes*) (HEIMBACH *et al.* 2016);
- A própolis preta é fabricada pelas abelhas a partir de resina coletada da planta denominada Jurema Preta (*Mimosa Hostilis benth*) (SILVA *et. al*, 2012);
- A própolis amarela é comum no Mato Grosso do Sul, em geral possui baixos teores de compostos fenólicos e flavonoides (substâncias responsáveis pelas principais propriedades atribuídas a própolis) (ALENCAR, 2002).

- A própolis vermelha deriva de exsudados resinosos da planta *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio) (OLIVEIRA; BASTOS, 1998; SILVA *et al.*, 2008);

### 3.3.1 Própolis Verde

A própolis do arbusto alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), conhecida também como própolis verde (Ver tab. 1) pertencente ao grupo 12, é produzida dos ápices vegetativos desta planta que é invasora da flora nativa em várias regiões do Brasil (BASTOS; OLIVEIRA, 2000).

A coloração da própolis verde está relacionada a presença de clorofila coletada pelas abelhas em tecidos jovens de *B. dracunculifolia*, a qual é uma espécie pertencente à família *Asteraceae*, sendo encontrada no Brasil (Sul, Sudeste e nordeste) (FUKUDA *et al.*, 2006).

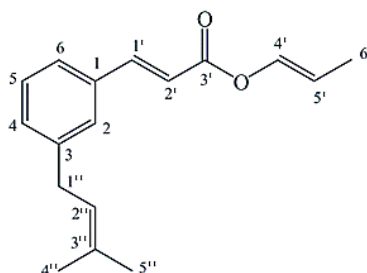
Ferreira e colaboradores (2017) descobriram recentemente no Rio Grande do Norte, um tipo de própolis que possui alto teor de flavonoides e substâncias fenólicas (flavonóis e chalconas). Trata-se de um tipo de própolis verde de aroma e composição química característica, que a difere das demais própolis verdes encontradas nas regiões sul, sudeste e nordeste do país. Análises revelaram uma semelhança entre o perfil químico dessa própolis com as de origem botânica advinda dos ápices de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*).

A própolis verde brasileira, produzida em São Paulo e Minas Gerais é constituída de mono e sesquiterpenos, bem como, derivados prenilados do ácido p-cumárico e possui grande quantidade de flavonoides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES *et al.*, 2004; SALATINO *et al.*, 2005).

Além disso, artepilina C, baccharina e drupanina, ácidos cumárico e ferúlico, bem como os flavonoides pinobanksina, isosakuretina e kaempferídeo também foram identificados em própolis verde (SIMÕES *et al.*, 2004). Sendo, portanto, atribuída a própolis desse grupo a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, destacando-se como a atividade farmacológica mais conhecida popularmente e comprovada cientificamente (BASTOS *et al.*, 2011).

Esse tipo de própolis possui um marcador químico (Ver fig. 3) 3-prenilcinamato de alila, que por sua vez foi isolado do extrato clorofórmico da própolis verde e se trata do composto majoritário, além do nerolidol e o germacreno-d (NEGRI *et al.*, 2003).

**Figura 3.** Estrutura do 3-prenilcinamato de alila.



Fonte: NEGRI *et al.*, (2003).

### 3.3.2 Própolis Marrom

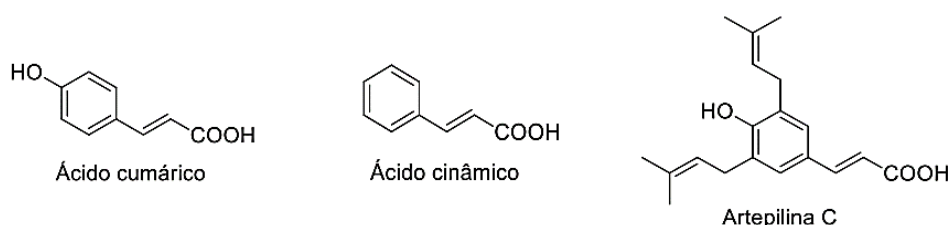
A própolis marrom, pertencente aos grupos 5, 6, 7 e 12 (Ver tab. 1), é a mais comum produzida e estudada em outros países, porém, a brasileira com essa tonalidade é a menos estudada. Esta, contém elevada concentração de ácidos graxos como ácido oleico, ácido linoleico, palmitato, estearato, e também compostos polifenólicos, principalmente derivados do ácido cumárico, cinâmico e flavonoides (CASTRO *et al.*, 2009).

Machado *et al.*, (2016) destaca (Ver fig. 4) a estrutura química dos principais marcadores da própolis marrom proveniente do Paraná e Santa Catarina, evidenciando a artepilina C e ácido cumárico, porém em nesse tipo de própolis as concentrações desses compostos foram encontrados em percentual inferior do que as observadas em própolis verde.

Os primeiros relatos da determinação desta substância como biomarcador da própolis brasileira foram publicados por 12 pesquisadores japoneses, sendo que nestes estudos a artepilina C foi identificada como o principal composto bioativo e responsável pelas atividades antitumoral, antiviral, anti-inflamatória e

antifúngica (KIMOTO *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2004). Além disso, esta substância possui atividade analgésica e antioxidante (PAULINO *et al.*, 2008).

**Figura 4.** Estruturas químicas de importantes constituintes da própolis marrom brasileira.



Fonte: MACHADO *et al.*, (2016).

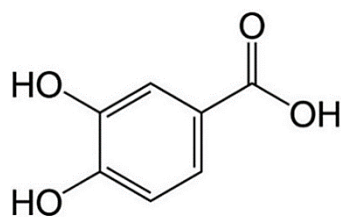
### 3.3.3 Própolis Preta

Considerada uma árvore arbustiva pertencente à família Fabaceae, da ordem das Fabales típica da caatinga, a jurema, ocorre praticamente em quase todo Nordeste brasileiro (SILVA *et al.*, 2012). Em virtude do clima nordestino, esse arbusto flora quase todo o ano facilitando sua exploração com a produção da própolis. Por sua vez, a literatura oferece raros relatos de suas propriedades farmacológicas exploradas, e em especial com a própolis preta, proveniente da Jurema preta (ARAÚJO *et al.*, 2008; SILVA, 2012).

Portanto, a própolis preta é fabricada a partir da resina da planta denominada Jurema Preta (*Mimosa Hostilis benth*). É uma árvore presente praticamente em quase todo nordeste brasileiro. A literatura científica evidencia poucos relatos sobre esse tipo de própolis (APIS BRASIL, 2018).

Os compostos químicos que apresentaram maiores concentrações na própolis preta na foram o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Ver fig. 5) (14,19 mg/mL), a Rutina (12,71 mg/mL), o ácido transcinâmico (6,25 mg/mL), sendo esses responsáveis por atividade antioxidante e antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

**Figura 5.** Estrutura química do ácido 3,4-dihidroxibenzoico, componente majoritário da própolis preta.



Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

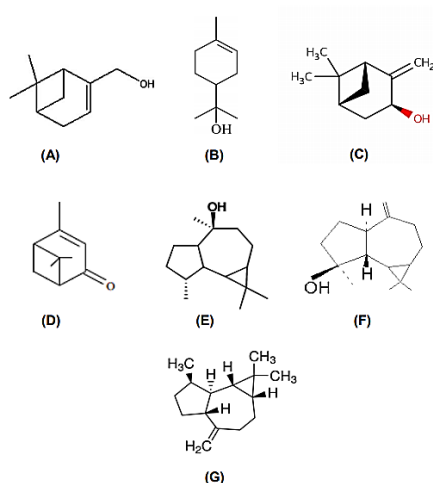
Também foram detectadas presenças de compostos flavanoides tais como: a miricetina, kaempferol, quercetina, crisina e naringerina, as quais atuam como à captura/eliminação de radicais livres, quelação de metais e inibição da peroxidação lipídica, que são responsáveis pelos danos oxidativos de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, sendo consideradas agentes antioxidantes (BACH, 2017).

### 3.3.4 Própolis Amarela

A própolis amarela classificada como própolis dos grupos 1, 9, 10, 11 (Ver tab. 1) é comum no Mato Grosso do Sul e, em geral possui baixos teores de compostos fenólicos e flavonoides (substâncias responsáveis pelas principais propriedades atribuídas a própolis) (APIS BRASIL, 2018)

Segundo ALENCAR (2002), na própolis amarela do grupo 1 não foi identificado nenhum flavonoide, e as própolis amarelas dos grupos 9, 10 e 11 apresentaram poucos compostos fenólicos e, os teores encontrados não excederam 1,2 mg/g. A própolis amarela do grupo 1 apresentou vários terpenóides (Ver fig. 6) na sua composição, como por exemplo ácido mirtenol, 1-alfa terpineol, verbenona, viridiflorol, spatulenol, (+)- aromadendreno, além de ácido murônico, junipeno e 1-trans-pinocarveol, que não foram encontrados em nenhum outro grupo de própolis (ALENCAR, 2002). Silva, (2016) e colaboradores identificaram também triterpenóides, principalmente lupeol e  $\beta$ -amirina.

**Figura 6.** Estrutura química do mirtenol (A), alfa-terpineol (B), 1-trans-pinocarveol (C), verbenona (D), viridiflorol (E), spatulenol (F), (+) -aromadendreno (G).



Fonte: BARRERA *et al.*, (2008); BHATIA *et al.*, (2008); SOUZA *et al.*, (2011).

KOLC, (2014) encontrou na própolis amarela do Mato Grosso do Sul, baixos teores de compostos fenólicos e flavonoides, estando em correlação com o que APIS BRASIL, (2018).

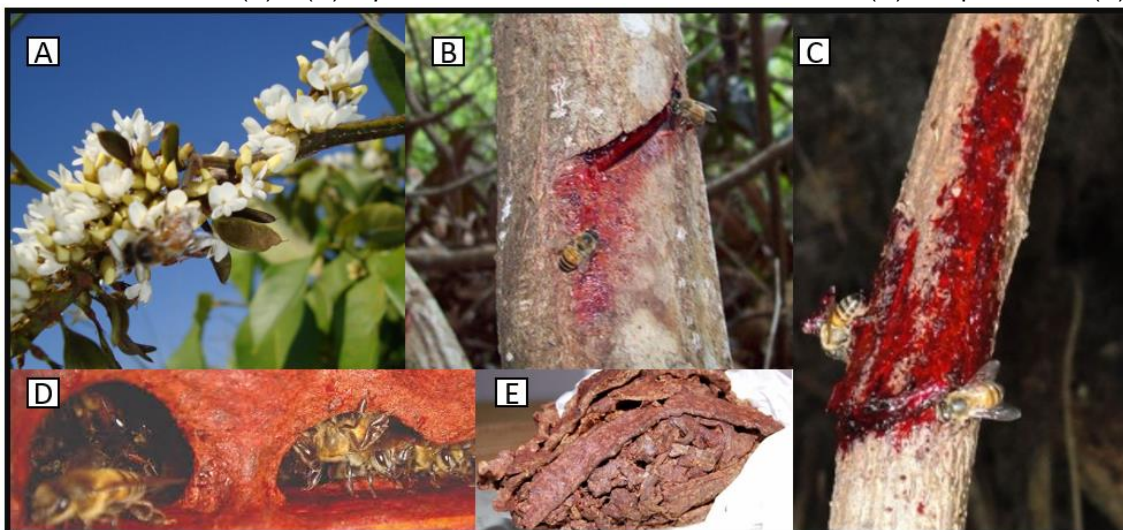
### 3.3.5 Própolis vermelha

A própolis vermelha de Alagoas é matéria-prima comum produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera*. É encontrada em áreas de mangue em Alagoas, Brasil, e a principal fonte botânica é o rabo de bugio (*Dalbergia ecastophyllum*). De acordo com a classificação brasileira da própolis, a PVAL é classificada como pertencente ao 13º grupo e pode ser diferenciada das demais própolis, devido à presença de compostos fenólicos como: isofavonas, chalconas, isofavonas, pterocarpanos, terpenos, benzofenonas polipreniladas (guttiferonas), taninos condensados, e outros (NASCIMENTO *et al*, 2018)

O exsudato extraído (Ver fig. 7) pelas abelhas é usado na produção da própolis vermelha de Alagoas. Destaca-se por ser uma espécie bastante eficiente na polinização das plantas e na elaboração de mel, geleia real, cera e própolis. De cada colmeia pode-se coletar entre 100 a 300 gramas de própolis por ano (PEREIRA *et al*, 2003 *apud* SILVA, 2017).

**Figura 7.**

**Figura 7.** *Dalbergia ecastophyllum*, Inflorescência panícula, multiflora (A); *Apis mellífera* coletando exsudato (B) e (C); *Apis mellífera* vendando frestas da colmeia (D); Própolis bruta (E).



Fonte: autor, 2020.

A própolis é considerada um opoterápico, que significa medicamento obtido a partir de glândulas, órgãos, tecidos e secreções de animais (PORTILHO *et al.*, 2013), e por sua vez é produzida pelas abelhas após o exsudato da flora local ser extraído e passar por processos bioquímicos em sua saliva. É importante nessa população para fechar frestas na finalidade de manter o ambiente hermeticamente fechado, proteger da entrada de calor e umidade, impedir a entrada de insetos, inibir atividades microbiológicas internamente na cúpula onde as larvas são depositadas e externamente na porta de entrada, mantendo um ambiente asséptico.

Com relação à solubilidade, a própolis vermelha de alagoas é insolúvel em água e parcialmente solúvel em acetona, álcool, amoníaco, clorofórmio, éter, benzeno e tricloroetileno (SILVA, CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA, AGUIAR, 2015).

Sendo assim, as substâncias extraídas e frequentemente encontradas na própolis são os flavonoides, os ácidos fenólicos e seus ésteres. Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas e sua principal função é proteger esses organismos contra agentes oxidantes. Podem ser divididos em seis classes: flavonas (ex. luteolina), flavanonas (ex. naringenina), isoflavonas (ex. daidzeina), flavonóis (ex. quercetina), flavanóis ou catequinas (ex. epicatequina) e antocianinas (ex. cianina) (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

A própolis vermelha do estado de Alagoas in natura apresenta coloração avermelhada, sabor balsâmico, aroma anis-adocicado, é rígida em temperatura abaixo dos 20°C, e consistente maleável entre 20 a 40°C.

Sua composição química é distinta de outras própolis estudadas até o momento. Foram isolados e identificados vários compostos, sendo que alguns deles são únicos que a diferencia das demais própolis (RIBEIRO *et al.*, 2004). MENDONÇA e colaboradores (2015) isolaram alguns isoflavonoides exclusivos da própolis vermelha de Alagoas: formononetina, medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina e daidzeína. Além desses, OTA *et al.* (2001); ALENCAR *et al.*, (2007) indentificaram mais 3 flavonóides do tipo isoflavona: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina e 4,7-dimethoxi-2-isoflavona, como também a medicarpina, que possuem propriedades antioxidante, anticâncer e antibacteriariana, contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, bem como, ação antifúngica contra *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*. Devido as propriedades farmacológicas supracitadas, também possui ação contra parasitas, vírus, além de ser imunomodulatória e hipotensiva (LUSTOSA *et al.*, 2008), essas atividades biológicas são atribuídas principalmente aos isoflavonóides, ácidos fenólicos, gutiferonas e terpenos (LÓPEZ *et al.*, 2014).

### **3.4. Delimitação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas**

#### **3.4.1. História**

Desde a década de 90, as propriedades químicas da própolis vermelha dos Manguezais de Alagoas começaram a ganhar destaque nas bancadas científicas do Brasil. A União dos Produtores de Própolis Vermelha do Estado de Alagoas foi constituída recentemente, no ano de 2010, para a proteção e gestão deste importante patrimônio, a Denominação de Origem (SEBRAE, 2016).

#### **3.4.2. Território**

Os Manguezais de Alagoas localizam-se na região litorânea e lagunar do estado de Alagoas. Banhados pelo Oceano Atlântico, os manguezais possuem um clima tropical úmido, sem grandes oscilações térmicas ao longo do ano, com períodos chuvosos no outono e inverno, e secos na primavera e verão. Possuem um tipo de vegetação arbóreo-arbustiva que se desenvolve nos solos lamosos



dos rios tropicais e subtropicais, numa zona de transição entre os habitats de água doce e salgada. Dentre as atividades sustentáveis pela população das zonas costeiras e ribeirinhas está a apicultura. A criação de abelhas favorece o equilíbrio biológico dos ecossistemas, através da polinização, minimizando o impacto ambiental (SEBRAE, 2016).

### **3.4.3. Benefícios**

O acompanhamento técnico para o aumento da produção, as ações trabalhadas coletivamente e o uso de ferramentas gerenciais trazem para a própolis vermelha possibilidades de ampliar o seu comércio. A região dos Manguezais de Alagoas representa um ecossistema fundamental para a estabilidade da geomorfologia costeira, a conservação da biodiversidade e a manutenção de amplos recursos pesqueiros. Trata-se de um patrimônio ambiental, cultural, econômico e social de alta relevância (SEBRAE, 2016).

### **3.4.4. Indicação Geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas**

Segundo GEBRIM (2011) a função da Indicação Geográfica é proteger o produtor da concorrência desleal, usurpação do nome do produto, garantindo ao consumidor a procedência e qualidade, preconizando, assim, que a indicação geográfica é a indicação de um produto ou serviço como originário de um local, região ou país, quando determinada reputação, característica e/ou qualidade possam ser vinculadas essencialmente a essa sua origem particular.

A Própolis Vermelha de Alagoas obteve indicação geográfica (Ver tab. 2) em 17/07/2012, na qual sua exclusividade é restrita as áreas localizadas nos municípios do litoral, próximos a complexos estuarinos lagunares e manguezais no estado de Alagoas. Está registrada sob número IG201101.

**Tabela 2.** Indicação geográfica da Própolis vermelha de Alagoas.

| DADOS TÉCNICOS          |  |
|-------------------------|--|
| <b>Número</b>           | IG201101   |
| <b>Nome Geográfico</b>  | Manguezais de Alagoas  |
| <b>UF</b>               | Alagoas  |
| <b>Requerente</b>       | União dos Produtores de Própolis Vermelha do Estado de Alagoas   |
| <b>Produto</b>          | Própolis vermelha e extrato de própolis vermelha   |
| <b>Data do Registro</b> | 17/07/2012   |
| <b>Delimitação</b>      | A área geográfica localiza-se nos municípios do litoral e complexo estuarino lagunar, no estado de Alagoas |

Fonte: SEBRAE, 2016.

### 3.5. Produtos Naturais

O uso de produtos naturais pelo ser humano é tão antigo quanto a origem das civilizações, sendo encontrado em todas as populações, em todos os grupos étnicos conhecidos. No início dos tempos, a fitoterapia representava a principal forma terapêutica conhecida e a partir dela, foram descobertos diversos medicamentos usados na medicina tradicional (MARTINS *et al.*, 2003).

Sob essa perspectiva, o Brasil, por ser um país de dimensão continental, a grandeza de seu litoral e flora, o faz detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, sendo assim, não pode abdicar de sua capacidade para os produtos naturais. A química de produtos naturais é, dentro da química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (SILVA, BOLZAN, 2002).

Desta forma, nas últimas décadas têm registrado um crescimento do interesse nos produtos sob o rótulo de “naturais” e no caso da biodiversidade, ela ganha valor estratégico sobre os seus possíveis usos em diversos segmentos. Mediante essa tendência, cresce no mundo e, principalmente, nos países europeus, um mercado consumidor cada vez mais adepto das campanhas do chamado “consumo verde”, isto é, dos produtos elaborados com base em ativos naturais (MIGUEL, 2011).

Em virtude disso, a expansão do consumo de produtos desenvolvidos com bases naturais vai de encontro com valores da sociedade contemporânea e que estão relacionados à qualidade de vida, à beleza e ao bem-estar, onde a saúde, a estética, a juventude e a aparência saudável poderiam, dentre outros

fatores, serem obtidas a partir do uso de ingredientes e formulações da “natureza” (MIGUEL, 2011).

Essa classe de produtos tem sido utilizada como instrumento científico para a descoberta de novas drogas, as quais são utilizadas como agentes inovadores na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade como infecções, cânceres, imunodeficiências (CLARDY, WALSH, 2004).

No entanto, o consumo de plantas medicinais no Brasil tem por característica o uso empírico e a ausência de comprovação adequada das ações farmacológicas por preparações produzidas pelos curandeiros, comerciantes e usuários. Além do que, outros fatores como: intoxicação, reações alérgicas, ineficácia no tratamento, podem ser relacionados ao uso inadequado dessas plantas. Também essas problemáticas podem estar associadas ao erro na identificação das espécies consumidas ou à forma como são cultivadas, colhidas, armazenadas, conservadas ou preparadas (COELHO, JUNIOR, 2015).

### **3.5.1. Própolis um produto natural emergente**

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex.: ervas) além das tradicionais preparações Galênicas (ex.: extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade foi a própolis administrada sob diversas formas, e nos dias de hoje, destaca-se como a principal forma de consumo, o extrato hidroalcoólico (CASTALDO, CAPASSO, 2002; PEREIRA, SEIXAS, NETO, 2002).

Nesse âmbito, o produto natural, por possuir uma composição heterogênea de substâncias ativas, vem sendo estudado e tem apresentado resultados promissores. A crescente busca de novas alternativas para o controle e tratamento de diferentes infecções é justificada por uma série de problemas relacionados à multirresistência, que é resultado do uso indiscriminado e abusivo de antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2007). Associado a isso, a população se sente mais segura, por se tratar de uma matéria prima totalmente natural com potenciais terapêuticos preventivos, curativos e nutricionais; tendo em vista que além da atividade farmacológica, possui uma gama de nutrientes. Portanto, nos

últimos anos, a literatura científica vem relatando as propriedades farmacológicas da própolis e, dessa forma, reafirmando sua eficácia.

Diante desses fatos, a própolis vermelha de Alagoas (PVA) comercializada na forma de extrato etanólico surge com alto potencial na área de produtos naturais, devido sua composição química exclusiva, que se deve primariamente a fonte botânica local, *Dalbergia ecastophyllum*, e, portanto, o faz uma mistura única. Portanto, o cenário para essa tintura e o uso como produto natural é favorável, tendo em vista as propriedades farmacológicas que lhes são atribuídas e ausências de problemas relacionados decorrentes de sua administração, além da facilidade que essa forma farmacêutica (extrato) proporciona, tendo em vista que pode ser incorporado em sucos, café, chá, mel, etc. Entretanto, o seu uso diretamente por via oral, se torna inadequado por se tratar de um extrato de veículo alcoólico, que o torna irritante da mucosa oral.

Sob essa perspectiva, por se tratar de um extrato natural à base de álcool, os produtores devem assegurar teores mínimos de seus constituintes ativos. Nesse contexto, são necessários testes de controle de qualidade (Ver tab. 3) para que se possa comprovar a eficácia.

### **3.5.2 Controle de qualidade de produtos naturais**

Segundo o ministério da agricultura e abastecimento, portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997 sujeito a resolução MERCOSUL GMC, nº 80/96, aprovou o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores ou industrializadores de alimentos. O regulamento técnico aprovado por esta portaria, está disponível na coordenação de informação documental agrícola, da secretaria do desenvolvimento rural do ministério da agricultura e do abastecimento (MAPA, 1997).

Nesse sentido, alguns testes de controle de qualidade são necessários, tendo em vista a sensibilidade e a confiabilidade que a técnica oferece. A cromatografia em camada delgada é o método mais comum de análise, principalmente antes da implementação dos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE e cromatografia gasosa-GC, por ser fácil, versátil, rápido e sensível para uma caracterização prévia dos constituintes de uma droga

vegetal, proporcionando análise qualitativa e semi-quantitativa, indicando uma possível adulteração (MUKHERJEE, 2002; FAMEI *et al.*, 2006).

### **3.5.2.1. Cromatografia gasosa**

O método de cromatografia gasosa torna mais precisa a identificação de compostos voláteis e, portanto, se limita a amostras com essa característica. Permite a quantificação e a verificação de mudanças na composição do óleo essencial, por exemplo que podem ser causadas por oxidação, ação de enzimas ou fermentação microbiana, levando a compostos sem atividades ou tóxicos (LIANG *et al.*, 2004). A técnica de GC apresenta-se com relativa facilidade de manipulação e permite ampla análise de diferentes compostos. A análise por CLAE deve considerar a necessidade de condições ótimas de separação, o que depende da fase móvel utilizada, pH, pressão da bomba, preparo da amostra etc (SANYAL *et al.*, 2003; THANAWIROON, LINHARDT, 2003; LIANG *et al.*, 2004).

### **3.5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS) é um método moderno, rápido e sensível. Permite avaliar os perfis químicos das amostras e determinar sua composição qualitativamente, mesmo sem padrões, comparando os espectros de massas (MS/MS) dos componentes das amostras com informações na literatura. Portanto é a ferramenta mais adequada (padrão ouro) para a avaliação da composição de matrizes complexas como a própolis (LOPEZ, 2014).

A composição da própolis está diretamente relacionada com as suas atividades biológicas e varia segundo a origem geográfica e vegetal. Nesse contexto, é importante avaliar e quantificar os constituintes químicos desse produto natural, que por sua vez lhes são atribuídas atividades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, entre outras; e avaliar a influência da composição sobre a presença/ausência destas atividades (LOPEZ, 2014).

### **3.5.2.3. Espectrofotometria por UV-Vis**

O acoplamento de espectrofotometria por ultravioleta-visível, infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear a

estas técnicas, torna os métodos mais eficientes, bem como, fornece informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra. Os instrumentos quando acoplados promovem melhores resultados por se eliminar a interferência, por apresentar seletividade, capacidade de separação cromatográfica e precisão de resultados (MUKHERJEE, 2002; LIANG *et al.*, 2004).

Dessa forma, é imprescindível a determinação da maioria dos constituintes químicos de uma planta (ou produto natural) para que sejam assegurados os resultados dos dados clínicos e farmacológicos, e assim poder conhecer quais são os compostos ativos e possíveis efeitos adversos, a fim de promover a manutenção da qualidade do material.

### **3.6. Controle de qualidade da própolis vermelha**

A efetiva introdução da própolis no mercado depende da implementação e condições padronizadas para a coleta e procedimentos sistemáticos para o seu controle físico, químico e microbiológico. A ampla variedade e complexidade de sua composição química tornam este critério mais importante no seu controle de qualidade (Ver tab. 3), (WOISKY; SALATINO, 1998).

#### **3.6.1. Exame organoléptico**

Diante do exposto, deve-se realizar controle de qualidade, como análises sensoriais preconizadas pelo Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento-MAPA para fixação de identidade, sendo elas: cor, sabor, aroma. Os caracteres sensoriais são avaliados por meio dos órgãos dos sentidos e assumem, portanto, um aspecto subjetivo, próprio do analista, procurou-se expressar os resultados dentro das possibilidades descritas MAPA, (2001).

#### **3.6.1. Perda por dessecação em balança IV**

Segundo a FARMACOPÉIA Brasileira, (2010), a determinação da perda por dessecação avalia teor de umidade e sólidos solúveis. As amostras são pesadas, em bandejas de alumínio e dessecadas em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho, à temperatura e peso constante. A perda por dessecação nas amostras de própolis na forma de extrato alcoólico pode variar, no entanto, deve estar de acordo com a resolução do ministério da

agricultura, pecuária e abastecimento no qual preconiza o limite máximo de umidade de 89% e 11% de sólidos solúveis MAPA, (2001).

### **3.6.2. Métodos cromatográficos**

Entre os vários métodos cromatográficos usados para a separação e análise de misturas complexas de fenólicos naturais, a cromatografia gasosa com coluna capilar e cromatografia líquida de alta eficiência é de grande importância devido a sua sensibilidade e poder de resolução. Entretanto, a análise de alguns destes compostos, como, por exemplo, os flavonóides, requer uma fase preliminar de derivados, transformando-os em compostos voláteis BANKOVA *et al.*, (1995).

### **3.6.3. Métodos espectrofotométricos**

Os métodos espectrofotométricos usuais para a identificação dos fenóis e flavonóides são a espectrofotometria no ultravioleta (UV), infravermelho (IV) e a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono. A espectrofotometria de UV é considerada a técnica mais usual para análise de quantificação e a espectrofotometria de IV para análise estrutural do tipo dos fenóis e flavonoides PEREIRA *et al.*, (1998).

### **3.6.4. Principais análises físico-químicas**

MARCUCCI e colaboradores (1998) descreveram de forma breve as principais análises físico-químicas encontradas na literatura, para o controle de qualidade da própolis:

a) Análises macroscópicas: aspectos gerais como cor, aparência, cheiro, etc.

b) Teor de cera: todas as amostras de própolis apresentam cera em sua composição, cujo teor pode variar de uma amostra para outra.

c) Teor de resíduo: o teor de resíduo seco insolúvel em álcool etílico também pode variar de uma amostra para outra.

d) Teor de extrato etanólico de própolis: é o obtido quando se faz a maceração da própolis em álcool etílico, após a retirada da cera e do resíduo.

e) Umidade: é importante avaliar o teor de umidade, pois, se a amostra estiver com este índice elevado, ocorrerá o crescimento de fungos sobre a mesma (especialmente quando se retira do freezer e se embala), e se tornará imprópria para o consumo e comércio.

f) Teor de cinzas: é toda matéria de origem mineral existente na amostra. O teor de cinzas é obtido ao se calcinar a própolis, eliminando-se toda a matéria orgânica. No material resultante estão presentes metais como potássio, chumbo, cádmio, cobre, zinco, estanho, entre outros.

g) Propriedades redutoras (índice de redução): após um determinado período de tempo, a amostra passa a exercer o poder antioxidante. Por este motivo, a própolis é utilizada em alguns países como antioxidante em embalagens de alimentos.

h) Fenólicos totais: substâncias fenólicas como ácidos (caféico, ferúlico, pcumárico, etc.), ésteres (cafeato de feniletila, p-cumarato de benzila, etc.) e flavonóides (quercetina, canferol, galangina, pinocembrina, etc.).

i) Flavonóides totais: é a determinação específica da presença de flavonóides em própolis avaliada pelo teor de quercetina.



j) Massa mecânica: resíduo remanescente da extração dos componentes da própolis com álcool etílico.

**Tabela 3. Parâmetros adotados para o controle de qualidade do extrato própolis vermelha**

|                                   |   |  |
|-----------------------------------|---|--|
| <b>Características sensoriais</b> | Aroma   | Balsâmico e resinoso   |
|                                   | Cor   | Dependente da fonte botânica e concentração                      |
|                                   | Sabor   | forte, amargo e picante  |
| <b>Físico-químicos</b>            | Extrato seco                                      | Mínimo de 11 % (m/v)   |
|                                   | Umidade   | Máximo 89 % (v/v)  |
|                                   | Cera  | Máximo 2 % (m/m)   |
|                                   | pH  | -  |
| <b>Testes quantitativos</b>       | UV  | Fenóis - Mínimo 0,5 % (m/m)<br>Flavonóides - Mínimo 0,25 % (m/m) |
|                                   | Cromatografia                                     | Detector: ultravioleta/ Espectro de massas/chama                 |
|                                   | <b>Testes qualitativas</b>                        | Espectrofotometria UV-visível                                    |
| Flavonoides 425 nm                |   |  |
|                                   | CLAE  | -  |
| <b>Acondicionamento</b>           | Frasco âmbar com batoque ou gotejador conta gotas |  |
| <b>Rotulagem</b>                  | Extrato seco                                      | mínimo 11 % (m/v)  |

Fonte: MAPA, 2001, com adaptações.

## **4. METODOLOGIA.**

### **4.1. Obtenção e caracterização organoléptica dos extratos hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPVA)**

Os extratos de própolis vermelha de Alagoas foram obtidos em estabelecimentos que comercializam produtos naturais na cidade de Maceió, capital do estado de Alagoas. Após a aquisição de cinco extratos, os mesmos foram denominados como: PVA, PVB, PVC, PVD e PVE, estes por sua vez permaneceram acondicionados nas embalagens de origem em temperatura ambiente até posteriores análises. Cada amostra continha 30 mL de extrato hidroalcoólico própolis vermelha de alagoas e todas estavam dentro do prazo de validade.

#### **4.1.1. Determinação do Potencial Hidrogeniônico - pH**

Para a determinação do pH dos EHPVA, foi utilizado um peagâmetro digital modelo Quimis, no qual se fez necessário adicionar 30 mL de cada amostra em béquer e levados em contato com o leitor do aparelho. Os pHs foram realizados em triplicata e, após estabilização, foram calculadas as médias. Para padronização do peagâmetro são realizadas leituras dos tampões com pH 4,0 e 7,0, conforme orienta a Farmacopeia Brasileira (1998).

#### **4.1.2. Determinação de sólidos solúveis**

Pipetou-se 1 mL dos respectivos extratos em placa de alumínio de balança por dessecação UV a temperatura constante de 105 °C e, ao final, os resultados foram determinados em triplicata e expresso em porcentual de teor de sólidos solúveis ( $\% \text{ de conteúdo solúvel em sólido} = [( \text{massa inicial do extrato comercial de própolis} - \text{massa final do extrato comercial de própolis} ) / \text{massa inicial de extrato comercial de própolis}] \times 100$ ), (Nascimento, 2017).

#### **4.1.3. Perfil fitoquímico dos EHPVA**

O perfil fitoquímico dos EHPVA foram avaliados por técnicas como espectros de absorção na região UV-VIS, determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, flavonoides totais pelo método cloreto de alumínio e percentual de inibição do reagente DPPH.

#### **4.1.5. Espectro UV-vis**

Os espectros de absorção molecular dos EHPVA foram obtidos através de estudo realizado por Park e colaboradores (1998), com alterações. Preparou-se soluções etanólicas dos extratos com concentração de 8 mg/mL<sup>-1</sup> e, por meio

desta, foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 80 µg/mL. Os espectros de absorção na região UV-Vis das amostras foram obtidos na faixa de 200 a 500 nm, utilizando-se cubeta de vidro (com capacidade para 3 mL) e espectrofotômetro UV mini-1240 SHIMADZU.

#### **4.1.6. Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

A determinação do conteúdo de fenóis total foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC) descrito por WOISY (1996), com alterações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se ácido gálico em diferentes concentrações (2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 µg/mL). Identificaram-se os balões previamente conforme a amostra à ser analisado e, em seguida, adicionou-se 3,0 mL de água destilada, posteriormente, uma alíquota correspondente a concentração de 25 µg/mL cada amostra foram adicionadas aos balões volumétricos de 5 mL, subseqüentemente, incrementou-se alíquotas de 0,4 mL do RFC, e posteriormente, 0,6 mL da solução de carbonato de sódio à 20%, com diferença de 1 minuto entre cada balão. Completou-se com água destilada até a marca do menisco o volume das vidrarias. Os testes foram realizados em triplicata. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis. Observou-se a mudança de coloração, de esverdeado para azul. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV mini-1240 SHIMADZU, no comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.1.7. Teor de fenóis totais dos EHPVA**

A partir da solução estoque (8 mg/mL dos extratos de própolis vermelha), diluiu-se em balões de 5 mL contendo previamente 3,0 mL de água destilada alíquotas de 15,6 µg correspondente a concentração de 25 µg. A seguir, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item a cima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação  $y = a+bx$ . Para calcular a porcentagem de fenóis totais presentes na amostra analisada utilizaram-se as seguintes fórmulas

#### **Equação 1**

$$D = \text{Absorbância} - E / F$$

#### **Equação 2**

$$\% = D / G \times 10$$

Onde:

D = concentração de ácido gálico em  $\mu\text{g/mL}$ ;

E = coeficiente linear da equação da reta;

F = coeficiente angular da equação da reta;

G = Massa da amostra  $\mu\text{g/mL}$

#### **4.1.8. Determinação do teor de flavonoides totais**

A determinação dos flavonoides totais foi realizada de acordo com o método de cloreto de alumínio, descrito por WOISY (1996), com pequenas alterações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se quercetina em concentrações correspondentes de 2,0 até 16,0  $\mu\text{g/mL}$ . Identificaram-se os balões previamente conforme a amostra à ser analisado e, em seguida, adicionou-se 4,0 mL de água destilada, posteriormente, uma alíquota correspondente concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  da cada amostra foi adicionada aos balões volumétricos de 5 mL, subseqüentemente, incrementou-se alíquotas de 0,1 mL solução de  $\text{AlCl}_3$  à 5% com diferença de 1 minuto entre cada balão. Completou-se com metanol absoluto até a marca do menisco o volume das vidrarias. Os testes foram realizados em triplicata. A reação ocorreu no escuro por 30 minutos. Observou-se a mudança de coloração, de amarelo para amarelo intenso. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV mini-1240 SHIMADZU, no comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.1.9. Teor de flavonoides dos extratos de própolis vermelha de alagoas**

A partir da solução estoque (8 mg/mL do EHPVA), diluiu-se para balões de 5mL concentrações de 20 a 40  $\mu\text{g/mL}$ . Adicionou-se uma alíquota do em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 4 mL de metanol, A seguir, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item a cima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação  $y = a+bx$ . Para calcular a porcentagem de flavonoides totais presentes nas amostras analisadas utilizaram-se as equações descrita acima.

#### 4.1.10. A atividade sequestrante do radical DPPH

A atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Sales 2012, com alterações. Preparou-se uma solução do radical DPPH (Sigma Aldrich) a 0,1 µM em 100 mL de etanol absoluto, e acondicionou-a em vidro âmbar. Em solução etanólica o radical DPPH tem coloração violeta, que ao interagir com a amostra, reage, e é sequestrado pelos agentes antioxidantes conforme a sua capacidade capturadora. Devido a reação a coloração se altera gradualmente da cor violeta para o tom de amarelo pálido. Com a solução de DPPH em temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL em balões volumétricos âmbar, em seguida adicionou-se alíquotas dos extratos (1 µg/mL, 5 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL) com diferença de 1 minuto entre um balão e outro. O teste foi realizado em triplicata, posteriormente aguardou a reação ocorrer no escuro durante 30 minutos. Pós reação, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. O branco das amostras foi feito com uma alíquota de 3 mL de etanol absoluto e 2 mL da solução DPPH. A porcentagem de radical DPPH• remanescente, no tempo de 30 minutos, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de DPPH}^\bullet \text{ Remanescente} = \frac{[(\text{AbsAmostra} - \text{AbsBranco}) / (\text{AbsControle} - \text{AbsBranco})] \times 100;}$$

Onde:

**AbsAmostra** = absorbância da reação entre a solução do radical DPPH• e a amostra antioxidante;

**AbsBranco** = absorbância da solução de solvente utilizado para preparar a amostra antioxidante;

**AbsControle** = absorbância do radical DPPH• com uma pequena alíquota do solvente utilizado para preparar a amostra, em substituição à solução da própria amostra em estudo.

Após a determinação do radical DPPH remanescente, determinou a porcentagem de inibição do radical DPPH• através da seguinte fórmula: % de inibição do radical DPPH• = 100 - % DPPH• remanescente

#### 4.1.11. Atividade Antimicrobiana

O teste de sensibilidade antimicrobiana obtido através da CIM foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando-se microplacas de 96 poços. Previamente preparou-se as cinco amostras, por meio de rotaevaporação a 40 °C até completa volatilização do álcool. Em seguida, para retirar a água remanescente utilizou-se estufa bacteriológica com fluxo de ar a 40 °C por 12h. Após esse processo, solubilizou-se 10 mg do extrato de própolis em 1 mL de propilenoglicol estéril com auxílio de banho maria a 40 °C e 4 mL água destilada. Dessa forma, a solução ficou numa concentração inicial de 2000 µg/mL. Os poços foram preenchidos com 100 µL do caldo Mueller Hinton estéril e 100 µL correspondente as amostras PVA, PVB, PVC, PVD e PVE. Os inóculos foram preparados em tubo com solução salina tamponada estéril, e a suspensão bacteriana determinada pela turvação do tubo 0,5 na escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), foi diluída numa proporção de 1:10, para se conseguir uma concentração final bactérias de  $5 \times 10^4$  UFC/poço ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo correspondente a cada espécie de microrganismo. Esse processo foi realizado em triplicata, dessa maneira, 100 µL do conteúdo dos 3 primeiros poços da linha A foi homogeneizado e transferido para os poços da linha B, e assim sucessivamente, até os poços correspondentes a linha H, o último volume pipetado foi desprezado. Foram utilizadas 6 linhagens de microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 14942) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), 3 Gram positivas e 3 Gram negativas, respectivamente. Cinco colunas (colunas de 1 a 5) de uma microplaca isolada foram destinadas ao controle de crescimento, na qual foram adicionados apenas os microrganismos; uma coluna (coluna 6) separando o controle de crescimento e controle negativo permaneceu vazia; outras cinco colunas (colunas de 7 a 11) foram destinadas ao controle negativo com 20 % de propilenoglicol e 80 % de água destilada estéril; na coluna (coluna 12) foi realizado o controle de esterilidade da placa, onde utilizou-se apenas o meio Muller Hinton. Em seguida, a microplaca foi armazenada em estufa a 35°C para crescimento por 18 horas. Após esse período adicionou-se 20 µL do revelador cloreto 2,3,5 trifenil tetrazolium (TTC) a 5%, em cada poço, em sequência,

esperou mais 3 horas para a análise dos resultados. Os valores da CIM foram definidos como a menor concentração do agente antibacteriano que foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos supracitados.

#### **4.1.12. Análises estatísticas**

Todos os resultados apresentados neste trabalho representam a média aritmética de triplicatas e coeficiente de variação obtidos no programa Office Microsoft Excel 2016. Os gráficos foram gerados através do Origin Pro 8 e análise estatística obtidas pelo GraphPad Prism 6. A diferença entre os grupos foi determinada usando 2 way-ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças significativas foram indicadas por valores de  $p \leq 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. Embalagens e rotulagens**

Os produtos naturais, assim como os produtos industrializados apresentam embalagem com o intuito de fornecer informações do produto e promover maior adesão de compra. Em uma verificação dos extratos adquiridos puderam-se observar algumas irregularidades nas rotulagens de duas das cinco amostras analisadas, quanto a especificação da matéria sólida. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, (2001), preconiza-se conter na rotulagem o percentual de extrato seco de no mínimo 11 %. Dessa forma, três dos cinco (PVC, PVD e PVE) exemplares estavam de acordo com a legislação, exceto PVA e PVB não especificaram o teor de extrato seco. Apenas a PVE estava sendo comercializada em embalagem primária e secundária, as demais estavam sendo comercializadas apenas em embalagem primária. Todas as cinco amostras continham estampados nos rótulos os solventes utilizados: água purificada, álcool de cereais (grau alimentício) e o extrato de própolis. Da mesma maneira, as embalagens de todos os extratos eram apropriadas, de maneira que são bromatologicamente e hermeticamente aptas, devido a cor âmbar, que confere proteção contra a degradação dos componentes químicos por meio de fotólise. Como acessório para administração, nos exemplares PVA, PVB e PVD foram utilizados batoque; PVC e PVE continham gotejador conta gotas.

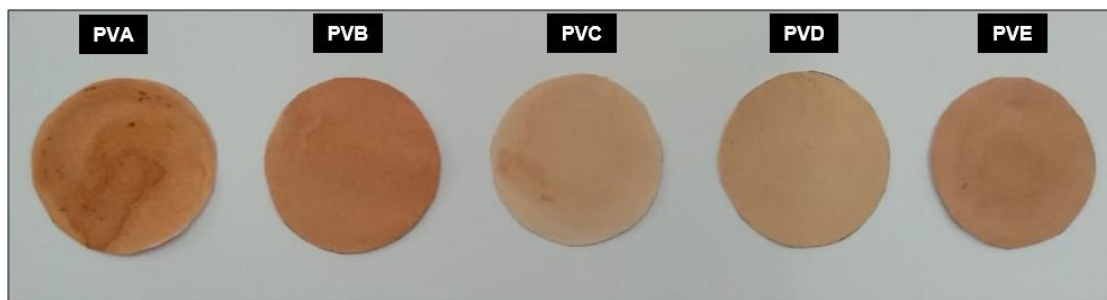
#### **5.1.1. Características organolépticas**

As própolis são classificadas de acordo com as características organolépticas (Ver fig. 8) que se enquadram, portanto, um dos quesitos de identificação da própolis vermelha é característica visual que lhe é apresentada, uma vez que é possível coletar informações referentes a esse produto como intensidade de cor, aroma, sabor, homogeneidade. Dessa maneira, pôde-se notar que os extratos PVA, PVB e PVE mostraram-se semelhantes entre si em intensidade de cor avermelhada, no entanto, com tonalidades mais fortes em relação aos demais extratos (PVC e PVD) que apresentaram tons avermelhados mais claros. Todas as amostras exibiram aroma balsâmico característico de própolis vermelha, bem como, sabor levemente amargo, picante e suave adstringência. A PVA se diferenciou de todas no aspecto homogeneidade, onde pôde-se notar que quando exposta em contato com o papel, a resina de própolis



não havia se dissolvido por completo na solução hidroalcoólica, havendo partículas sólidas, ou seja, com aspecto de heterogeneidade. Outra particularidade decorrente do que foi dito anteriormente, observada na PVA foi a facilidade que teve de se adsorver na parede do béquer utilizado na determinação de pH. Todos os demais extratos mostraram-se homogêneos.

**Figura 8.** Características visuais dos extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió.



Fonte: Autor, 2020.

### 5.1.2. Determinação do Potencial Hidrogeniônico - pH

Determinou-se os índices de pHs (Ver tab. 4) dos cinco exemplares, uma vez que os mesmos são administrados por via oral. Dessa forma, notou-se que todas as amostras são ligeiramente ácidas. A PVA obteve o valor de pH mais ácido (4,21) em relação aos demais, em contrapartida, o pH menos ácido em comparação com os outros extratos, pertenceu a PVC (4,81). Todos os demais extratos (PVB, PVD e PVE) apresentaram pHs semelhantes. LINS (2018) encontrou pH de 3,121 em extrato etílico da própolis vermelha do litoral paraibano. KAWAKITA *et al.* (2015) salientou que o pH do extrato alcoólico de própolis tende a ser ligeiramente ácido, variando de 3,0 a 5,7 e, segundo as observações, o valor de maior porcentagem de pH encontra-se em torno de 5,0. Portanto, os valores de pH encontrados para os cinco EHPVA estão de acordo com a literatura.

**Tabela 4.** Peagâmetria dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió.

| <b>Amostras</b> | <b>pHs</b> |
|-----------------|------------|
| <b>PVA</b>      | 4,21       |
| <b>PVB</b>      | 4,76       |
| <b>PVC</b>      | 4,81       |
| <b>PVD</b>      | 4,78       |
| <b>PVE</b>      | 4,72       |

pHs = potencial hidrogeniônico

Fonte: Autor, 2020.

### **5.1.3. Determinação da umidade e teor de sólidos solúveis**

Os teores de umidade e sólidos solúveis (Ver tab. 5) de quatro das cinco amostras dos extratos de própolis vermelha de Alagoas analisados nesse trabalho mostraram-se elevados quanto a umidade, e baixos quanto a teor de sólidos, no qual os valores preconizados pelo MAPA sob normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001, dever ser no máximo de 89 % e mínimo de 11 % para umidade e teor de extrato seco, respectivamente. Nota-se então que somente a PVE está de acordo com a orientação da legislação vigente, onde os valores encontrados para teor de umidade e sólidos solúveis foram 88,29 % e 11,71 %, respectivamente. Todos os demais extratos estão fora do padrão estabelecido, no qual os valores de umidade em ordem decrescente, variam de 94,86 % a 90,72 %; e teor de extrato seco, agora em ordem crescente, variam de 5,14 % a 9,28 %.

**Tabela 5.** Teores de umidade e sólidos solúveis dos extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió.

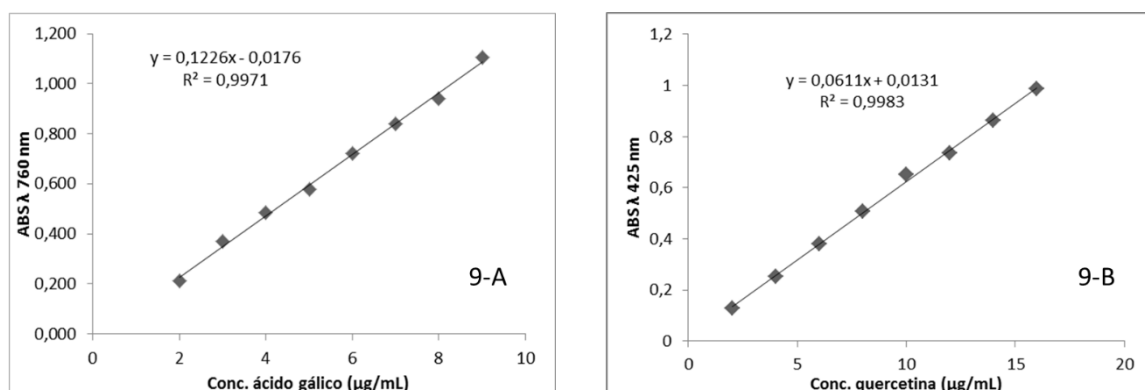
| <b>Amostras</b> | <b>Umidade</b> | <b>Sólidos solúveis</b> |
|-----------------|----------------|-------------------------|
| <b>PVA</b>      | 90,72%         | 9,28%                   |
| <b>PVB</b>      | 91,59%         | 8,41%                   |
| <b>PVC</b>      | 94,86%         | 5,14%                   |
| <b>PVD</b>      | 90,74%         | 9,26%                   |
| <b>PVE</b>      | 88,29%         | 11,71%                  |

Fonte: Autor, 2020.

#### 5.1.4. Determinação do conteúdo de fenóis e flavonoides totais

Para determinação de fenóis e flavonoides totais construiu-se uma curva de calibração (Ver fig. 9), utilizando as substâncias padrão, ácido gálico e quercetina, para fenóis e flavonoides, respectivamente. As curvas foram validadas por meio do coeficiente de determinação, no qual o valor de  $R^2$  (deve ser superior a 0,99) encontrado nas amostras foi determinado em função absorvância das amostras pela concentração do padrão.

**Figura 9.** Curvas padrão. Para fenóis totais (9-A) e para flavonoides totais (9-B).



Fonte: autor, 2020.

As tabelas 6 e 7 apresentam os resultados dos teores fenólicos e flavonoides totais dos EHPVA. Onde, observou-se que a PVA obteve teor de fenóis totais inferior em relação as demais. A PVB por sua vez, é detentora do maior conteúdo desses componentes, expresso em mg de fenóis em equivalente de ácido gálico por grama de própolis vermelha. Diante do que foi dito, os valores encontrados para os teores desses compostos variam de  $120,3 \text{ mgEAG.g}^{-1}$  a  $210,4 \text{ mgEAG.g}^{-1}$ , para PVA e PVB, respectivamente. Neves, (2014) observou em seu estudo que dois extratos etanólicos de própolis vermelha da cidade de Igarassu Pernambuco, apresentaram índices de  $73,6 \text{ mgEAG.g}^{-1}$  e  $53,4 \text{ mgEAG.g}^{-1}$ . Para análises de fenóis, o MAPA preconiza teores de no mínimo 0,50 %. Apesar de todas os EHPVA estares de acordo com a orientação a legislação, a variação entre as amostras pode estar relacionada com a sazonalidade, arsenal fitoquímico disponível pela flora local, técnicas de extração utilizada, ou até mesmo, a adulteração, através de diluição dos extratos visando o maior lucro.

**Tabela 6.** Conteúdos de fenóis totais encontrados em amostras de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas comercializada em Maceió.

| Substâncias dosadas  | Concentração 25 µg/mL (Média ± CV mgEAG.g <sup>-1</sup> ) |              |              |              |              |
|----------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                      | PVA   | PVB          | PVC          | PVD          | PVE          |
| <b>Fenóis totais</b> | 120,3 ± 2,6*  | 210,4 ± 2,4* | 127,9 ± 1,1* | 174,5 ± 3,3* | 189,4 ± 1,2* |

Média ±, CV\* = Coeficiente de variação.

mgEAG.g<sup>-1</sup> Expressos como equivalente de ácido gálico por g de própolis vermelha.

Fonte: Autor, 2020.

Na quantificação de flavonoides (Ver tab. 7), observou-se que a PVC apresentou o maior índice de flavonoides totais representado por 118,2 mgEQ/g<sup>-1</sup>. Exceto PVA que obteve 27,1 mgEQ/g<sup>-1</sup>, todas as demais amostras listadas apresentam resultados superiores quando comparados com as mesmas duas amostras de própolis vermelha de Igarassu - PE nos estudos realizados por Neves, (2014), onde encontrou 28,8 mgEQ/g<sup>-1</sup> e 65,0 mgEQ/g<sup>-1</sup>. Quando comparado com Dausch, (2007), todos os extratos obtiveram resultados superiores, onde em seu estudo de quantificação encontrou 25 mgEQ/g<sup>-1</sup> para teor de flavonoides totais em extratos etanólicos de própolis vermelha. Quando se analisa os teores de fenóis e flavonoides totais, verifica-se que o percentual de fenóis é superior ao de flavonoides totais, no qual pode-se inferir que o teor elevado de fenóis totais pode estar relacionado a uma gama desses compostos, que não estão sendo influenciados somente pelos flavonoides. Diante dessa evidencia, é necessário fazer uma varredura por meio de HPLC para identificar os compostos presentes nessas amostras. Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos, todas as amostras de extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializadas em Maceió estão de acordo com a legislação vigente quanto aos teores de flavonoides totais, pois o MAPA preconiza teor mínimo de 0,25 % para extratos de própolis. Entretanto, quando se pensa no consumo dos extratos, ao ingerir 12 gotas do extrato PVE por exemplo, serão necessárias o consumo de mais que 12 gotas das amostras PVA, PVB, PVC e PVD para que se possa ter uma equivalência referente a dose administrada da PVE, uma vez que essa amostra (PVE) apresentava teores de umidade menor e, conseqüentemente teor de sólidos solúveis maior. Isso significa dizer que a PVE possui teores de seus constituintes ativos em maior

concentração em comparação com os demais extratos avaliados nesse trabalho. Decorrente disso, para a realização de todos os testes foi necessário pesar quantidades maiores de massa referentes as amostras PVA, PVB, PVC e PVD em comparação com PVE, para que se pudesse preparar as soluções de trabalho na mesma concentração. Neste contexto, pode-se afirmar que é extremamente importante que todos os produtos naturais comercializados, em especial a própolis vermelha de Alagoas, estejam sob registro e inspeção do MAPA, uma vez que esse órgão garante a qualidade do produto nas prateleiras tornando indispensável a fiscalização, pois faz com que os produtos não regulamentados, se adequem, ou sejam retirados de circulação, visando a segurança do consumidor.

**Tabela 7.** Conteúdos de flavonoides totais encontrados em amostras de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas comercializada em Maceió.

| Substâncias dosadas       | Concentração 100 µg/mL (Média ± CV mgEQ.g <sup>-1</sup> ) |            |             |            |            |
|---------------------------|---|------------|-------------|------------|------------|
|                           | PVA   | PVB        | PVC         | PVD        | PVE        |
| <b>Flavonoides totais</b> | 27,1± 3,1*  | 72,1± 3,9* | 118,2± 4,2* | 86,6± 1,9* | 79,4± 48,9 |

CV\* = Coeficiente de variação.

mgEQ.g<sup>-1</sup> de própolis Expressos como equivalente de quercetina por g de própolis vermelha.

Fonte: Autor, 2020.

### 5.1.5. Atividade sequestrante do radical DPPH

Mensurar a atividade antioxidante de um agente é importante, visto que a todo momento o corpo humano produz radicais livres provenientes de reações metabólicas fisiológicas. Desse modo, quanto maior a capacidade de captura dos radicais, menores são as chances desses, de causarem danos aos tecidos humanos, de forma que quando estão livres, podem reagir com DNA e causar doenças como o câncer, por exemplo.

À vista disso, de acordo com os resultados observados (Ver tab. 8 e fig. 10), nota-se que a PVA e PVE não apresentaram diferenças significativas entre si, na concentração de 1 µg/mL, inibindo 4,6 % ± 2,20 % e 6,5 % ± 0,62 %, respectivamente. Entretanto, quando se avalia a atividade antioxidante na concentração de 40 µg/mL, verifica-se que a PVA apresentou diferença significativa em comparação com todas as amostras analisadas, indicando um percentual de inibição do reagente DPPH correspondente a 65,4 % ± 1,57 %. Correlacionando a PVA com a PVC, pode-se notar essa diferença, onde na mesma concentração chegou a inibir 87,8 % ± 2,91%. Analisando a IC<sub>50</sub> verifica-

se que a PVC teve desempenho superior em relação aos outros extratos, inibindo 50 % do radical DPPH na concentração de 13,18 µg/mL. De forma oposta, verifica-se que a PVA só conseguiu inibir 50 % do radical livre, a uma concentração de 16,90 µg/mL. Quando se compara com a literatura, ARRUDA (2019) encontrou atividade de extrato bruto de própolis vermelha que varia de 78,5 % a 80,6 % na concentração de 80 µg/mL. MENDONÇA et al. (2015) verificou que uma amostra de própolis vermelha de Alagoas, apresentou atividade antioxidante com valores de IC<sub>50</sub> entre 5,0 e 8,0 µg/mL.

**Tabela 9.** Atividade antioxidante de extratos de própolis vermelha de Alagoas comercializados em Maceió (% inibição do radical DPPH).

|            | Concentração µg/mL / (%IR DPPH)* |                            |                           |                           |                            | IC <sub>50</sub> |
|------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------|
|            | 1                                | 5                          | 15                        | 20                        | 40                         |                  |
| <b>PVA</b> | 4,6 ± 2,20 <sup>a*</sup>         | 25,6 ± 1,22 <sup>a*</sup>  | 47,6 ± 2,45 <sup>a*</sup> | 52,6 ± 1,11 <sup>a*</sup> | 65,4 ± 1,57 <sup>a*</sup>  | 16,90            |
| <b>PVB</b> | 8,2 ± 1,52 <sup>bd*</sup>        | 34,4 ± 1,35 <sup>b*</sup>  | 62,1 ± 0,70 <sup>b*</sup> | 69,8 ± 0,61 <sup>b*</sup> | 84,6 ± 3,65 <sup>b*</sup>  | 14,59            |
| <b>PVC</b> | 11,8 ± 1,76 <sup>c*</sup>        | 39,4 ± 0,31 <sup>c*</sup>  | 67,4 ± 4,01 <sup>c*</sup> | 75,5 ± 0,97 <sup>c*</sup> | 87,8 ± 2,91 <sup>c*</sup>  | 13,18            |
| <b>PVD</b> | 10,3 ± 0,39 <sup>dc*</sup>       | 41,4 ± 1,11 <sup>c*</sup>  | 61,9 ± 0,95 <sup>b*</sup> | 70,8 ± 1,12 <sup>b*</sup> | 86,6 ± 3,30 <sup>bc*</sup> | 13,54            |
| <b>PVE</b> | 6,5 ± 0,62 <sup>ab*</sup>        | 34,8 ± 1,01 <sup>db*</sup> | 63,4 ± 0,62 <sup>b*</sup> | 71,4 ± 1,30 <sup>b*</sup> | 84,8 ± 0,57 <sup>b*</sup>  | 14,86            |

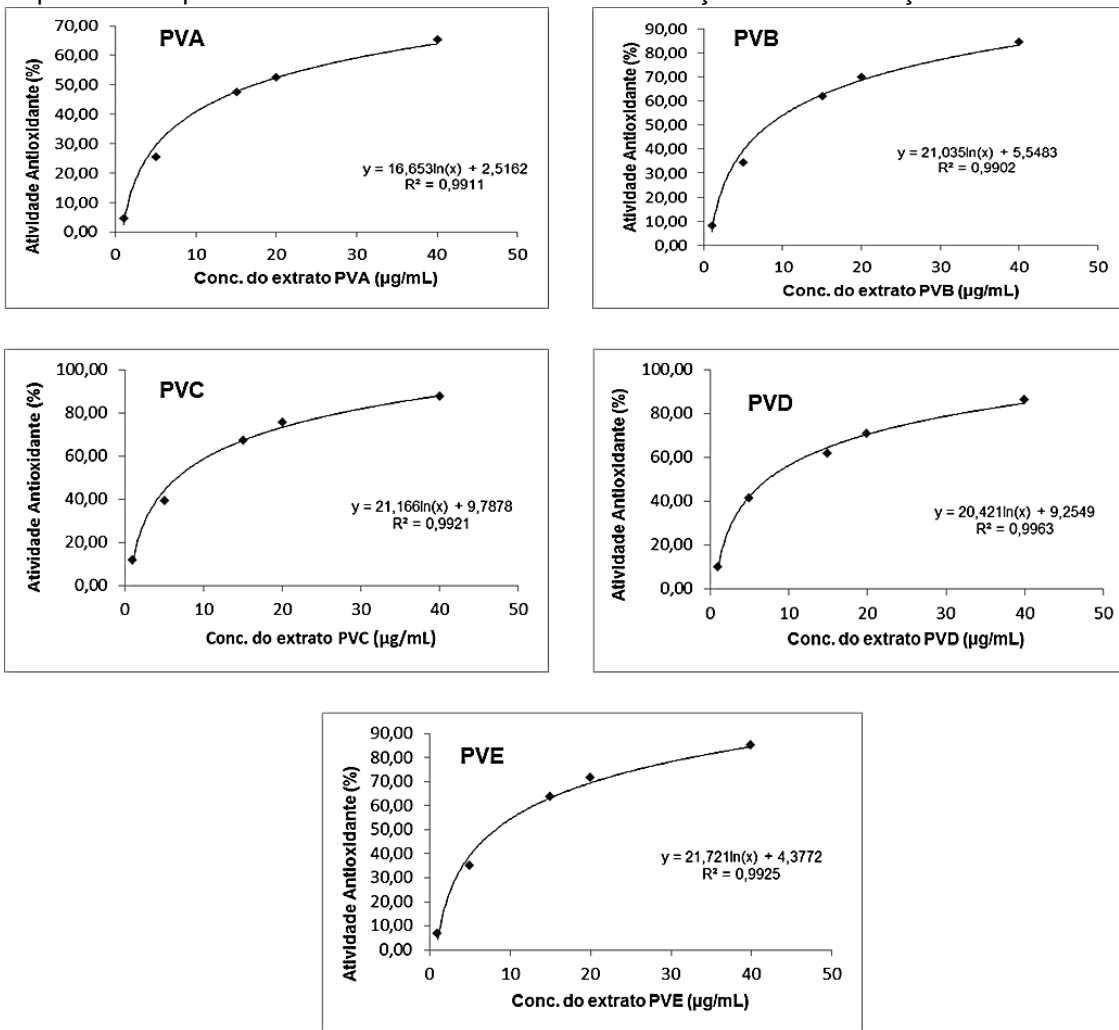
\* = média ± coeficiente de variação. Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não são estatisticamente diferentes um do outro, por meio do teste de Bonferroni (P <0,05).

Fonte: Autor, 2020.

De forma geral, os resultados dão indício de que os extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha de Alagoas tem potencial para desempenhar um papel vital nos caminhos das rotas metabólicas e, dessa forma, proteger as células contra o estresse oxidativo, mas deve-se salientar que estudos adicionais são necessários para confirmar seu potencial.

Sob à luz da estatística, por meio de software, foi possível realizar análise comparativa entre os extratos de própolis vermelha, onde pode-se inferir que na concentração de 1 µg/mL, a PVA apresenta diferença significativa com todas as amostras, com exceção da PVE. Em contrapartida, quando a concentração aumenta, percebe-se que há mudança no perfil entre as amostras, no qual, na concentração de 40 µg/mL, nota-se que a PVA demonstra diferença significativa com todas as demais amostras, entretanto, quando o foco da análise é voltado para a PVB, percebe-se que essa não demonstra diferença significativa com a PVD e PVE, no entanto, de maneira que a PVC apresenta diferença significativa com todos os demais extratos, com exceção da PVD.

**Tabela 8.** Curvas padrão dos EHPVA como agentes antioxidantes frente ao radical DPPH, expressos em percentual de atividade antioxidante em função da concentração dos extratos.



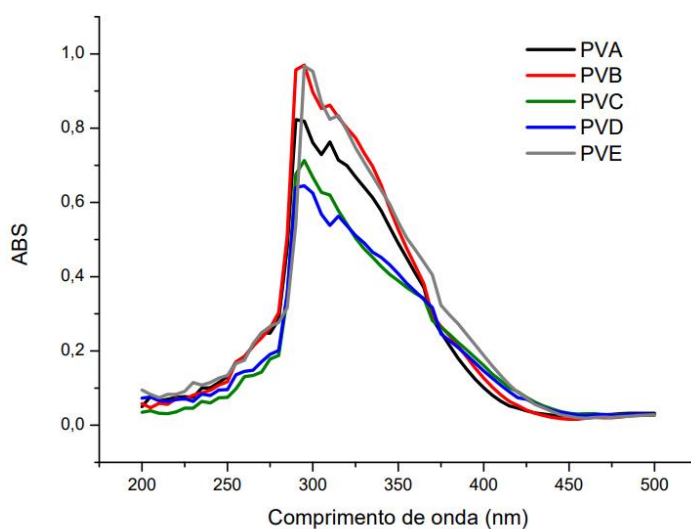
Fonte: autor, 2020.

### 5.1.6. UV-vis

O espectro de absorção na região do UV-Visível (Ver fig. 9) foi realizado na região de absorção entre as regiões de 200 a 500 nm. Segundo PARK, (1998) o perfil de absorção entre os comprimentos de onda de 270 - 330 são atribuídos aos flavonoides, logo, os picos correspondentes aos respectivos extratos podem estar relacionados aos compostos dihidroflavonóis, flavononas, uma vez que o ombro formado foi em função do comprimento de onda 295. No entanto, para se ter certeza, são necessárias análises complementares de identificação por cromatografia, uma vez que foram observadas variações apenas nas intensidades dos picos referentes aos esses compostos. Todas as amostras exibiram um perfil similar, com absorção na região entre 290 a 295 nm para grupamentos fenólicos que fazem parte das estruturas moleculares dos

flavonoides e suas subclasses. Por meio de identificação do pico, verificou-se que a PVA apresentou absorvância em 290 nm, em contrapartida, todas as demais amostras apresentaram pico de absorvância em 295 nm. Essa região de absorção no espectro é decorrente da capacidade de leitura do equipamento no comprimento de onda específico para flavonóides, formando o ombro (pico) devido a detecção desses compostos na faixa de 290 – 295 nm, em função da concentração em que estão presentes nos extratos, e dessa forma, corrobora com os teores de fenóis encontrados nas amostras PVB e PVE quando se realizou os testes qualitativos e quantitativos de fenóis totais.

**Tabela 9.** Espectros de absorção na região UV-vis dos extratos da própolis vermelha de Alagoas (PVA, PVB, PVC, PVD e PVE).



Fonte: autor, 2020.

### 5.1.7. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das própolis brasileiras já é descrita na literatura por diversos autores, e recentemente, a própolis vermelha de Alagoas vem se destacando frente essa atividade, por conter substâncias exclusivas que promovem atividades biológicas de forma mais efetiva em comparação com as demais própolis. Dessa maneira, para avaliar a capacidade inibitória de amostras de extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha de Alagoas comercializadas em Maceió, frente a bactérias patogênicas (Ver tab. 9), foram utilizadas para o teste de sensibilidade 6 cepas, das quais 3 são Gram positivas e 3 Gram negativas. Com isso, análises mostraram que a PVA apresentou Concentração Inibitória



Mínima (CIM) de 125 µg/mL contra *S. aureus*, sendo esse, o resultado com pior desempenho, em contrapartida, a PVE apresentou desempenho superior, inibido o crescimento em 15,625 µg/mL. Lopez (2014) em seu estudo verificou que amostra de própolis vermelha de Alagoas inibiu a cepa *S. aureus* multirresistente de um isolado clínico em 62,5 µg/mL. Contra *E. faecalis* a PVA também apresentou desempenho inferior em comparação com as demais, inibindo em 250 µg/mL, entretanto, as amostras PVC e PVE apresentaram inibição em 31,25 µg/mL, se mostrando mais efetiva quando se compara com estudo realizado por Rigui *et al.* (2011) em que cepas desse mesmo microrganismo foram inibidas em 512 µg/mL. Perante a *S. epidermidis* os extratos PVA e PVB tiveram atividade iguais, de maneira que obtiveram resultados inferiores em comparação com as demais amostras, apresentando inibição de crescimento em 125 µg/mL, no entanto, quando se compara, PVC e PVE, esses extratos apresentaram atividade de inibição em 31,25 µg/mL, sendo, portanto, detentores dos melhores resultados no teste de sensibilidade antimicrobiana, no qual foram capazes de inibir crescimento dessa linhagem de bactéria quando se compara com Lopez, (2014), em que a cepa *S. epidermidis* (ATCC12228) foi inibida em 62,5 µg/mL. Frente a *P. aeruginosa* todos os extratos inibiram em 1000 µg/mL, no entanto, em suas análises RIGHI *et al.*, (2011) verificou que essa cepa foi inibida em 62,5 µg/mL. Quando se avaliou a atividade antibacteriana dos extratos frente a *E. coli*, o resultado é ainda melhor, tendo em vista as concentrações inibitórias mínimas baixíssimas em relação a todos os microrganismos avaliados no presente trabalho, no qual a CIM máxima pertenceu a PVA inibindo esse microrganismo na concentração de 62,5 µg/mL. As amostras PVC, PVD e PVE por sua vez, se mostraram mais efetivas frente a *E. coli* em comparação com as demais amostras, inibindo-a na concentração de 15,625 µg/mL. Dessa forma, verifica-se que a PVA corroborou com análises realizadas por BISPO *et al.*, (2012), onde em seu estudo a própolis vermelha teve concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL. Por fim, quando se avalia a capacidade inibitória dos EHPVA frente a *E. cloacae*, observa-se que as amostras PVA, PVB e PVE tiveram CIM iguais inibindo em 62,5 µg/mL, por outro lado, PVC e PVD inibiram em 31,25 µg/mL. Não foi possível identificar na literatura concentração inibitória mínima de própolis vermelha frente a *E. cloacae*, no entanto, em estudo realizado por Hörner *et al.* (2008), verificou-se que essa cepa foi inibida quando se utilizou compostos

triazenos nas concentrações de 32 µg/mL. Diante do exposto, não é possível garantir que a atividade antimicrobiana está relacionada aos compostos fenólicos e flavonoides de maneira isolada, pois, nos testes anteriores de Fenóis totais, as amostras PVB e PVE apresentaram maiores percentuais desses compostos, entretanto, quando se analisa flavonoides, as amostras PVC e PVD apresentaram os melhores resultados. O mecanismo de ação da própolis frente a bactérias ainda não foi elucidado, mas acredita-se que essa substância complexa atue na parede celular bacteriana, nos canais de porina. Dessa forma, infere-se que a atividade antimicrobiana está relacionada ao sinergismo dos vários compostos presentes na própolis vermelha, dentre eles os fenóis e flavonoides já bem descritos na literatura.

**Tabela 10.** Concentração inibitória mínima dos extratos de própolis vermelha frente a microorganismos gram positivos e gram negativo.

|               | <b>Linhagens</b>                             | <b>PVA</b> | <b>PVB</b>  | <b>PVC</b>   | <b>PVD</b>   | <b>PVE</b>   |
|---------------|--|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Gram +</b> | <b><i>S. aureus</i></b><br>(ATCC 25923)      | 125 µg/mL  | 62,5 µg/mL  | 62,5 µg/mL   | 62,5 µg/mL   | 15,625 µg/mL |
|               | <b><i>E. faecalis</i></b><br>(ATCC 29212)    | 250 µg/mL  | 125 µg/mL   | 31,25 µg/mL  | 62,5 µg/mL   | 31,25 µg/mL  |
|               | <b><i>S. epidermidis</i></b><br>(ATCC 12228) | 125 µg/mL  | 125 µg/mL   | 31,25 µg/mL  | 62,5 µg/mL   | 31,25 µg/mL  |
| <b>Gram -</b> | <b><i>P. aeruginosa</i></b><br>(ATCC 27853)  | 1000 µg/mL | 1000 µg/mL  | 1000 µg/mL   | 1000 µg/mL   | 1000 µg/mL   |
|               | <b><i>E. coli</i></b><br>(ATCC 14942)        | 62,5 µg/mL | 31,25 µg/mL | 15,625 µg/mL | 15,625 µg/mL | 15,625 µg/mL |
|               | <b><i>E. clocae</i></b><br>(ATCC 13047)      | 62,5 µg/mL | 62,5 µg/mL  | 31,25 µg/mL  | 31,25 µg/mL  | 62,5 µg/mL   |

Fonte: autor, 2020.

A concentração mínima inibitória não somente tem o objetivo em saber qual a menor concentração capaz de impedir o crescimento de um microorganismo, mas também, inferir que quanto menor a dose de um agente, frente a um microorganismo causador de patologia, menor é a chance desse, de causar reações adversas no paciente, além do mais, pensando do ponto de vista econômico, quanto menor a CIM, menores serão os custos envolvidos na produção de um medicamento, em virtude de que menos matéria prima do princípio ativo é necessária para produção de um produto efetivo e seguro.

Não pode direcionar os resultados positivos desses extratos somente a qualidade de produção, mas a fatores como sazonalidade, local de coleta da matéria prima, técnicas de extração. No entanto, é importante frisar que o

registro junto ao MAPA, fornece qualidade ao produto e segurança ao consumidor.

## 6. CONCLUSÃO

Ao realizar os testes de controle de qualidade e teste antimicrobiano dos EHPVA comercializados em Maceió, nota-se que todos obtiveram resultados satisfatórios, no qual, chega-se as seguintes conclusões:

- A PVA apresentou os piores resultados em comparação com as demais amostras, no entanto, os percentuais de fenóis e flavonoides estão de acordo com o mínimo exigido por Lei.
- A PVB e PVE; PVC e PVD obtiveram os maiores teores de fenóis e flavonoides totais, respectivamente;
- As amostras PVC e PVD não apresentaram diferença significativa como sequestradoras do radical DPPH na IC<sub>50</sub>;
- Apenas a PVE apresentou teor de sólido solúveis satisfatório acima de 11 %;
- A PVE apresentou melhor desempenho nos ensaios antimicrobianos, com menor CIM.

Neste cenário, a PVE destaca-se em comparação com os demais extratos própolis, e ao ser consumida irá fornecer maiores concentrações dos seus constituintes. É importante salientar que, o ajuste de dose não é possível para os extratos com teor de sólidos solúveis insatisfatório, uma vez que existe variações entre lotes e marcas. Sendo assim, é importante que todos os produtores de EHPVA realizem o registro no MAPA e sigam as orientações do órgão regulamentador, fornecendo teores mínimos de seus constituintes ativos para que possam ser efetivos.

Diante do exposto, a realização de análises complementares, como teste de identificação e quantificação dos marcadores por meio de cromatografia irão conferir maior segurança e confiabilidade, no que diz respeito a determinação de qualidade dos extratos comercializados.

## REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism.** *Nutrition.* New york, V. 18, N. 1, P. 75-81, 2002.

AHN, M.; KUMAZAWA S.;USUI Y.; NAKAMURA J.;, MATSUKA M.; ZHU F.; NAKAYAMA T. 2007. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of china.** *FOOD CHEM* 101: 1400-1409, .2007.

ALENCAR, S.M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de apis mellifera africanizada de diferentes regiões do brasil.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Ccampinas. Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA, N.ETO, C. M.; CURY, , J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis.** *JournalJ of eethnopharmacol.* 2007 SEP 5;113(2):278-83, 2007.

ARAÚJO, T. A. DE S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C. DE; ALBUQUERQUE, U. P DE. **A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge.** *Journal of ethnopharmacology,* V. 120, N 1,P. 72-80, 2008.

ARVOUET, GRAND G. A.; VENNAT B, POURRAT, A. ; LEGRET P. **Standardization of propolis extract and identifi cation of principal constituents.** *J PHARM BELG* 49: 462-468, 1994.

ARVOUET, G. A.; ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A. **Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from propolis extract.** *J. Pharm. Belg., Bbruxelles,* V.50, N.5, PA38-444, 1995.

AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R. F.; MONTES, J. C.; CONTRERAS, R. L. **Tratamento de escaras de decúbito com própolis.** *Revista brasileira de enfermagem,* Brasília, V. 39, P. 7-33, 1986.

BACH, F.. **Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis.** 135 P. Tese de doutorado em engenharia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR., 2017.

BANKOVA, V.. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** Journal of ethnopharmacology, N° 100, P. 114–117, 2005.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.; MAREKOV, N.L. **isopentenyl cinnamates from popular buds and propolis.** Phytochemistry, amsterdam, V.28, N.3, P.871-873, 1989.

BANSKOTA, A.H.; TEZULA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. **Chemical constituents of brazilian propolis and their activities.** J. Nat. Prod., Columbus, V.61, P.896-900, 1998.

BARBOSA, M. H., ZUFFI, F. B., MARUXO, H. B., JORGE, L.L.R. **Therapeutic properties of propolis for treatment of skin lesions. Acciûn propûleos en el tratamiento de lesiones en la piel: estudio de la revisiûn de la literatura.** Acta Ppaulista de Eenfermagem, . 2008.

BARRERA, R. D. J.; ALARCÓN, E. A.; GONZÁLEZ, L. M.; VILLA, A. L.; MONTES DE CORREA, C. **"Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona"**. Ingeniería y competitividad, NUM. SIN MES, PP. 43-63, 2008.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da própolis verde produzida no estado de minas gerais.**137 P. Tese de doutorado. Ribeirão Preto : USP/FFCL, 2001.

BASTOS, E.M.A.F., OLIVEIRA, V. D. C.; SOARES, A. E. E. **Microscopic characterization of the green proplis, produced in minas gerais state.** Brazil, Hhoneybee SCI 21: 179-180, 2000.

BASTOS, E. M. F. *et al.* **Interaction between apis melliferal and baccharis dracunculifolia dc, that favours green própolis production in Minas Gerais.** Brazilian journal of biology, V. 71, N. 3, P. 727-34, 2011.

BATISTA, L. L. V.; MELLA, E. A. C.; ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. **Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos.** Rev col Bras cir. [periódico na internet] 2012; 39(6). Disponível em url: <http://www.scielo.br/rcbc,2012>.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. **Fragrance material review on myrtenol.** Food and chemical toxicology 46, S237–S240, 2008.

BISPO, JUNIOR, WALFRIDO, *et al.* **Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil.** Semina: ciências biológicas e da saúde, Londrina, V. 33, P.03-10, JUN. 2012. SEMESTRAL.

BORRELLI, F.; MAFFI, A. P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. **Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract.** Fitoterapia. 73: S53-S63, 2002.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e do abastecimento. Instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, conforme consta dos anexos desta instrução normativa.** Brasil, 2001.

BURDOCK, G. A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis.** Food chem toxicol 36: 347-363, 1998.

CABRAL, I. S. R. et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Quim. Nova, Vol. 32, No. 6, 1523-1527, 2009.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia 73: S1-6, 2002

CASTRO, M. L.; CURY, J. A. ; ROSALEN, P. L. . **Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica.** 2007. 30 v. Piracicaba, 2007.

CASTRO, M. L., VILELA, W. R., ZAULI, R. C.; IKEGAKI, M., REHDER, V. L.; FOGGIO, M. A.; DE ALENCAR, DE S. M., ROSALEN, P. L. **Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state.** Complementary and alternative medicine 9, 25, 2009.

CLARDY, J.; WALSH C. **Lessons from natural molecules.** Nature. 16 de DEC; 432(7019): 829-37, 2004.

COELHO, K. M.; JUNIOR, H. L. **Fitoterapia racional: riscos da automedicação e terapia alternativa.** III ciclo científico da Faculdade São Paulo – FSP. Rev. Saberes, rolim de Moura, vol. 3, n. Esp. Jul./dez., p. 35-44, 2015. Issn: 2358-0909, 2015.

CORDEIRO, A. R., *et al.*. **Composição química de duas variedades de própolis dos campos gerais do paraná.** Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (rbas), v. 5, n. 1, p.21- 27, jul., 2015.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F. H. M.; CASTRO, S. L. DE. **Treatment of trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response.** J ethnopharmacol 103: 187-193, 2006.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do brasil e suas características químicas e biológicas.** Tese de doutorado, faculdade de engenharia de alimentos da universidade estadual de campinas. Campinas/sp, . 2007.

GROOT, A. C. DE. **propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects.** Dermatitis 24, 263-282, 2013.

EVANS, L. **Crise econ mica faz crescer o uso da própolis verde.** Disponível em:  
[http://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2016/03/14/interna\\_agropecuaria,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/agropecuaria/2016/03/14/interna_agropecuaria,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde.shtml). Acesso em : 02/10/2016.

FAMEI, L.; ZHILI, X.; XIUMEI, L.; FENG, Q.; XIAOQIN, L. **Strategy and chromatographic technology of quality control for traditional chinese medicines.** Chin J Chromatography 24: 537-544, 2006.

**FARMACOPÉIA Brasileira.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERNANDES, S. J. A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J. E. C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. **Propolis: anti-staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, V. 100, P. 563-566, 2005.

FERNANDES, J.; ARY *et al.* **Atividade antimicrobiana de própolis de apis mellifera obtidas em três regiões do brasil.** Ciência rural, Santa Maria, V. 36, P.294-297, 2006.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos.** São Paulo, SP: Editora Atheneu. C 19: p 319-322, 2006.



FRANCO, M. A. D. **O uso de própolis nas doenças respiratórias e otorrinolaringológicas em crianças.** Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

FRANCO, T. T.; KUREBAYASHI, A. K. **isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, v.46, n.1, p.81-86, 1986.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. **Studies on the constituents of the leaves of baccharis dracunculifolia (asteraceae) and their cytotoxic activity.** Chemical & pharmaceutical bulletin 54, 1465-1468, 2006.

GREGORY, S. R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M. T.; PICCOLO, M. S.; HEGGERS, J. P. **Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns.** J Alter Complement Med 8: 77-83, 2002.

HAYACIBARA, M. F.; KOO H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.; BROWEN, B. W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. **In vitro and vivo effects of isolated fractions of brazilian propolis on caries development.** J Ethnopharmacol 101: 110-115, 2005.

HEIMBACH, N. DA S.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V.; SILVA, J. A. DA; SILVA, P. C. G.; REZENDE, L. C. DE; GOMES, M. DE F. F. **Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano in vitro.** Rev. Bras. Saúde prod. Anim., Salvador, v.17, n.1, p.65-72 jan./mar., 2016.

HU F.; HEPBURN, H.R.; LI Y.; CHEN M.; RADLOFF S.E.; DAYA S. **Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute infl ammatory animal models.** J Ethnopharmacol 100: 276-283, 2005.

HUANG, S.; ZHANG, C.P.; WANG, K.; LI, G.K.; HU, F.L. **recent advances in the chemical composition of propolis.** Molecules 19, 19610-19632, 2014.

Huang, s.; zhang, c-p.; wang, k.; li, g. Q.; hu, f-l. **Recent advances in the chemical composition of propolis.** Molecules, 19, 19610-19632, 2014.

KAWAKITA, E. T. *et al.* **Avaliação da vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis mantido sob diferentes temperaturas de armazenamento.** *Asa – atas de saúde ambiental, são paulo*, v. 3, n. 2, p. 33-46, jan./abr., 2015.

KERR W 1987. **Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera.** *Inf agropec* 13:15-27, 1987.

KHALIL, M. L. **Biological activity of bee propolis in health and disease.** *Asian pacific journal of cancer prevention*, nagoya, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2006.

KIMOTO, T.; KOYA, M., S.; HINO, K.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. **Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by brazilian propolis and artemisinin.** *Virchows archiv* 438, 259-270, 2001.

KOLC, C. S. M. **Composição química de própolis amarela do mato grosso do sul: comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom.** 2014. 138p. Dissertação [mestrado]. Universidade estadual do centro-oeste. Guarapuava, 2014.

KOLC, C. S. M. **composição química de própolis amarela do mato grosso do sul: comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom.** Dissertação de mestrado. Universidade estadual do centro-oeste, (unicentro). Paraná. Brasil, 2014.

KOSALEC I.; PEPELJNJAK S.; BAKMAZ M.; VLADIMIR, K. S. **Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product.** *Acta pharm* 55: 423-430, 2005.

KROL, W., *et al.* **Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus.** *Arzneim-forsch drug res*, v.43, n.5, p.607-609, 1993.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 64, p. 235-240, 1999.

LACERDA, R. I. C. C.; TIVERON, A. NA P.; ALENCAR, S. S. M. M. DE. Própolis e segurança alimentar. **Segurança alimentar e nutricional**, campinas, v. 2, n. 18, p.99-106, 2011.

LIANG Y.; XIE P.; CHAN K. **Quality control of herbal medicines.** J Chromatogr B 812, 53-70, 2004.

LUSTOSA, SARAH R. *et al.* **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia.** REV. Bras. farmacogn. vol.18 no.3 João Pessoa july/sept. BRAS. FARMACOGN., JOÃO PESSOA , V. 18, N. 3, P. 447-454, HTTP://DX.DOI.ORG/10.1590/S0102-695X2008000300020, 2008

LUZ, M. N. C.; FRAGA, E. G. S. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de própolis vermelha frente ao propionibacterium acnes.** X Mostra científica da farmácia. Quixadá: centro universitário católica de quixadá, 2016.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O.; OLIVEIRA, F. C. E.; CARDOSO, M. V.; FERREIRA, R. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; FERREIRA, A. G.; PESSOA, C.; CUESTA, R. O.; MONTEIRO, M. C.; CAMPOS, M. S.; TORRES, Y. R. **Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red brazilian propolis.** Evidence-based 42 complementary and alternative medicine 2016, article id 6057650, 11 pages, 2016b. Doi 10.1155/2016/6057650, 2016.

MAIA, S. C.; SILVA, C. I. DA; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R. T. DE; FONSECA, V. L. I. **Guia de plantas: visitadas por abelhas na caatinga.** Fortaleza, CE, Editora Fundação Brasil cidadão. ISBN 978-85-98564-05-0, 2018.

MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. **CHEMICAL COMPOSITION, PLANT ORIGIN AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BRAZILIAN PROPOLIS.** PHYTOCHEMISTRY, AMSTERDAM, V.2, P.115-123, 1999.

MENDONÇA, I. C. G. *et al.* **Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells.** BMC Complementary & alternative medicine. Maceió, 15:337, 2015.

MERGULHÃO N. L. O. N. **Efeito antiparasitário da própolis brasileira: uma revisão.** Faculdade Cathedral Ibras – Instituto Brasil de Pós-graduação, Capacitação e Assessoria.

Moreira T. M. S.; Salgado H. R. N.; Pietro R. C. L. R. **O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 20(3): 435-440, Jun./Jul., 2010.

MUKHERJEE P. K. **Quality control of herbal drugs: an approach to evaluation of botanicals.** New Delhi: Business Horizons, 2002.

NASCIMENTO, T. G. do *et al.* **Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis.** Journal Of Apicultural Research, [s.l.], v. 57, n. 2, p.246-254, 13 fev. 2018.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2017.1412563>.

NEVES M. V. M. D. **FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE IGARASSU, PERNAMBUCO, BRASIL.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, 2014.

NEGRI G.; SALATINO M. L. A. **Green propolis: unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts.** *J apicult, res*, 42: 39-41.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.** *J. Nat. Prod.*, 66: 1022-1037, 2003

NIKOLOVSKA, C. Z.; KLLSAROVA, L.; SUTURKOVA, L.; DOREVSKI, K. **First and second derivative spectrophotometric determination of flavonoids and quercetin.** *Anal. Lett., philadelphia*, V.29, N.1, P.97-115, 1996.

OLIVEIRA V. P. DE; ESPESCHIT A. C. R.; PELUZIO M. DO C. G. **Flavonóides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante.** *Rev med Mminas Ggerais* 2006; 16(4): 234-8, 2006.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.).** *Hook dicksoniaceae, rev. Bras. Pl. Med., campinas*, V.18, N.1, SUPL. I, P.230-239, 2016.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A. H.; SVER, L. T. S. **Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds.** J ethnopharmacol 94: 307-315, 2004.

OTA, C. *et al.* **Antifungal activity of propolis on different species of candida.** MYCOSES, V. 44, N. 9-10, P. 375-8, 2001.

OZKUL, Y.; SILICI S.; ERÖGLU, E. **Tthe anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture.** PHYTOMEDICINE 12: 742-747, 2004.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE A. R .P.; AGUIAR, C. **Própolis produzida no sul do brasil, argentina e uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** Ciência Rural 2: 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L., 2002. **Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis.** J. Agric. Food chem. 50, 2502-2506, 2002.

PAULINO, N.; ABREU, S. R.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. **Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin c, in brazilian propolis.** European journal of pharmacology 587, 296-301, 2008.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO, N. F. R. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** QUIM NOVA 25: 321-326, 2002.

PEREIRA, A. D. S.; PEREIRA, A. F. D. M.; TRUGO, L. C.; NETO, F. R. D. A. **Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in brazilian própolis.** Zeitschrift fur naturforschung, V58C, P. 590-593, 2003.

PINTO, L. M. A. DO P.; CARVALHO N. R. T. DE L. B. **Propriedades, usos e aplicações da própolis.** Revista eletrônica de farmácia vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PORTILHO, D. R. *et al.* **Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do tocantins.** Revista científica do itpac, araguaína, V. 6, N. 2, PUB. 1 Abr de 2013.

RIBEIRO *et al.* **composição química, atividade biológica e segurança de uso da própolis vermelha.** São Paulo, Brasil, 2004.

ROCHA L.; SANTOS, D. S. L. R. A. F.; LÚCIO, ARAÚJO G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN N. **Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana.** REV BRAS FARMACOGN 13: 71-74, 2003.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. **Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde.** Quim. Nova, V. 39, N. 10, P. 1192-1199, 2016.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, J. R. A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. **Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity.** J ethnopharmacol 73: 243- 249, 2000.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. **Antioxidative bioavailability of artemillin c in brazilian propolis.** Archives of biochemistry and biophysics 424, 181-188, 2004.

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica.** Dissertação de mestrado. Universidade de Campinas, Piracicaba/São Paulo, SP, Brasil, 2008.

SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Quim. Nova, vol. 25, SUPL. 1, 45-61, Rio de Janeiro. 2002.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M.. **Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis.** EvidenceBased Complementary and Alternative Medicine, 5,313-316,. 2007.

SILVA, K. C. M. **Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão da literatura.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, Paraíba, 2018.

SILVA, V. A. DA. **Avaliação citotóxica e genotóxica de minosa tenuiflora (wild) poir. (mimosaceae)**. 2012. 91p. Dissertação em produtos naturais e sintéticos bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 2012.

SILVA, C. R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, A. C. **Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development**. Propolis : a complex natural product with a plethora of 36 biological activities that can be. Evidence-based complementary and alternative medicine, V.2015, N.1, P.1-29, 2015.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; FILHO, DA S. A.; SOUZA, DE M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO, V. Y. M. **Effect of brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils**. Journal of ethnopharmacology 94, 59-65, 2004.

SOHRABI, M. R.; DARABI, G. **The application of continuous wavelet transform and least squares support vector machine for the simultaneous quantitative spectrophotometric determination of myracetin, kaempferol and quercetin as flavonoids in pharmaceutical plants**. Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy 152, 443-452, 2016.

SY, L. B.; WU, Y. C. B; WANG, Y. W. W. **Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an ova-sensitized airway infl ammatory animal model**. Int immunopharmacol 6: 1053-1060, 2006.

TAVARES, J. P.; MARTINS, I. L.; VIEIRA, A. S.; LIMA F. A. V.; BEZERRA F. A. F.; MORAES M. O. M. E. A. **Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a base de associações de plantas, mel e própolis**. Rev bras farmacogn 16: 350-356 2006.

TORETI, V. C. *et al.* **Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin**. Evidence-based complementary and alternative medicine, V. 2013, 2013.

SILVA, V. DA C.; **DESENVOLVIMENTO DE CÁPSULAS DE MICROENCAPSULADOS DA PRÓPOLIS VERMELHA OBTIDOS POR SECAGEM EM SPRAY-DRYING**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas Maceió, 2016.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M. DA C. M. M.; SÁ, SILVA, M.; VIANA, L. R. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis.** Ciência rural 34: 159-163, 2004.

VENNAT, B.; ARVOUET, G. A.; GROSS, D.; POURRAT, A. **Qualitative and quantitative analysis of flavonoides and identification of phenolic acids from a propolis extract.** J. Pharm. Belg., Bruxelles, v.50, n.5, p.438-444, 1995.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.** J apicult res 37: 99-105, 1998.