

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

EMANOEL GUILHERMINO DA SILVA JUNIOR

**VARIAÇÃO SAZONAL DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA PRÓPOLIS  
VERMELHA DE ALAGOAS**

MACEIÓ-AL

2022

EMANOEL GUILHERMINO DA SILVA JUNIOR

**VARIAÇÃO SAZONAL DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA PRÓPOLIS  
VERMELHA DE ALAGOAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à Universidade Federal de  
Alagoas, como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título  
de Bacharel em Farmácia.

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

MACEIÓ

2022

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

S586a Silva Junior, Emanuel Guilhermino da.  
Variação sazonal de parâmetros de qualidade da própolis vermelha de Alagoas / Emanuel Guilhermino da Silva Junior, Maceió – 2022.  
98 f. : il.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) –  
Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 71-98.

1. Própolis vermelha - Alagoas. 2. Própolis vermelha – Alagoas - Qualidade. 3. Precipitação (Meteorologia) – Variabilidade. I. Título.

CDU: 615

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, antes de tudo, a Deus Pai — a fonte infinita e invisível de tudo quanto existe, o Amor Puro, a Beleza Suprema, Perfeição Absoluta —, que me amparou, corrigiu e guiou ao longo de toda esta etapa da minha vida. Foram seus instrumentos nesse sentido os anjos, bem como os inumeráveis companheiros de ciência, professores, colegas, amigos, familiares e irmãos que não pude conhecer.

Agradeço à minha família: ao meu pai, Emanuel Guilhermino, à minha mãe, Madalena Maria, e ao meu irmão, Marcus Vinicius, os quais me incentivaram e apoiaram, de muitas maneiras, a perseverar no caminho do conhecimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, que não somente domina com precisão a sua arte e ciência, como também a leciona com empenho, rigor profissional, altruísmo e abnegação — virtudes de um verdadeiro mestre. Ser-lhe-ei eternamente grato, pois foi quem reconheceu em mim o potencial, provendo-me a oportunidade para realizá-lo.

Agradeço à Profa. Dra. Sâmia Andrícia Souza da Silva, outra mestra que me recebeu com demasiada paciência, gentileza e me transmitiu de seu conhecimento farmacognóstico, o qual teve fundamental importância para a minha formação. Devo-lhe muito também.

Agradeço, por fim, aos meus amigos, próximos ou distantes, do laboratório, da Universidade ou de fora dela: juntos fomos companheiros, dividimos esforços e sorrimos. Estarão todos sempre comigo.

***“No estudo da criatura, não se deve exercer uma curiosidade vã e perecedoura, mas ascender rumo àquilo que é imortal e permanente.”***

**— Santo Agostinho**

## RESUMO

A própolis é um produto natural elaborado por abelhas da espécie *Apis mellifera*, as quais a produzem pela mistura de sua secreção salivar com o exsudato de várias plantas. Pode apresentar-se, na natureza, em diversas composições químicas, atividades biológicas, colorações e propriedades organolépticas, pois a espécie vegetal varia conforme a região, e fatores ambientais exercem influência na composição fitoquímica. Disto foi possível a identificação de 12 variedades brasileiras de própolis, descobrindo-se posteriormente a Própolis Vermelha de Alagoas (PVA), pertencente ao grupo 13, produzida através do exsudato vermelho da planta *Dalbergia ecastophyllum*. A PVA possui as atividades antibacteriana, antifúngica, anticâncer e antioxidante, bem como um teor relativamente alto de compostos fenólicos. O objetivo deste estudo consistiu na investigação da influência da variabilidade sazonal sobre parâmetros químicos e biológicos da PVA coletada ao longo de 12 meses. O ensaio da capacidade de sequestro de radicais DPPH• demonstrou bons resultados em todos os meses analisados (abril de 2017 a março de 2018), superando o mesmo efeito nas variedades vermelhas de Maceió (Alagoas), Sergipe, Bahia e Rio Grande do Norte. Exibiu também altos teores totais de flavonoides, entre 7,48% (março de 2018) e 12,79% (janeiro de 2018), tendo um desempenho variável, neste ensaio, com relação ao teor nas demais própolis. Os testes de atividade antibacteriana resultaram em CIM's de 128-1024 µg/mL frente à *S. aureus* (ATCC 25923) e 625-1250 µg/mL frente à *E. coli* (ATCC 25922). A *S. aureus* mostrou-se mais sensível à PVA que a *E. coli*. Os resultados contra ambas as cepas, conquanto altos, foram inferiores aos observados em outras variedades de própolis vermelha do Nordeste brasileiro. O *fingerprint* por CLAE-DAD demonstrou haver maior concentração dos marcadores formononetina, daidzeína, liquiritigenina e isoliquiritigenina, em comparação à biochanina A, pinocembrina e pinobanksina. A comparação dos resultados com as precipitações de chuvas na região permitiu a distinção de dois ciclos de melhores resultados — (1) de abril a junho de 2017 e (2) entre outubro de 2017 e fevereiro de 2018 —, de um ciclo de resultados mais baixos, de julho a setembro de 2017, e do mês de março de 2018, com pior desempenho. De um modo geral, as atividades biológicas e o teor de flavonoides reduziram no período de chuvas, aumentando significativamente com a baixa precipitação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Própolis Vermelha de Alagoas; Variabilidade sazonal; Atividades biológicas.

## ABSTRACT

Propolis is a natural product made by bees of the species *Apis mellifera*, which produce it by mixing their salivary secretion with the exudate of various plants. It can be present in nature in different chemical compositions, biological activities, colors and organoleptic properties, as the species of origin varies according to the region, and environmental factors influence the phytochemical composition. From this it was possible to identify 12 Brazilian varieties of propolis, later discovering the red propolis from Alagoas state, belonging to group 13, produced through the red exudate of the plant *Dalbergia ecastophyllum*. The red propolis has antibacterial, antifungal, anticancer and antioxidant activities, as well as a relatively high content of phenolic compounds. The aim of this study was to investigate the influence of seasonal variability on chemical and biological parameters of PVA collected over 12 months. The DPPH• radical scavenging capacity assay showed good results in all analyzed months (April 2017 to March 2018), surpassing the same effect in the red varieties of Maceió (Alagoas), Sergipe, Bahia and Rio Grande do Norte. It also showed high total levels of flavonoids, between 7.48% (March 2018) and 12.79% (January 2018), with a variable performance, in this test, in relation to the content in the other propolis. The broth microdilution test resulted in MICs of 128-1024 µg/mL against *S. aureus* (ATCC 25923) and 625-1250 µg/mL against *E. coli* (ATCC 25922). *S. aureus* was more sensitive to PVA than *E. coli*. The results against both strains, although high, were lower than those observed in other red propolis varieties from the Brazilian Northeast. The HPLC-DAD fingerprint showed a higher concentration of the markers formononetin, daidzein, liquiritigenin and isoliquiritigenin, compared to biochanin A, pinocembrin and pinobanksin. The analysis of the results with rainfall in the region allowed the distinction of two cycles of better results — (1) from April to June 2017 and (2) between October 2017 and February 2018 —, from a longer cycle of low results, from July to September 2017, and from March 2018, with the worst performance. In general, biological activities and flavonoid content reduced in the rainy season, increasing significantly with low rainfall.

**KEY-WORDS:** Red Propolis; Seasonal variability; Biological activities.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – <i>Apis mellifera</i></b> .....	3
<b>Figura 2 – Colorações que se podem encontrar nas variedades de própolis</b> .....	5
<b>Figura 3 – Composição da Própolis</b> .....	7
<b>Figura 4 (A-B) – Abelhas coletando o exsudato (B) para produzir a PVA (A)</b> .....	9
<b>Figura 5 (A-G) – Marcadores químicos da PVA</b> .....	10
<b>Figura 6 – Fatores capazes de modificar o perfil fitoquímico</b> .....	11
<b>Figura 7 – Representação das vias de biossíntese dos flavonoides</b> .....	18
<b>Figura 8 – <i>Flavilium</i>, a estrutura básica dos flavonoides</b> .....	18
<b>Figura 9 – Subclasses de flavonoides, de acordo com seus substituintes correspondentes</b> .....	19
<b>Figura 10 – Representação esquemática de uma maceração</b> .....	21
<b>Figura 11 – Passagem de radiação por uma amostra, em espectrofotometria</b> .....	24
<b>Figura 12 – Equação da transmitância (T)</b> .....	25
<b>Figura 13 – Equação da absorbância (A)</b> .....	25
<b>Figura 14 – Espectro de absorção de uma proteína, a título de exemplo</b> .....	26
<b>Figura 15 – Lei de Lambert-Beer</b> .....	27



<b>Figura 16</b> – Representação esquemática dos componentes internos de um espectrofotômetro UV-Vis.....	27
<b>Figura 17</b> – Equação química da reação de redução do DPPH•.....	29
<b>Figura 18</b> – Redução do radical DPPH• por um composto antioxidante.....	30
<b>Figura 19</b> – Reação com cloreto de alumínio (AlCl <sub>3</sub> ), para a quantificação de flavonoides totais.....	31
<b>Figura 20</b> – Espectro de absorção e fórmula estrutural da naringenina.....	32
<b>Figura 21</b> – Resumo das rotas biossintéticas por que se forma, nas plantas, a naringenina.....	32
<b>Figura 22 (A-B)</b> – Estruturas químicas da sílica normal (A), polar, e da sílica modificada (B), não polar.....	35
<b>Figura 23</b> – Representação esquemática de um equipamento de CLAE.....	36
<b>Figura 24</b> – Cromatograma ou <i>fingerprint</i> de um extrato vegetal, a que se aplicou, para leitura, reagente de derivatização e luz UV.....	38
<b>Figura 25</b> – Ilustração esquemática do método de microdiluição em caldo.....	44
<b>Figura 26</b> – Modificações químicas na resazurina após reação com células bacterianas.....	45
<b>Figura 27</b> – Poços contendo resazurina, após a interação antimicrobiano-bactéria. A maior intensidade da cor rosa indica maior crescimento bacteriano.....	46
<b>Figura 28</b> – Extratos líquidos de PVA em processo de concentração por evaporação rotativa.....	48

<b>Figura 29</b> – Parte do extrato bruto após concentração e secagem.....	49
<b>Figura 30</b> – Equação da capacidade de eliminação experimental (% CEE).....	50
<b>Figura 31</b> – Percentagem de sequestro de radicais DPPH● das amostras de abril de 2017 a março de 2018, em função da concentração de extrato.....	53
<b>Figura 32</b> – $Cl_{50}$ do sequestro de radicais DPPH● das amostras de abril de 2017 a março de 2018.....	54
<b>Figura 33</b> – Teor total de flavonoides (%) das amostras de abril de 2017 a março de 2018, em função da concentração de extrato.....	57
<b>Figura 34 (A-E)</b> – Perfil cromatográfico dos extratos de abril de 2017 a março de 2018, obtido mediante CLAE-DAD.....	62
<b>Figura 35 (A-B)</b> – Quantificação de flavonoides majoritários de abril de 2017 a março de 2018, na PVA.....	64
<b>Figura 36 (A-B)</b> – Precipitação de chuvas em Maceió, entre janeiro de 2017 (A) e dezembro de 2018 (B).....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resumo das variedades brasileiras de própolis já classificadas, com suas respectivas cores e origem botânica.....	4
<b>Tabela 2</b> – Atividades biológicas de alguns flavonoides.....	20
<b>Tabela 3</b> – Alguns materiais em que se podem fabricar cubetas, com sua faixa ótima de absorção.....	28
<b>Tabela 4</b> – Percentagem de sequestro de radicais DPPH● de alguns metabólitos secundários.....	30
<b>Tabela 5</b> – Comparação da capacidade antioxidante com própolis vermelhas de outras regiões.....	55
<b>Tabela 6</b> – Comparação do teor total de flavonoides com própolis vermelhas de outras regiões.....	58
<b>Tabela 7</b> – CIM da PVA entre abril de 2017 e março de 2018, frente às cepas <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	59
<b>Tabela 8</b> – Comparação da atividade antimicrobiana com própolis vermelhas de outras regiões.....	60

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(AlCl<sub>3</sub>) Cloreto de Alumínio

(ε) Absortividade molar

(A) Absorbância

(AL) Alagoas

(ABTS) ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

(ATCC) American Type Culture Collection

(b) Caminho que a luz tem de percorrer através da amostra

(BHI) Brain Heart Infusion

(BHI) Brain Heart Infusion

(c) Concentração de soluto

(C<sub>18</sub>) Concentração de soluto

(CBM) Concentração bactericida mínima

(CCDAE) Cromatografia em camada delgada de alta eficiência

(CE<sub>50</sub>) Concentração eficiente

(CI<sub>50</sub>) Concentração inibitória média

(CIM) Concentração inibitória mínima

(CLAE) Cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE-DAD) Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

(CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute

(DPPH●) 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

(DAD) Detector de arranjo de diodos

(INPI) Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(MAPA) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards

(P) Radiação emitida pelo aparelho

(P<sub>0</sub>) Radiação transmitida pela amostra

(PVA) Própolis Vermelha de Alagoas

(RMN) Ressonância magnética nuclear

(SISGEN) Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado

(T) Transmitância

(TS) Teste de susceptibilidade

(UV-Vis) Ultravioleta-Visível

(UTI) Unidade de Tratamento Intensivo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 Própolis.....	3
2.2 Própolis Vermelha de Alagoas (PVA).....	8
2.3 Sazonalidade.....	11
2.4 Compostos fenólicos.....	14
2.4.1 Flavonoides.....	17
2.5 Extração por maceração.....	21
2.6 Espectrofotometria de absorção em UV-Vis.....	23
2.6.1 Capacidade de sequestro de radicais DPPH• (2,2–difetil–1–picril- hidrazila) para determinação da atividade antioxidante.....	28
2.6.2 Determinação do teor total de flavonoides por leitura direta em UV- Vis.....	31
2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	33
2.7.1 Análise de perfil químico ( <i>fingerprint</i> ).....	37
2.8 Testes de atividade antimicrobiana.....	40
<b>3. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>47</b>
3.1 Objetivos específicos.....	47
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
4.1 Coleta das amostras de PVA.....	48
4.2 Extração.....	48
4.3 Capacidade de sequestro do radical DPPH•.....	49
4.4 Determinação do teor total de flavonoides por leitura direta de naringenina em UV-Vis.....	50
4.5 Ensaio de identificação e quantificação de marcadores (flavonoides) por CLAE-DAD.....	51
4.6 Teste de microdiluição em caldo.....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>





## 1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural elaborado por abelhas da espécie *Apis mellifera*, as quais a produzem pela mistura de secreção salivar — contendo enzimas derivadas do seu metabolismo, como a  $\beta$ -glicosidase — com o exsudato de várias espécies de plantas presentes no entorno da colmeia, potencializando a sua ação farmacológica (DAUGSCH et al., 2006; LACERDA; TIVERON; ALENCAR, 2011).

A coleta de substrato pode realizar-se, pelas abelhas, em diferentes partes vegetais, tais como brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A própolis desempenha funções bastante específicas e importantes para o controle de contaminação e a manutenção colmeia, pois lhe confere um revestimento, vedando-lhe as frestas, além de propiciar um ambiente quase asséptico, a reparação de favos, impermeabilização e mumificação de insetos e pequenos animais mortos em seu interior, grandes demais para que as abelhas consigam removê-los, inibindo portanto os consequentes processos de putrefação (BONVEHÍ; COLL, 1994; KHURSHID et al., 2017).

A depender da região onde se situam as colmeias, haverá mudança das espécies vegetais que lhe são próximas, alterando-se consequentemente a composição fitoquímica disponível para as abelhas. Além disso, as abelhas selecionam diferentes partes da planta para a coleta de substrato, em função da espécie em que estão realizando a coleta, o que modifica significativamente a concentração dos metabólitos secundários obtidos (SIMOES et al., 2016). Por fim, existem ainda fatores ambientais exercendo influência sobre a planta, como a pluviometria, temperatura, radiação solar, herbivoria e ataque de patógenos, altitude, composição atmosférica, água e nutrição do solo, sazonalidade, umidade relativa do ar, e o ritmo circadiano, todos responsáveis por lhe alterar a composição quantitativamente (NETO et al., 2017). Por essas razões é que se consideram os metabólitos secundários uma interface entre a planta e o ambiente circundante (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

No Brasil, país de biodiversidade vegetal vastíssima, há muito que as pesquisas tentam elucidar os perfis químicos da própolis produzida em território nacional, com o objetivo de classificá-la em variedades distintas, incluindo na classificação propriedades como cor, odor, faixa de fusão, origem geográfica e

origem botânica (SILICI; KUTLUCA, 2005). Nesse sentido, houve primeiramente a identificação de 12 variedades brasileiras de própolis — a amarela, castanho-escuro, castanho-clara, marrom-esverdeada, marrom-avermelhada, amarelo-escuro e verde —, pertencentes às regiões Nordeste, Sul e Sudeste do país (LEMOS et al., 2018).

Posteriormente se descobriram, nas áreas de manguezais do Nordeste brasileiro, colmeias contendo uma própolis de coloração vermelha, cujo perfil cromatográfico demonstrou-se singular, criando-se para ela, por conseguinte, o grupo 13. O mesmo estudo, por meio de comparação entre perfis químicos, determinou também qual a origem botânica desta nova própolis — a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, pertencente à Família Leguminosae (SILVA et al., 2008). Na década de 70, já se publicavam artigos relatando a observação de abelhas coletando diretamente o exsudato vermelho da *Dalbergia ecastophyllum* (DONNELLY; KEENAN; PRENDERGAST, 1973; GOTTLIEB; ANDRADE, 1975), orientando autores a avaliarem esta espécie vegetal no estudo em que se a comprovou como principal origem botânica da PVA (DAUGSCH et al., 2006).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Própolis

A palavra própolis tem origem grega e significa, etimologicamente, “em defesa da cidade”, termo cunhado por Aristóteles (384 a.C. — 322 a.C.) e que faz referência ao papel deste produto natural na manutenção e proteção da colmeia. Há muito que a humanidade tem-se utilizado da própolis, principalmente após ter obtido sucesso na domesticação de abelhas (Figura 1); existem, por exemplo, numerosos relatos do interesse dos antigos egípcios, gregos, judeus, persas e romanos em descrevê-la e utilizá-la para os mais diversos fins pessoais e terapêuticos, tendo sido pouco apreciada na Idade Média, mas renovando-se o interesse na investigação de suas propriedades durante o período da Renascença (MARTINOTTI; RANZATO, 2015). Encontra-se inclusive listada como uma droga oficial nas farmacopeias de Londres do século 17 (ROJCZYK et al., 2020).

**Figura 1** – *Apis mellifera*.



**Fonte:** ASSIMOS, 2014.

Os primeiros estudos de análise química da própolis datam do início do século 20, em 1907, tempo em que era utilizada em aplicações locais contra reumatismo e gota e internamente para se tratar a diarreia infantil, sendo notórios já

àquela época casos de adulteração da matéria-prima por adição cera de abelha, compostos metálicos e materiais densos insolúveis (MOREIRA, 1986). Nas décadas de 1950 e 1960, a antiga União Soviética e alguns países do leste europeu passam a dar ênfase à própolis para o tratamento de doenças, ao passo que é nos anos 1980 que se observa grande prestígio da mesma na medicina alternativa e complementar (LUSTOSA et al., 2008).

A própolis pode apresentar-se, na natureza, em diversas colorações, que passam por tonalidades várias do amarelo, verde, marrom e vermelho (Figura 2). Além disso, outras de suas propriedades organolépticas que se mostram naturalmente variáveis são a consistência e o odor (CUNHA et al., 2011). A tabela 1, adaptada de MENDONÇA (2011), resume as variedades brasileiras de própolis que se conseguiram classificar até este momento.

**Tabela 1** – Resumo das variedades brasileiras de própolis já classificadas, com suas respectivas cores e origem botânica.

Própolis	Origem Geográfica	Cor	Origem Botânica
Grupo 1	Sul (RS)	Amarelo	Resina de <i>Populus alba</i>
Grupo 2	Sul (RS)	Castanho claro	
Grupo 3	Sul (PR)	Castanho escuro	
Grupo 4	Sul (PR)	Castanho claro	
Grupo 5	Sul (PR)	Marrom esverdeado	
Grupo 6	Nordeste (BA)	Marrom avermelhado	Resina de <i>Hyptis divaricata</i>
Grupo 7	Nordeste (BA)	Marrom esverdeado	Resina de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
Grupo 8	Nordeste (PE)	Castanho escuro	
Grupo 9	Nordeste (PE)	Amarelo	
Grupo 10	Nordeste (CE)	Amarelo escuro	
Grupo 11	Nordeste (PI)	Amarelo	
Grupo 12	Sudeste (SP, MG)	Verde ou Marrom esverdeado	Exsudato do caule de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>
Grupo 13	Nordeste (AL, BA, PB)	Vermelha	

**Fonte:** Adaptado de MENDONÇA (2011).

**Figura 2** – Colorações que se podem encontrar nas variedades de própolis.



**Fonte:** KASOTE et al., 2017.

A composição variável da própolis torna imprescindível a continuidade de publicações científicas nesse sentido, pois um dos principais problemas enfrentados pela indústria farmacêutica e alimentícia tem sido a padronização dos parâmetros físico-químicos mínimos de qualidade dos seus bioprodutos, uma exigência da Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual determina os teores adequados de compostos fenólicos, flavonoides, umidade, cinzas, cera e sólidos solúveis, além de características organolépticas como aroma, cor, sabor, consistência e granulometria, e isto não somente para a própolis in natura, como também para a apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, o pólen apícola e o extrato de própolis (BRASIL, 2001).

Não obstante a sua composição química sofrer bastantes alterações a depender do grupo a que pertença, como já se mencionou, as variedades de própolis tendem a apresentar atividades biológicas semelhantes entre si qualitativamente, tais como os efeitos antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitário, anti-inflamatório, antiproliferativo e antioxidante, embora valha

ressaltar que o mesmo não ocorre sob o ponto de vista quantitativo (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

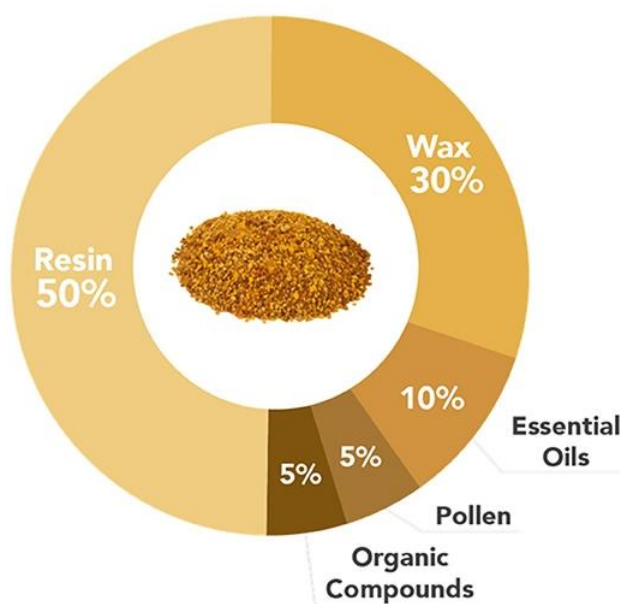
Entretanto, uma grande dificuldade tecnológica enfrentada pela indústria farmacêutica, de alimentos e cosméticos ainda é a de obter bioprodutos da própolis com um rendimento razoável de compostos ativos, tendo em vista que estes apresentam baixa solubilidade em água (o principal veículo empregado em suas formulações), sendo isto um fator limitante na aplicação clínica do apiterápico, que perde por isso parte do seu potencial farmacológico (DIMOV et al., 1992).

Infelizmente não é tão comum haver estudos sobre o aspecto imunomodulador da própolis, que pode ser bastante promissor, considerando-se que os resultados obtidos com vacinas antibacterianas têm sido relativamente improdutivos e que a resistência de patógenos aos fármacos antimicrobianos comuns está a aumentar, ao longo dos anos (DIMOV et al., 1992). Os efeitos da própolis no sistema imunológico incluem o estímulo à produção de linfócitos mediante o aumento de IL-1 e IL-2, a modulação — *in vivo* e *in vitro* — da produção de C1q por macrófagos e modulação dos receptores do sistema complemento nestas células, o aumento da capacidade lítica de células NK contra células tumorais (ORSI et al., 2000). A literatura relata ainda que a PVA é capaz de inibir a migração de leucócitos, reduzir a evolução de edemas e diminuir a resposta inflamatória de macrófagos ativados *in vitro* — produzindo deste modo efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; JUNIOR et al., 2004; BUENO-SILVA, et al., 2015; CAVENDISH et al., 2015).

Macroscopicamente, apresenta-se no estado sólido, sendo dura a 15 °C e maleável a partir dos 30 °C, e de difícil remoção após o contato com a pele, devido a interações fortes com óleos e proteínas desta; sua composição (Figura 4) consiste em uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas: microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E, resina (~50%), cera (~30%), óleos essenciais (~10%), pólen (~5%) e compostos orgânicos (~5%) (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; VIUDA-MARTOS et al., 2008; CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). Destes últimos, autores já foram capazes de identificar cerca de 300 substâncias, entre elas flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas e diidroflavonóis), aldeídos

aromáticos, cumarinas, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, alcoóis, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides e proteínas (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1982; GREENAWAY; SCAYSBROOK; WHATLEY, 1987; MARCUCCI, 1999).

**Figura 3** – Composição da própolis.



**Fonte:** Adaptado de EASTON-CALABRIA; DEMARY; ONER, 2019.

Contudo, cumpre ressaltar que tal composição, além de complexa como já se observou, é consideravelmente variável qualitativa e quantitativamente de acordo com a espécie de abelha, época do ano em que se coletou a amostra e a planta considerada a origem botânica da variedade em questão (BANKOVA, 2005).

A própolis, no entanto, não pode ser analisada diretamente, isto é, in natura. Em razão de as abelhas obterem-na das resinas das plantas, é muito comum que o teor de cera por ela apresentado seja relativamente alto (~20%), fazendo-se necessário o emprego de métodos extrativos antes de se estudá-la, a fim de se produzirem extratos de melhor qualidade, ricos em compostos biologicamente ativos e com um custo-benefício atrativo. De fato a maioria das pesquisas utiliza-se do método clássico de maceração com líquido extrator hidroalcoólico, geralmente em concentrações entre 70-80%, mas não se excluem o emprego de solventes como

metanol, água, hexano, acetano, diclorometano e clorofórmio; em contrapartida, a indústria farmacêutica e alimentícia tem dado enfoque a técnicas menos convencionais, mas sobretudo promissoras, como é o caso dos métodos de extrativos com fluido supercrítico — capazes de produzir extratos em baixas temperaturas e com um alto rendimento, preservando-lhes os constituintes ativos e, por consequência, os efeitos terapêuticos (GRAIKOU et al., 2016; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019; BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021;).

Existe um tipo peculiar de própolis muito similar, em suas características químicas e de atividade biológica, à própolis comum, denominado geoprópolis. A sua produção é realizada por abelhas de espécies diferentes da *Apis mellifera*, a exemplo da *Melipona mondury*, *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*. Verificou-se na geoprópolis atividade antibacteriana contra as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* mais intensa que nas Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo superiores os resultados para a geoprópolis produzida pelas abelhas do gênero *Melipona* (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

O Brasil ocupa posição de destaque no que se refere à produção apícola, sendo o segundo país de maior produção nesta área, atrás apenas da China (LUSTOSA et al., 2008), enquanto que a produção brasileira corresponde 10-15% da produção mundial, conseguindo atender a 80% da demanda do Japão, país onde se vendem extratos alcoólicos contendo 30g de própolis a, em média, U\$ 150,00 (SEBRAE, 2013). Japão, Estados Unidos, Alemanha e China são os maiores importadores do mercado de própolis, e contribuem para o volume anual de exportação do opoterápico — que é de 70 toneladas (ALBUQUERQUE, 2007).

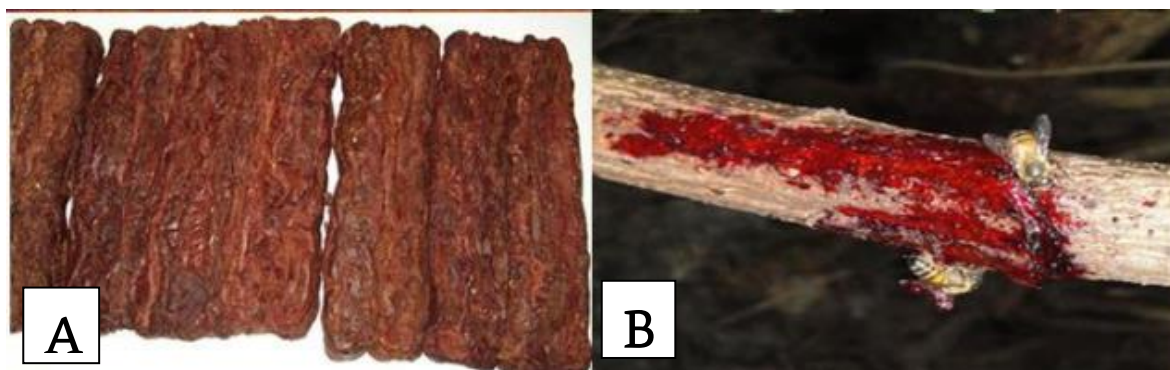
## 2.2 Própolis Vermelha de Alagoas (PVA)

Não somente devido à suas características físico-químicas, mas também pelas condições em que se a produz, a própolis vermelha do grupo 13 (Figura 4 A-B) recebeu do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), no ano de 2012, um selo indicação geográfica do tipo denominação de origem (Número IG201101), o qual reconhece a Própolis Vermelha de Alagoas (PVA) como produzida exclusivamente na região de manguezais do estado (BRASIL, 2012). A cor vermelha



tem certa predominância em outros estados do Nordeste, não se limitando a Alagoas (PINHEIRO, 2019).

**Figura 4 (A-B)** – Abelhas coletando o exsudato (B) para produzir a PVA (A).



**Fonte:** Adaptado de ASSIMOS, 2014.

O reconhecimento da indicação geográfica foi uma etapa determinante para a valorização da PVA e de seus produtos derivados, pois destaca a sua herança histórico-cultural, possibilita o seu reconhecimento por organismos de regulação do comércio nacional e internacional e promove a sua apropriabilidade, ou seja o impedimento da imitação de produtos e processos a ela relacionados, garantindo, assim, que haverá retorno mais seguro dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento, bem como um incentivo à base produtiva regional do opoterápico (RITA et al., 2013). De fato, observou-se um aumento no interesse do mercado internacional pela PVA após a obtenção do selo (CABRAL, 2008).

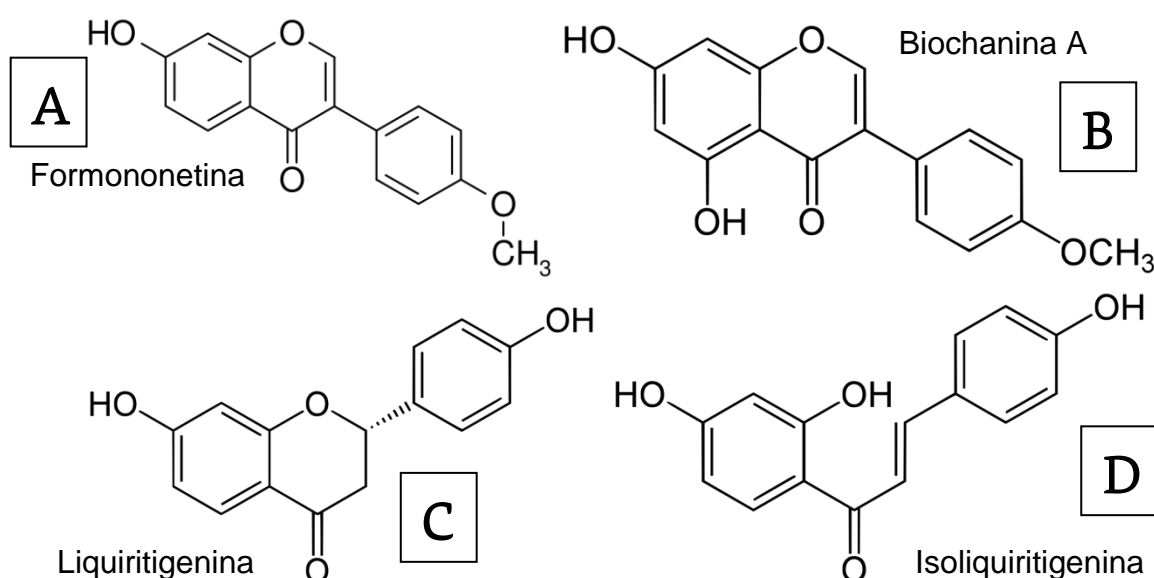
A PVA exhibe, com frequência, bioatividade expressiva. Os autores têm-lhe atribuído as atividades antibacteriana, antifúngica, anticâncer e antioxidante, bem como um teor relativamente alto de compostos fenólicos (ANDRADE et al., 2017). Com efeito, os flavonoides são os compostos que mais contribuem para as propriedades funcionais da PVA e, em virtude disso e da sua alta concentração, são também os marcadores químicos desta, isto é, as substâncias quantificadas quando se lhe pretende investigar a qualidade (ANDRADE et al., 2017; RUFATTO et al., 2018). Além das atividades anteriormente citadas, a PVA apresenta significativa ação regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental, ação antiaterogênica, antipirética, adstringente, anestésica e, quanto à capacidade antimicrobiana, inibição do *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, à *Escherichia*

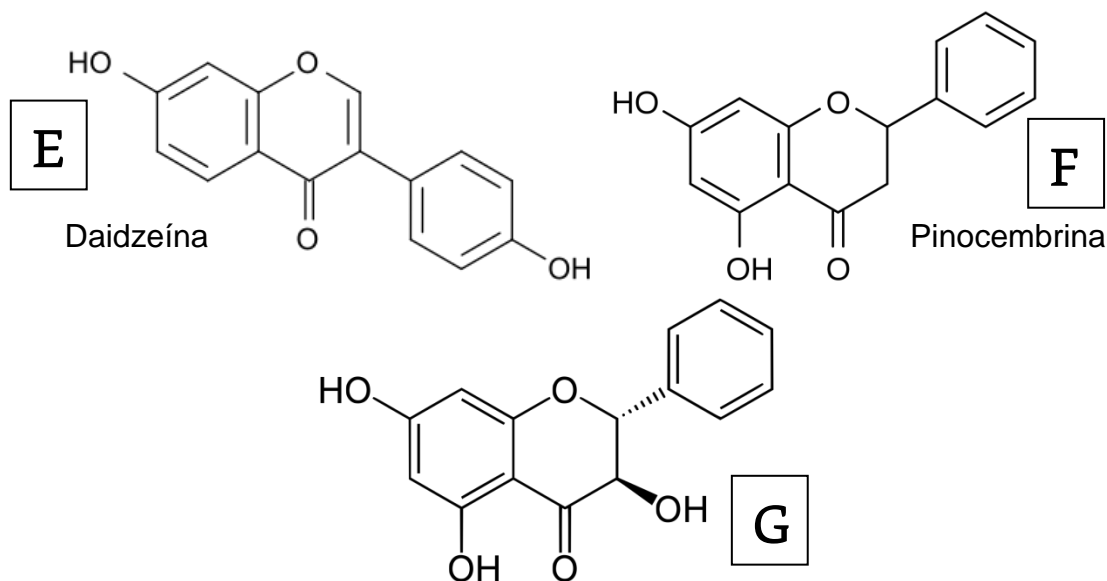
*coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (BISPO et al., 2012; DALEPRANE et al., 2012; FERREIRA et al., 2007). Com relação à toxicidade, os estudos realizados não demonstraram efeitos nocivos da PVA ao sistema nervoso central, autônomo e motor, ao menos nas doses testadas (JUNIOR et al., 2004).

A PVA é um produto fundamental para a geração de empregos e o fortalecimento da agricultura familiar no estado de Alagoas. Isto se evidencia, por exemplo, em como as pesquisas demonstram a superioridade dos resultados de atividade biológica da PVA com relação às variedades de própolis norte-americanas (BASTOS et al., 2008).

Em sua composição, a própolis é rica em flavonoides, isoflavonoides, taninos, xantonas e gutiferas, que são substâncias de forte capacidade antioxidante, especialmente os flavonoides (ROCHA et al., 2018). Um flavonol, composto da classe dos flavonoides, encontrado na PVA em alta concentração é a quercetina, conhecida pelos efeitos antiviral, anticancerígeno, antimicrobiano, anti-inflamatório, entre outros (BHATTARAM et al., 2002). Dos compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, delineiam-se os assim chamados marcadores químicos da PVA, visto que lhe são os constituintes ativos mais abundantes. São eles (Figura 5) a liquiritigenina, formononetina, biochanina A, gutiferas, terpenos, pterocarpanos, isoflavonas, chalcona, flavonona, dihidroflavonol e ácidos fenólicos (RUFATTO et al., 2018).

**Figura 5 (A-G) – Marcadores químicos da PVA.**





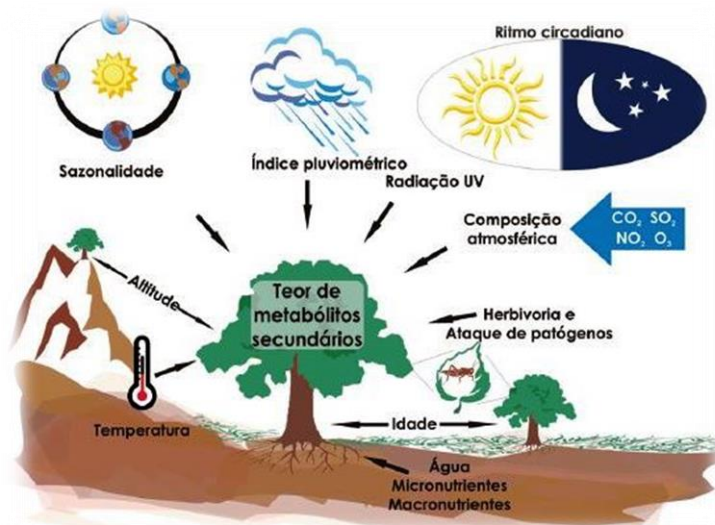
**Fonte:** Autor, 2022.

Se se intenta aferir a qualidade da matéria-prima utilizada em determinada indústria para a preparação de bioprodutos da PVA, ou mesmo se certificar da efetividade de métodos extrativos para ela empregados, faz-se imprescindível a detecção e quantificação desses marcadores, cumprindo-se deste modo a legislação vigente (ALVARENGA et al., 2009).

### 2.3 Sazonalidade

A quantidade e a qualidade da própolis dependem essencialmente da sazonalidade local do apiário. Os perfis sazonais da própolis estão intimamente relacionados a fatores como umidade relativa, luminosidade, intensidade das chuvas, temperatura, pressão atmosférica, velocidade dos ventos, ponto de orvalho etc., bióticos e abióticos (Figura 5) (HARTMANN, 2007; INOUE et al., 2007; TORETI et al., 2013).

**Figura 6** – Fatores capazes de modificar o perfil fitoquímico.



**Fonte:** GOBBO-NETO; LOPES, 2007.

Diz-se inclusive que a produtividade animal é passível de ser maximizada com a confluência de fatores genéticos e climáticos (PEREIRA, 2004). De fato, a sazonalidade interfere significativamente na composição do solo e na constituição de substâncias secundárias da vegetação regional, tratando-se de um mecanismo de adaptação das plantas ao seu ambiente; consequentemente, é um aspecto a se considerar em experimentos com própolis, em ensaios de controle de qualidade e até mesmo na elaboração de estratégias aprimoradas de colheita, valorizando deste modo os bioprodutos, por selecionarem-se os metabólitos secundários mais ativos (MORAIS, 2009; HARTMANN, 2007; TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011; SAVOI et al., 2016).

Quando, por exemplo, plantas superiores precisam-se desenvolver sob condições de multi-estresse que aumentam a concentração de espécies reativas de oxigênio em suas células, seu mecanismo de defesa tende a ser a elevação do teor de compostos antioxidantes, mantendo-se um equilíbrio pró-oxidante/antioxidante com a finalidade de contenção de danos às moléculas, células e tecidos vegetais (BULBOVAS et al., 2005; ORENES et al., 2017). A revisão de alguns estudos pode ser útil à compreensão dessa influência.

Foi possível observar, por exemplo, que, quando o teor de ácidos fenólicos diminui, se verifica, por outro lado, um aumento na concentração de ácidos diterpenóides, e isto é suficiente para mudar os efeitos biológicos que uma dada

amostra poderia realizar, de acordo com a época do ano em que se a coletou (NUNES et al., 2009).

Quanto à composição da própolis, os períodos de alta pluviosidade são causa de aumento do teor de resina, mas de redução do teor de cera (SILVA et al., 2008). Uma investigação de sazonalidade com a própolis mexicana demonstrou haver uma elevação nos níveis de compostos fenólicos e flavonoides durante o período de verão e outono, diminuindo nas estações da primavera e do inverno (VALENCIA et al., 2012). Por outro lado, diminuindo-se os níveis de compostos biologicamente ativos, como os fenólicos, ocorre um aumento de ácidos diterpênicos e outros compostos (NUNES et al., 2009). A própolis verde, por sua vez, cuja origem botânica é o alecrim (*Baccharis dracunculifolia*), exibe uma oposição entre o teor de triterpenoides e de compostos fenólicos que chega a modificar suas características organolépticas ao longo do ano, pois são classes de concentrações inversamente proporcionais, nesta variedade (TEIXEIRA et al., 2010). Em análise sazonal da própolis do estado de Santa Catarina, verificou-se que a atividade inibitória por ela efetuada contra bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) era significativamente maior durante a estação climática do outono, e o mesmo se deu para com os resultados de atividade antioxidante (DPPH●) e teor total de fenóis e flavonoides desta amostra (FIORDALISI; HONORATO; KUHNEN, 2019).

A variação sazonal da própolis pode ter sua causa elucidada mediante a investigação genética de abelhas e plantas, visto que ambas são as principais fontes dos metabólitos do apiterápico (SILICI; KUTLUCA, 2005). Pesquisas do metabolismo secundário de uvas revelaram a existência de um controle genético muito preciso da produção de substâncias bioativas, que admite alterações inclusive entre variedades de uma mesma espécie vegetal (MATTIVI et al., 2006; DEGU et al., 2015). Uma análise, em larga escala, do sequenciamento de RNA e perfil metabólico (transcriptoma e teor de fenóis, carotenoides, tocoferol e compostos orgânicos aromáticos) de uvas não pigmentadas, visando a identificar o impacto de altas temperaturas e da escassez de água na composição química destas, revelou que períodos de seca induzem maior expressão de genes essenciais para enzimas das rotas biossintéticas dos flavonoides, fenilpropanoides e terpenoides, resultando na superprodução destes compostos. É, portanto, uma tarefa árdua compreender os mecanismos envolvidos neste processo, os quais abrangem genes, fatores de

transcrição e elementos responsivos enriquecidos nas regiões promotoras dos genes (SAVOI et al., 2016).

#### 2.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, dos quais já se identificaram 8000 em frutas — sobretudo as vermelhas e azuis —, vegetais, chás, vinhos e outros produtos industrializados. Por definição, os compostos fenólicos têm no mínimo um anel aromático em sua estrutura, a que estão ligados um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, e abrangem desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ABE et al., 2007; SOARES, 2008). Eles podem manifestar-se na forma livre ou de glicosídios, ou ainda de poliglucosídios, sendo importante notar que a presença do açúcar em sua estrutura torna a molécula muito hidrossolúvel, com pouca afinidade por solventes orgânicos, o que pode ser útil na pesquisa e desenvolvimento de produtos (FURLONG et al., 2003).

Eles subdividem-se em dois grupos, a saber, os não flavonoides (fenóis simples ou ácidos) e os flavonoides (polifenóis), estes seguindo o padrão C6-C3-C6 em sua estrutura química, ao passo que aqueles podem-se classificar em até três modos: derivados das estruturas C6-C1 dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico; derivados das estruturas C6-C3 dos ácidos cafeico, p-cumárico e hidroxicinamatos; e os derivados das estruturas C6-C2-C6 do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídio (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Fazem parte dos compostos fenólicos os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e os flavonoides (FURLONG et al., 2003). Os flavonoides subdividem-se nos flavonois, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas; os não flavonoides, por seu turno, abrangem os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e felúrico, presentes em frutas como maçã, pêra, cereja, damasco, entre outras (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004).

Os compostos fenólicos são biologicamente ativos, responsáveis pelas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE et al., 2007; SOARES et al., 2008). Em virtude disso, os compostos fenólicos atuam,

na planta de origem, conferindo-lhe proteção tanto contra condições do ambiente, tais como microrganismos, pragas, luz, temperatura, umidade, quanto contra fatores internos (genéticos, nutricionais, hormonais), enquanto que, nos alimentos, estes compostos interferem no valor nutricional e na qualidade sensorial, modificando atributos como cor, textura, amargor e adstringência (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; EVERETTE et al., 2010). Em frutas, o alto teor destes compostos pode resultar em características indesejáveis, tais como o escurecimento enzimático de frutas e a interação com proteínas, carboidratos e minerais; porém, fisiologicamente, diminui o risco de doenças cardiovasculares e mitigam o estresse oxidativo suscitado por substâncias reativas oxigenadas, cujo desequilíbrio está associado a diversas doenças crônico-degenerativas como o diabetes, câncer, processos inflamatórios, aterosclerose, artrite, malária, AIDS, mal de Alzheimer, cardiopatias e o processo de envelhecimento (IMEH; KHOKHAR, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SIKORA et al., 2008). No entanto, não se podem ignorar os efeitos deletérios dos compostos fenólicos ao organismo humano: alguns deles possuem efeitos genotóxicos e carcinogênicos, atividade estrogênica (isoflavonas), interferem na biossíntese dos hormônios tireoidianos, inibem a absorção de ferro não-heme — podendo ocasionar depleção de ferro em populações privadas deste mineral —, e participam de interações medicamentosas (MENNEN et al., 2005).

Os compostos fenólicos definem-se primariamente como sequestradores naturais de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia, compondo a classe não enzimática de substâncias antioxidantes, posto que interagem com as espécies radicalares através da quelação do oxigênio tripleto e singleto ou decomposição de peróxidos, sendo consumidas durante a reação e formando radicais intermediários estáveis durante o processo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004); em outras palavras, são eles os principais agentes a proporcionar estabilidade oxidativa ao organismo que os ingere, assim como reduzir a oxidação lipídica em alimentos, conforme se verificou em análises de especiarias como o alecrim, sálvia, tomilho, cravo-da-índia etc (MADSEN et al., 1996; MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Nos flavonoides, os grupos funcionais que participam da reação antioxidante podem ser os átomos de hidrogênio de grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis) —

situados em diversas posições nos anéis benzênicos A, B e C —, as próprias duplas ligações dos anéis aromáticos e a dupla ligação da função oxo ( $-C=O$ ) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os não flavonoides reagem por meio dos grupos hidroxilas e também da proximidade do grupo  $-CO_2H$  em relação ao grupo fenil, de modo que, quanto mais próximo estes grupos estiverem um do outro, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (HRAZDINA; BORZELL; ROBINSON, 1970).

Para além da forte propriedade antioxidante, os compostos fenólicos atuam significativamente como anti-inflamatórios. O guaiacol e o eugenol, por exemplo, muito utilizados em medicamentos dentários, exibiram alta inibição da enzima lipoxigenase, realizando resposta à ação inflamatória experimental em ratos; em outro estudo, com substâncias fenólicas presentes no azeite de oliva virgem, a oleuropeína, o ácido caféico, o tirosol e o hidroxitirosol conseguiram inibir a 5-lipoxigenase de leucócitos de ratos; e, finalmente, houve trabalhos que comprovaram a atividade inibitória de certos flavonoides sobre a enzima ciclooxigenase (MORONEY et al., 1988).

Em razão de não existirem estados de deficiência para eles, consideraram-se tais compostos, por muito tempo, antinutrientes ou não-nutrientes, mas há um movimento gradual dos autores no sentido de os considerar micronutrientes do reino vegetal, ou seja parte importante da dieta humana e animal (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Métodos extrativos a quente são mais eficientes se se deseja obter maior rendimento de compostos fenólicos; por contra, o emprego de temperatura pode acarretar em degradação destes e outros compostos bioativos, o que exige cuidado durante processo de extração (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

Os ensaios de quantificação de compostos fenólicos constituem a etapa inicial de toda investigação da capacidade de produtos naturais em prevenir doenças crônico-degenerativas. A mensuração direta da capacidade redutora de tais compostos, embora seja útil num primeiro momento, deve ser seguida de metodologias mais exatas, devido à presença, na matriz, de carboidratos e outros interferentes com capacidade similar (TORRES; MAU-LASTOVICKA; REZAAIYAN, 1987; ANTOLOVICH et al., 2000).



### 2.4.1 Flavonoides

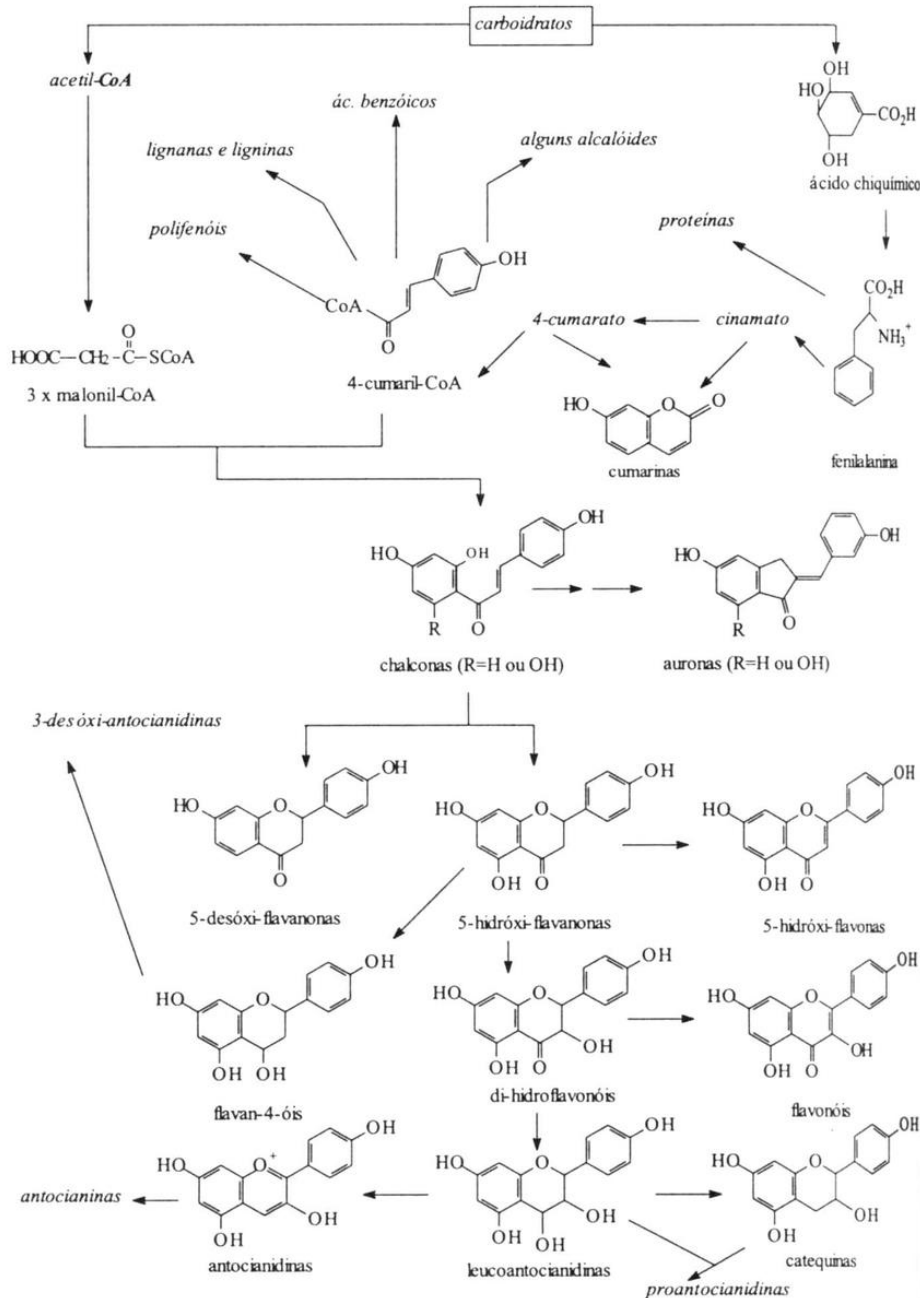
A classe dos flavonoides foi descoberta no ano de 1930, quando se isolou de laranjas, pela primeira vez, uma substância que se imaginou ser apenas mais uma vitamina, sendo chamada, à época, vitamina P, reconhecendo-se depois se tratar, na verdade, de um flavonoide. A sua ocorrência em plantas é mais frequente nas angiospermas, apresentando-se nelas com estruturas moleculares enormemente variadas; porém, há relatos da presença de flavonoides em briófitas, pteridófitas e fungos, conquanto ocorram em menor concentração e variabilidade estrutural significativamente menores. Cerca de 4200 flavonoides já tiveram sua estrutura caracterizada (SIMOES et al., 2016).

O organismo humano não é capaz de sintetizar metabólitos como os flavonoides e isoflavonoides, fazendo-se necessário obtê-los mediante a ingestão dietética (PETERSON; DWYER, 1998; LOPES et al., 2010). Nas angiospermas, encontram-se em maior concentração nas partes aéreas da planta, onde desempenham sua função de defesa contra raios ultravioleta, microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática, ou mesmo a função de atrair insetos polinizadores, razão por que é comum gerar cores próximas do azul e vermelho. Quimicamente são resistentes a altas temperaturas e moderadas variações de acidez, podendo assumir, na planta, as formas de glicosídeo, aglicona ou fazer parte de outros compostos químicos, a exemplo das flavolignanas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; KUMAR; PANDEY, 2013).

A síntese dos flavonoides dá-se através de duas vias: a do ácido chiquímico e do acetato (Figura 7). Na primeira, ocorre a biossíntese de substâncias aromáticas contendo nove átomos de carbono, tais como o ácido cinâmico e seus derivados, os ácidos cafeico, ferúlico e sináptico; na última, a planta sintetiza um tricetídeo com seis átomos de carbono. Por fim, uma reação de condensação de um dos derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo — em que o benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte — produzirá o *flavilium* (Figura 8), um composto que contém 15 átomos de carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B), os quais estão interligados por um anel pirano heterocíclico (C), tornando-se a molécula

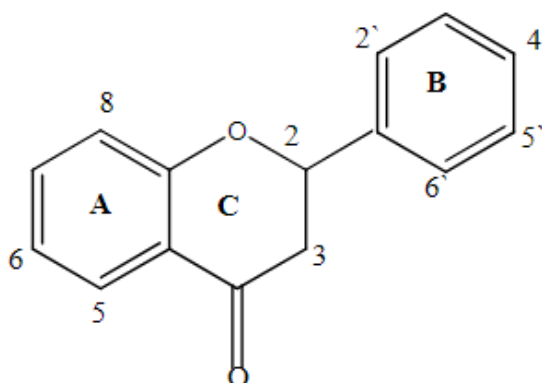
precursora de todos os demais flavonoides (AHERNE; O'BRIEN, 2002; DORNAS et al., 2007).

**Figura 7** – Representação das vias de biossíntese dos flavonoides.



Fonte: SIMOES et al., 2004.

**Figura 8** – *Flavilium*, a estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: DORNAS et al., 2007.

É particularmente por efeito do anel pirano e de substituições nos outros anéis que se chega à subclassificação dos flavonoides em flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Tais substituições incluem hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (Figura 9), de forma que os flavonoides e isoflavonoides podem-se evidenciar como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos, ou uma mistura destes (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

**Figura 9** – Subclasses de flavonoides, de acordo com seus substituintes correspondentes.

Fórmula estrutural	Flavonóides	substituições				
		5	6	7	3'	4'
 <b>Flavanona</b>	<b>Eriodictiol</b>	OH	H	OH	OH	OH
	<b>Hesperitina</b>	OH	H	OH	OH	OMe
	<b>Narinenina</b>	OH	H	OH	H	OH
 <b>Flavanol</b>	<b>Catequina</b>	OH	H	OH	OH	OH
	<b>Gallocatequina</b>	OH	H	OH	OH	OH
 <b>Flavona</b>	<b>Apigenina</b>	OH	H	OH	H	OH
	<b>Cristina</b>	H	H	OH	H	H
	<b>Luteolina</b>	OH	H	OH	OH	OH
 <b>Flavonol</b>	<b>Kamferol</b>	OH	H	OH	H	OH
	<b>Miricetina</b>	OH	H	OH	OH	OH
	<b>Quercetina</b>	OH	H	OH	OH	OH
 <b>Flavononol</b>	<b>Taxifolina</b>	OH	H	OH	OH	OH
 <b>Isoflavona</b>	<b>Daidazina</b>	H	H	OH	H	OH
	<b>Genisteína</b>	OH	H	OH	H	OH
	<b>Gliciteína</b>	OH	OMe	OH	H	OH
	<b>Formononetina</b>	H	H	OH	H	OMe

Fonte: BIRT; HENDRICH; WANG, 2001.

As atividades biológicas observadas nos estudos com flavonoides são frequentemente muito próximas àquelas exercidas pelos compostos fenólicos em geral (Tabela 2), e acredita-se que estejam relacionados à inibição que realizam nos sistemas enzimáticos das hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido-oxidases. Vale ressaltar, todavia, os comprovados efeitos citotóxico, antineoplásico, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico e antiplaquetário, ampliador da permeabilidade capilar, inibidor da exudação protéica e migrador de leucócitos, igualmente relevantes do ponto de vista terapêutico (PELZER et al., 1998; FERGUSON et al., 2001).

**Tabela 2** – Atividades biológicas de alguns flavonoides.

Flavonoide	Atividade biológica
Acacetina	Antiviral
Amentoflavona	Antiviral
Buteina	Anti-inflamatória
Hesperidina	Antioxidante
Quercetina	Antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante
Rutina	Anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral

**Fonte:** Adaptado de SIMOES et al., 2007.

As subdivisões dos flavonoides podem resumir-se nas antocianinas, que são mais presentes em frutas e flores, sendo a cianidina, delphinidina e peomidina seus compostos mais predominantes; flavanas como as catequinas, epicatequinas, proceanidinas, theaflavinas e o luteoforol, cuja concentração é maior em frutas, chás, lúpulo, nozes e água de coco; flavonas tais como a hesperidina e naringerina,

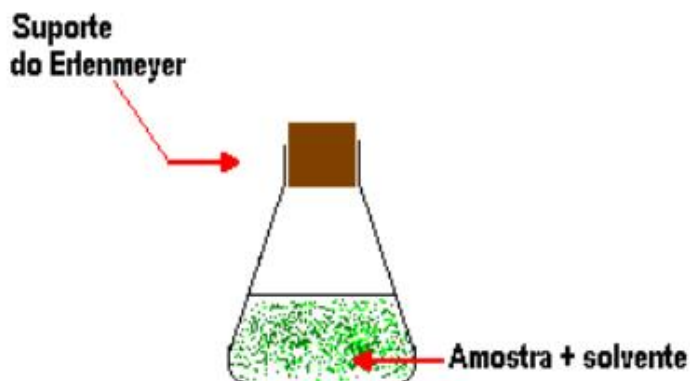
quase que exclusivas de frutas cítricas; flavonóis, que se encontram muitas vezes em frutas e folhas, principalmente representados pelas quercetinas, rutinas, micertinas e os camferóis; e os isoflavonoides, que ocorrem com frequência em legumes, sob a forma de daidzeína e genisteína (LAZARY, 2010).

Na literatura ainda são escassos estudos investigando os mecanismos de ação dos flavonoides nos sistemas fisiológicos, bem como ensaios de toxicidade. Um dos poucos mecanismos que se conhecem é o da ação antioxidante pela reação direta com radicais livres. Aceita-se, no entanto, assim como nas demais drogas, que os mecanismos de ação dependem fundamentalmente da estrutura química dos flavonoides e que existe um claro efeito sinérgico entre eles e outros metabólitos secundários, especialmente os terpenos (RODRIGUES et al., 2015).

### 2.5 Extração por maceração

O termo “maceração” tem por étimo o vocábulo latino “macerare”, que significava “embeber”, isto porque se trata de um método de extração sólido-líquido empregado a fim de se obterem os princípios ativos de drogas vegetais de forma pouco seletiva (SIMOES et al., 2016. ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; ZHANG; CUE, 2018). Em seu modo clássico, a maceração consiste em se colocar a matéria-prima vegetal em contato com um solvente (Figura 10) ou sistema de solventes (aquosos ou orgânicos), a que se denomina líquido extrator nesta circunstância e não se pode renovar, durante longos períodos (horas ou dias), a frio e em recipiente fechado, sendo possível a aplicação de agitações ocasionais ou constantes ao sistema extrativo, o que determinará se a maceração será estática ou dinâmica (MELECCHI, 2005; SIMOES et al., 2016).

**Figura 10** – Representação esquemática de uma maceração.



**Fonte:** RODRIGUES, 2002.

Por ser um método extrativo em que se não utilizam altas temperaturas, há nela a vantagem de degradar menos as substâncias termolábeis de interesse; o fato de ocorrer em sistema fechado garante também um menor grau de oxidação de princípios ativos, mas deve-se atentar para que o solvente orgânico escolhido não seja demasiadamente volátil (MIRANDA; CUÉLLAR, 2001). Entre as suas desvantagens, incluem-se: o não esgotamento da droga vegetal, seja por consequência da saturação do líquido extrator, seja pela formação de um equilíbrio difusional entre as concentrações de metabólitos nas células vegetais e no meio extrator (MIYAKE, 2016; SIMOES et al., 2016); a morosidade, porquanto se demanda tempo até que o líquido extrator seja capaz de penetrar nas estruturas celulares vegetais para dissolver os princípios ativos — motivo por que a maceração é mais indicada para drogas vegetais livres de estrutura celular, tais como gomas, resinas e alginatos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013.; SIMOES et al., 2016); e a possibilidade de proliferação microbiana no sistema extrativo em caso de o líquido extrator ser hidroalcoólico, não se recomendando, portanto, o uso de concentrações etanólicas abaixo de 20% (MELECCHI, 2005; SIMOES et al., 2016).

O método de maceração admite certas variações com o objetivo de aumentar a eficiência extrativa. Como *digestão*, a maceração dá-se em sistema aquecido entre 40-60 °C; havendo agitação constante, será chamada *dinâmica*, e, em caso contrário, será chamada *estática*; optando-se pela renovação do líquido extrator, a maceração passa a ser *remaceração* (SIMOES et al., 2016).

Tanto a velocidade para se atingir o equilíbrio difusional como a eficiência da maceração são determinados por fatores inerentes ao material vegetal, ao líquido

extrator e às condições do sistema, tomadas em conjunto (ANVISA, 2010; SIMOES et al., 2016). Os fatores relacionados ao material vegetal são a quantidade, natureza, teor de umidade, tamanho de partícula e capacidade de intumescimento; os fatores relacionados ao líquido extrator são a seletividade e quantidade; e os fatores relacionados ao sistema extrativo são a proporção droga:líquido extrator, temperatura, agitação, pH e tempo de extração (SIMOES et al., 2016).

## 2.6 Espectrofotometria de absorção em UV-Vis

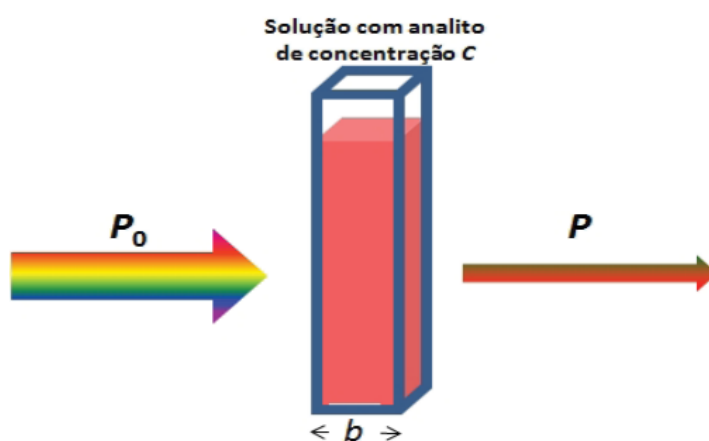
A espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) consiste em uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas na pesquisa científica e nas indústrias farmacêutica, química, têxtil e de alimentos, em razão de sua rapidez, robustez, simplicidade de utilização, baixo custo operacional, alta confiabilidade dos resultados e versatilidade. É um método amplamente aplicado na quantificação de fármacos em fluidos biológicos e em setores de controle de qualidade, vantajoso, em comparação aos métodos cromatográficos, por requerer menores quantidades de solvente, menor tempo para a preparação de amostras, e depender de uma instrumentação muito mais barata (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003; BAURES et al., 2007; GALO; COLOMBO, 2009; OJEDA; ROJAS, 2009; ALVES et al., 2010; BARBOZA et al., 2010; SKOOG et al., 2013). É um método amplamente aplicado na quantificação de fármacos em fluidos biológicos e em setores de controle de qualidade (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003), vantajoso, em comparação aos métodos cromatográficos, por requerer menores quantidades de solvente, menor tempo para a preparação de amostras, e depender de uma instrumentação muito mais barata (WEINERT; PEZZA; PEZZA, 2008).

Tal como toda técnica espectroscópica, o princípio da espectrofotometria UV-Vis está no produto da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, medindo-se a quantidade de energia absorvida por espécies químicas de interesse, orgânicas ou inorgânicas, a fim de se chegar a determinações qualitativas e quantitativas delas (GIL, E. S., 2010; SKOOG et al., 2013). Conforma-se também aos demais métodos espectroscópicos quanto à sua seletividade e sensibilidade, as quais se alteram em função da concentração de amostra, estrutura química das substâncias analisadas e intensidade da energia utilizada (GIL, E. S., 2010). A radiação eletromagnética é simultaneamente energia propagada em ondas —

assumindo comprimentos de onda distintos, na ordem de nanômetros ( $10^{-9}\text{m}$ ) — e um fluxo de partículas, os fótons, cuja magnitude de energia será diretamente proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento da onda (ANVISA, 2010). Especificamente nesta técnica, utilizam-se comprimentos de onda entre 190 e 800 nm (ZAIAS, 2006), sendo a faixa de 180 a 400 nm correspondente à radiação ultravioleta, e a luz visível, de 400 a 800 nm (SPUDEIT, 2009).

Na espectrofotometria UV-Vis, um equipamento faz passar um feixe de luz através de uma solução contendo as substâncias que se quer investigar (Figura 11), tais como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, metabólitos secundários, plasma, aminoácidos etc.; uma rede de difração, contida no aparelho, separa a luz em comprimentos de onda específicos, possibilitando a emissão de feixes monocromáticos (MENDHAM; AFONSO, 2002; ALVES; SILVA; GUERRA, 2010; SKOOG et al., 2013). Esta emissão espectral contínua, de acordo com o comprimento de onda selecionado e da substância em questão, é capaz de efetuar transições eletrônicas na molécula, promovendo para orbitais de maior energia os elétrons participantes de ligações químicas, entrando em um estado excitado; mas a transição não é contínua: sucede por etapas (BRUICE, 2006; ANVISA, 2010).

**Figura 11** – Passagem de radiação por uma amostra, em espectrofotometria.



**Fonte:** Adaptado de passos SKOOG et al., 2013.

O equipamento calcula, em seguida, a diferença entre o valor da radiação emitida pelo aparelho ( $P_0$ ) e o da transmitida — em retorno e sempre menor que a inicial — pela amostra ( $P$ ), obtendo-se consequentemente a quantidade de luz que



ela absorveu ou, em outras palavras, a atenuação da intensidade de radiação pela amostra e pelo percurso de medição (ZAIAS, 2006; THOMAS; BURGESS, 2017). Se expresso como transmitância (T), o resultado será definido pela equação da figura 12; se na forma de absorbância (A), será alcançado pela equação da figura 13 (AVILA, 2012).

**Figura 12** – Equação da transmitância (T).

$$T = \frac{P}{P_o}$$

**Fonte:** SKOOG et al., 2013.

**Figura 13** – Equação da absorbância (A).

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_o}{P}$$

**Fonte:** SKOOG et al., 2013.

Além da interação direta entre a radiação UV-Vis e a molécula que se está investigando, este método permite a medição de substâncias submetidas a reações de derivação química, podendo também ser acoplada a outras técnicas como eletroforese e cromatografia (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Importa efetuar reações de derivação especialmente nos casos em que a espécie química estudada não contém grupos cromóforos em sua estrutura, não sendo capazes, portanto, de realizar em si a transição de elétrons para outros níveis de energia; nestes casos, opta-se por reações de complexação para se inserirem tais grupos na estrutura molecular (HIGSON, 2009).

Uma vez que se intente, por intermédio da técnica de UV-Vis, determinar a identidade de uma espécie química em algo semelhante a uma “impressão digital”, ainda que seja parte de uma solução de composição complexa — como é frequente em matrizes de origem vegetal —, será preciso elaborar o espectro de absorção do

composto sob análise, que consiste em um gráfico da absorbância em função de diversos comprimentos de onda (Figura 14); o gráfico demonstrará, pois, a região em que o analito absorve maior energia, a que se chama também limite máximo de absorção (VINADÉ; VINADÉ, 2005; HARRIS, 2008). Os espectros de absorção serão mais confiáveis e acurados na medida em que o equipamento esteja corretamente calibrado, em condições adequadas de manutenção, e que seja operado por analistas capacitados, respeitando-se os procedimentos pré-estabelecidos, bem como as instruções e recomendações do fabricante do equipamento (THOMAS; BURGESS, 2017). Os espectrofotômetros mais modernos trazem a vantagem de poderem gerar, de maneira direta e automática, espectros de absorbância (SKOOG et al., 2013).

**Figura 14** – Espectro de absorção de uma proteína, a título de exemplo.

$$\log_{10} (I_0/I) = A = \epsilon b c$$

**Fonte:** MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2020.

A espectrofotometria UV-Vis está baseada na Lei de Lambert-Beer, que determina a absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). A mesma Lei, cuja equação consta na figura 15, define que a quantidade de energia absorvida pelo analito (A) dependerá diretamente de fatores como a concentração de soluto (c), a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) a extensão do caminho que a luz tem de percorrer através da amostra (b) — o caminho óptico (AVILA, 2012). Cumpre notar, porém, que a Lei de Lambert-Beer, traz consigo os seguintes pressupostos: a radiação incidente na amostra deve ser monocromática; não pode haver desvios relacionados a dispersão ou reflexão da luz; as interações intermoleculares na amostra não podem causar interferências na absorbância detectada; e a temperatura durante a leitura deve ser constante (THOMAS; BURGESS, 2017). A dispersão da luz, que compromete a aplicabilidade da Lei de Lambert-Beer, é muito comum quando a amostra contém partículas suspensas, seja devido à formação de precipitados, seja pela sua própria natureza; nestes casos, pode-se recorrer a algoritmos para compensação da interferência, no espectro de absorção (LI et al., 2019).

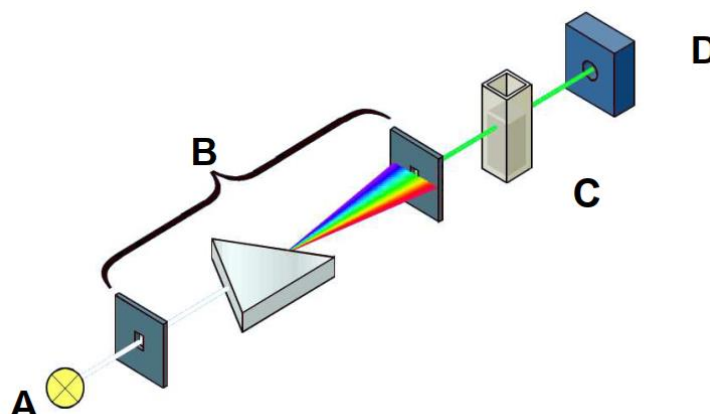
**Figura 15** – Lei de Lambert-Beer.

$$\log_{10} (I_0/I) = A = \varepsilon b c$$

**Fonte:** ARAUJO, 2019.

Com relação à instrumentação (Figura 16), o equipamento espectrofotométrico é constituído de seis componentes essenciais. O primeiro é a fonte de radiação (A), também denominada fonte de iluminação ou fonte luz: consistem em lâmpadas alógenas de deutério e tungstênio para a emissão do feixe de luz na região do UV e do visível, respectivamente. O segundo é o monocromador ou seletor de comprimento de onda (B): podem ser de prismas, grade ou filtro, e sua função é selecionar, do espectro de emissão de luz, o comprimento de onda que for da preferência do analista. O terceiro é a cela de absorção (C), também chamada de cubeta ou compartimento para a amostra: é o local onde se colocará a amostra para leitura, através do qual passará o feixe de luz, e podem ser fabricadas em quartzo fundido, sílica fundida, acrílico ou vidro (Tabela 3), sendo estes dois últimos materiais recomendados apenas em análises na região do visível, pois que absorvem radiação UV, ocasionando a reflexão da luz. O quarto componente é o detector de radiação (D), cuja função é captar a luz transmitida da amostra e convertê-la em sinal elétrico: se possuir somente um detector, o espectrofotômetro será chamado monocal ou temporal, mas se tiver vários, será chamado multicanal ou espacial, com a capacidade de registrar diversos comprimentos de onda simultaneamente. Há, em seguida, uma unidade responsável pela leitura e processamento do sinal elétrico, e, por fim, um mostrador digital, que exibirá ao analista os valores de absorbância e transmitância obtidos (RAIMUNDO JR; PASQUINI, 1997; SPUDEIT, 2009; SASSAKI, 2009; ANVISA, 2010).

**Figura 16** – Representação esquemática dos componentes internos de um espectrofotômetro UV-Vis.



**Fonte:** SPUDEIT, 2009.

**Tabela 3** – Alguns materiais em que se podem fabricar cubetas, com sua faixa ótima de absorção.

Material da cubeta	Comprimento de onda (nm)
Quartzo fundido	190-800
Vidro	380-780
Plástico	380-780

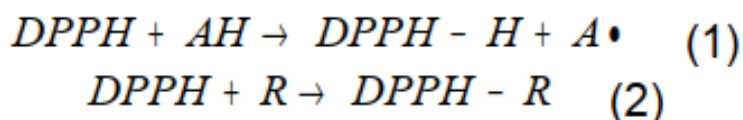
**Fonte:** MARIANO, 2018.

#### 2.6.1 Capacidade de sequestro de radicais DPPH• (2,2–difetil–1–picril-hidrazila) para determinação da atividade antioxidante

O notável valor comercial e terapêutico dos compostos fenólicos e demais substâncias antioxidantes presentes em matrizes complexas tem propiciado — com mais intensidade desde a década de 1990 — o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas cada vez mais simples e baratas para a determinação da atividade antioxidante de, por exemplo, extratos vegetais, frutas e alimentos, que se intensificou (PALANISAMY et al., 2011). Porém, tais métodos não traduzem com exatidão a capacidade antioxidante que se dá *in vivo*, isto é, nas próprias células vegetais, posto que nestas existe adicionalmente um sistema antioxidante enzimático de atividade dinâmica, compreendendo enzimas como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato redutase etc (NEILL et al., 2002).

Atualmente, há disponível uma grande diversidade de metodologias analíticas para esse fim, que se segmentam em métodos colorimétricos, biológicos, eletroquímicos e outros métodos instrumentais (BORGES et al., 2011), destacando-se, no entanto, como mais utilizados, os métodos colorimétricos de captura do radical orgânico ABTS, ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), e o de sequestro do radical orgânico DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila, figura 17), que demonstra excelente reprodutibilidade quando realizada em condições previamente estabelecidas (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; WOJDYŁO; OSZMIAŃSKI; CZEMERYŚ, 2007). Os ensaios recebem, portanto, o mesmo nome do reagente que terá absorção atenuada por ação dos antioxidantes presentes amostra analisada, sendo também o reagente o fator determinante do custo de todo o processo (BUTERA et al., 2002).

**Figura 17** – Equação química da reação de redução do DPPH•.

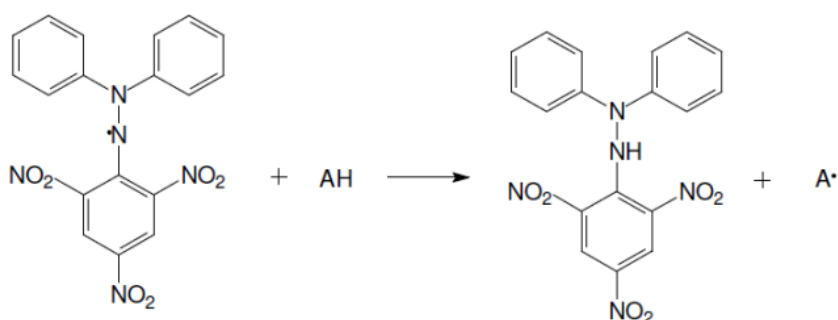


**Fonte:** MILARDOVIĆ; IVEKOVIĆ; GRABARIĆ, 2006.

O método de DPPH• fundamenta-se na estabilização dos radicais de DPPH• pela doação, para estes, de um átomo de hidrogênio presente na estrutura química dos antioxidantes (ROUSSIS et al., 2008). Antes da reação, o radical possui um elétron desemparelhado e exibe coloração violácea; em seguida, a doação de hidrogênio por parte dos compostos antioxidantes presentes na amostra converte o DPPH• à sua forma reduzida (difenil-picril-hidrazina, figura 18), o que resulta em transição da cor púrpura para o amarelo. Em virtude de o DPPH• demonstrar absorção máxima em comprimentos de onda próximos de 517 nm, é nesta região do espectro ultravioleta e visível que se deve monitorar, mediante a leitura de alíquotas de ensaio das amostras, o declínio de absorbância decorrente da reação (ROUSSIS, I. G. et al., 2008; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERTONCELJ, 1997; CHANDRASEKAR et al., 2006; BERTONCELJ, et al., 2007). Por último, as absorbâncias obtidas são utilizadas tanto para a exposição dos resultados em termos da percentagem de sequestro de radicais DPPH• para determinação da atividade antioxidante —

correspondente à fração de DPPH• consumida na reação —, como para se realizar do cálculo da concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), a que se designa também concentração inibitória ( $CI_{50}$ ), um parâmetro que expressa a concentração de amostra necessária para se diminuir da absorbância inicial do radical DPPH• em 50% (SOUSA et al., 2007; ROUSSIS et al., 2008).

**Figura 18** – Redução do radical DPPH• por um composto antioxidante.



**Fonte:** Adaptado de BUKMAN, 2012.

A primeira proposta de utilização do DPPH• com o fim de se detectarem doadores de hidrogênio em matérias naturais (exemplos na tabela 4) surgiu em meados da década de 50 (ROGINSKY; LISSI, 2005). A despeito de a forma oxidada do DPPH• mostrar-se estável, com baixas taxas de deterioração e reatividade, de modo que apenas fortes reagentes redutores conseguem fazê-lo reagir (SANTOS et al., 2007), este método possui duas desvantagens importantes, a saber, que não raro ocorrem interações entre o DPPH• e radicais *alquil* provenientes das mais diversas classes de metabólitos secundários, tornando-o pouco seletivo para detectar a capacidade antioxidante de grupos específicos de compostos, além de a curva de resposta em função do tempo — até se atingir o estado estacionário — ser não linear (TIVERON, 2010).

**Tabela 4** – Percentagem de sequestro de radicais DPPH• de alguns metabólitos secundários.

Composto	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
Ácido clorogênico	50	27	0
Ácido dicafeoilquinico	53	42	0

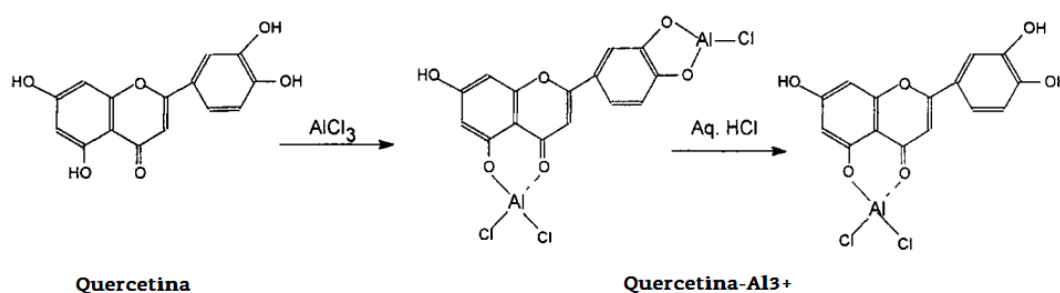
Quercetina-3-O-galactosídeo	41	32	0
Quercetina-3-O-raminosídeo	29	25	0
Ácido cafeico	100	100	20
Quercetina	100	94	18

**Fonte:** Adaptado de VITURRO; MOLINA; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1999.

### 2.6.2 Determinação do teor total de flavonoides por leitura direta em UV-Vis

Uma das aplicações da espectrometria UV-Vis consiste na leitura direta de amostras, em comprimento de onda específico, tencionando-lhes determinar a concentração total de flavonoides. Chama-se “direta” por não exigir, para o seu cumprimento, reações químicas quelantes — como a reação de complexação na figura 19, por exemplo, que possibilita a quantificação de flavonoides numa amostra através da coloração emitida pelo seu produto — ou reagentes de derivatização, sendo aplicável à PVA, embora o não seja para todos os tipos de amostra, o que o torna um método rápido e de menor custo. Todavia, é uma das maneiras menos exatas de quantificação de flavonoides.

**Figura 19** – Reação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), para a quantificação de flavonoides totais.

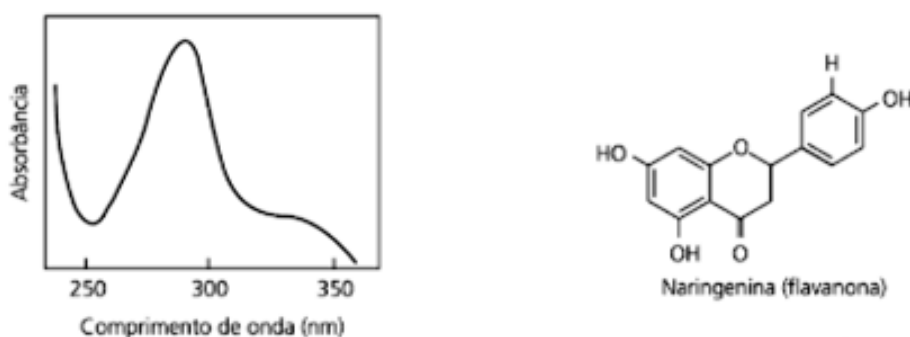


**Fonte:** Adaptado de ULUBELEN; TOPCU; KOLAK, 2005.

Análises espectrofotométricas de tinturas, extratos brutos, extratos clorofórmicos e microcápsulas de PVA revelaram uma absorbância máxima no comprimento de onda de 280 nm (ARRUDA, 2018). Nesse sentido, pesquisadores

visaram à escolha de um padrão analítico de flavonoide cuja absorbância máxima se aproximasse dos 280 nm e que tivesse, ao mesmo tempo, características físico-químicas semelhantes à maioria dos demais compostos de sua classe. Uma opção é o emprego da naringenina, posto que é um flavonoide da subclasse das flavanonas que exhibe absorbância máxima aproximada de 292 nm (Figura 20), mais específico que a quercetina — por exemplo, cujos comprimentos de onda máximo variam entre 250 nm e 370 nm — para a determinação de flavonoides totais.

**Figura 20** – Espectro de absorção e fórmula estrutural da naringenina.

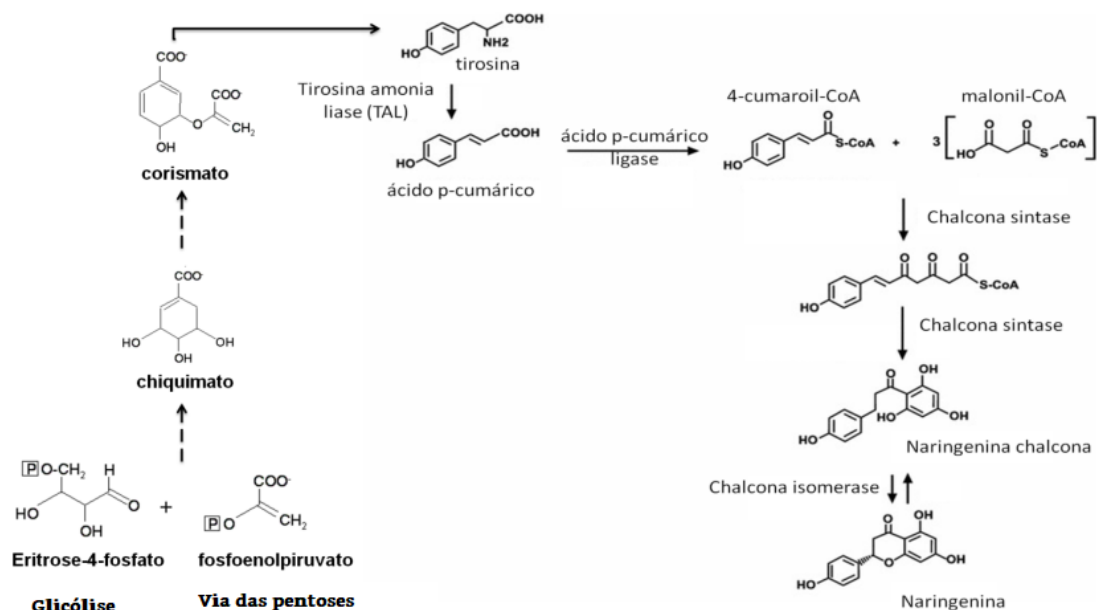


**Fonte:** Adaptado de DAMODARAN; PARKIN, 2018.

A naringenina, tal como a hesperidina, é encontrada amplamente em frutas cítricas (laranja, toranja etc.), estando presente também na casca de tomate (GROHMANN; MANTHEY; CAMERON, 2000). Possuindo 272.26 g/mol de peso molecular, apresenta solubilidade em solventes orgânicos, como o etanol, sendo porém praticamente insolúvel em água, um fator que lhe diminui a biodisponibilidade (SUMATHI; TAMIZHARASI; SIVAKUMAR, 2015). Uma vantagem adicional no emprego da naringenina neste ensaio é a sua estrutura química, por ser um composto anterior, na rota do ácido chiquímico, à síntese dos demais flavonoides. Na biossíntese (Figura 20), uma molécula de 4-cumaroil-CoA reage com 3 moléculas de malonil-CoA, por catálise da enzima chalcona sintase, formando a naringenina chalcona que, por ação da chalcona isomerase, será em seguida modificada para a naringenina propriamente (WU et al., 2014).

**Figura 21** – Resumo das rotas biossintéticas por que se forma, nas plantas, a naringenina.





**Fonte:** Adaptado de DAMODARAN; PARKIN, 2018.

## 2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A utilização da cromatografia tomou início em 1906, pelo botânico russo Mikhail S. Tswett, que experimentava a separação dos componentes de extratos de folhas. Há trinta anos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido um dos métodos analíticos de boa sensibilidade mais empregados para a separação, purificação, quantificação e identificação — por comparação com padrões analíticos ou caracterização via ressonância magnética nuclear (RMN) — de compostos não voláteis e termicamente instáveis contidos em matrizes complexas (TONHI et al., 2002; LANÇAS et al., 2009). É considerada uma técnica indispensável em laboratórios químicos e farmacêuticos, devido à sua capacidade de separar com eficiência até mesmo substâncias estruturalmente semelhantes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação, em que os solutos presentes numa determinada amostra têm de percorrer um sistema constituído por duas fases imiscíveis: a fase estacionária, que é sólida e está fixada no interior da coluna cromatográfica, e a fase móvel (eluente), que é líquida e, em fluxo contínuo, carrega os analitos ao longo da coluna, mantendo-os em contato constante com a fase estacionária. No percurso (eluição), os

componentes da amostra retêm-se seletivamente na fase estacionária, de acordo com a afinidade que têm por ela, num fenômeno denominado “migração diferencial” (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Tal afinidade é determinada pelo coeficiente de partição dos analitos, os quais, ao saírem sequencialmente da coluna, são submetidos a análises em sistemas hifenados de detecção e/ou quantificação como o arranjo de diodos (DAD) — que proporciona espectros de varredura, caso os compostos apresentem grupos cromóforos em sua estrutura —, o detector de massas e a fluorescência, todos altamente sensíveis e que registram continuamente a passagem dos compostos em função do tempo, gerando o cromatograma (HOSTETTMANN et al., 1984; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; RODRIGUES et al., 2006).

Existe ainda uma classificação dos detectores: eles podem ser seletivos ou universais, conforme a sua capacidade de identificar todas as substâncias ou tão somente classes de compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). São transdutores, que percebem variações nas concentrações dos analitos presentes na fase móvel e convertem isto num sinal, o qual será registrado em um processador de dados e, em seguida, tendo sido interpretado por ele, será exibido em termos qualitativos e quantitativos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Quanto melhores forem os detectores, maior será o impacto na seletividade da própria CLAE, na análise de substâncias de interesse (SANTOS, 2010).

A CLAE diferencia-se das demais técnicas de cromatografia líquida principalmente em consequência de sua instrumentação semi ou totalmente automatizada, de suas colunas serem recheadas com fase estacionária disposta em um alto grau de compactação, de o eluente ser bombeado sob altas pressões durante as análises, de ser possível a injeção de volumes muito pequenos e reproduzíveis de amostra, assim como a detecção de concentrações baixíssimas de analito (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

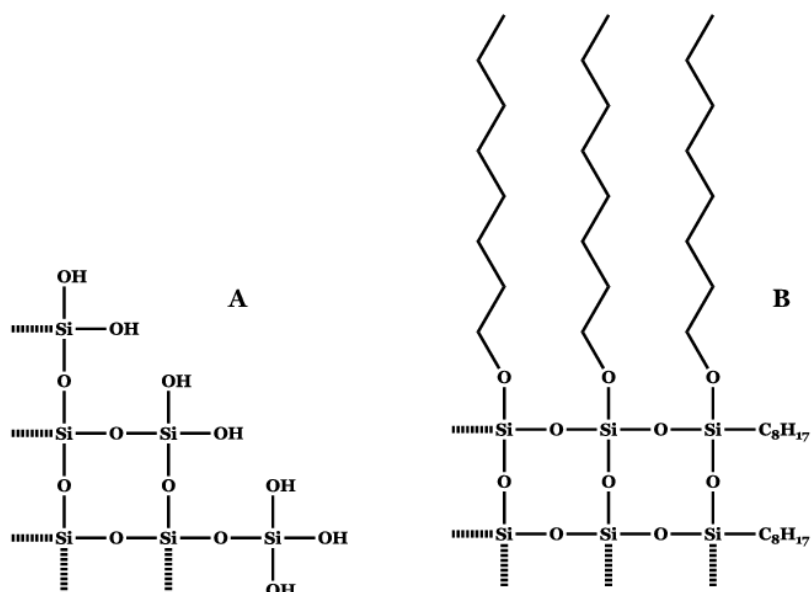
A possibilidade de se combinarem diversos tipos de fase móvel e estacionária fazem da CLAE um método sobremodo versátil (LANÇAS et al., 2009). Um exemplo disto é a quantificação de polifenóis, que tem sido preferencialmente realizada por CLAE, selecionando-se quase que exclusivamente a fase estacionária reversa ( $C_{18}$ ), sistema binário de solventes e detecção através de DAD (IGNAT; VOL; POPA, 2011). Além disso, a repetição da análise de uma mesma amostra, empregando-se

variadas fases móveis e colunas, aumenta o número de picos no cromatograma e amplia o conhecimento acerca da composição da amostra (SIMOES et al., 2004). A escolha dos solventes que irão compor a fase móvel deve considerar algumas características como, por exemplo, se eles têm a força de eluição, seletividade, pureza, miscibilidade com outros componentes da fase móvel e com os analitos, compatibilidade com o detector hifenado etc (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Em se tratando da fase móvel, esta pode fazer parte da análise cromatográfica de dois modos: o primeiro é chamado isocrático, em que a percentagem dos solventes utilizados na eluição permanece constante durante toda a análise, enquanto que o segundo, o modo por gradiente, se dá pela variação na composição da fase móvel ao longo da corrida. O modo por gradiente, conquanto mais dispendioso e complexo que o modo isocrático, supera-o por ser mais rápido e separar melhor as substâncias, produzindo picos mais bem definidos e simétricos (MEYER, 1993).

De outro lado, estima-se que a fase estacionária mais comum em laboratórios que utilizam a CLAE seja a de modalidade reversa (~90%); nesta modalidade invertem-se polaridades, sendo a fase estacionária apolar, composta de polímeros orgânicos ou sílica modificada ( $C_{18}$ ), e a fase móvel, polar, o que facilita a escolha de solventes menos tóxicos, mais baratos, estáveis, aumentando também a velocidade da análise e conferindo boa reprodutibilidade aos tempos de retenção (TONHI et al., 2002). As fases móveis mais empregadas na modalidade reversa são a água, a acetonitrila, o metanol e o tetraidrofurano (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A figura 22 exhibe as diferenças estruturais existentes entre a sílica que compõe uma fase estacionária normal (A) e a sílica de fase reversa (LOPES, 2014).

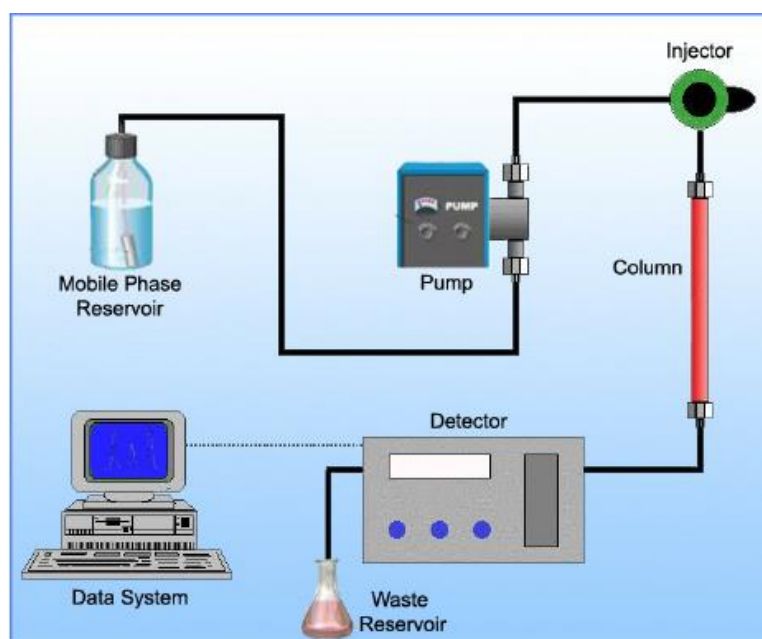
**Figura 22 (A-B)** – Estruturas químicas da sílica normal (A), polar, e da sílica modificada (B), não polar.



Fonte: LOPES, 2014.

Os componentes de um equipamento de CLAE (Figura 23) são, em resumo, os reservatórios contendo os solventes que formarão a fase móvel, a bomba de alta pressão, o injetor de amostra, a coluna recheada com fase estacionária, os detectores — que se dispõem em módulos —, e o computador, tanto para a leitura dos dados registrados como para o controle dos módulos (MIGUES, 2018).

**Figura 23** – Representação esquemática de um equipamento de CLAE.



**Fonte:** SALVATO; CARVALHO, 2010.

As colunas utilizadas em CLAE são reaproveitáveis e não requerem regeneração após cada análise. Em geral, elas são fabricadas em aço inoxidável e não se podem corroer pela fase móvel possuindo comprimento entre 10-25 cm e diâmetro de aproximadamente 0,45 cm, se forem analíticas, ou entre 25-30 cm de comprimento e 2,2 cm de diâmetro, se preparativas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Um dos fatores que mais contribuem para a boa reprodutibilidade da CLAE é a vazão contínua e controlada que a bomba de alta pressão exerce na fase móvel, durante a eluição. A vazão varia na faixa de 0,01 a 5 mL/min nas aplicações analíticas, de 0,05 a 200 µL/min em análises utilizando colunas microbore ou capilar, e atinge até 100 mL/min nas aplicações preparativas. Além disso, essas bombas devem operar a pressões de 0,1 a 350 bar, preservando a precisão e exatidão que se obteriam em análises a pressão quase ambiente (CIOLA, 2003; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

#### 2.7.1 Análise de perfil químico (*fingerprint*)

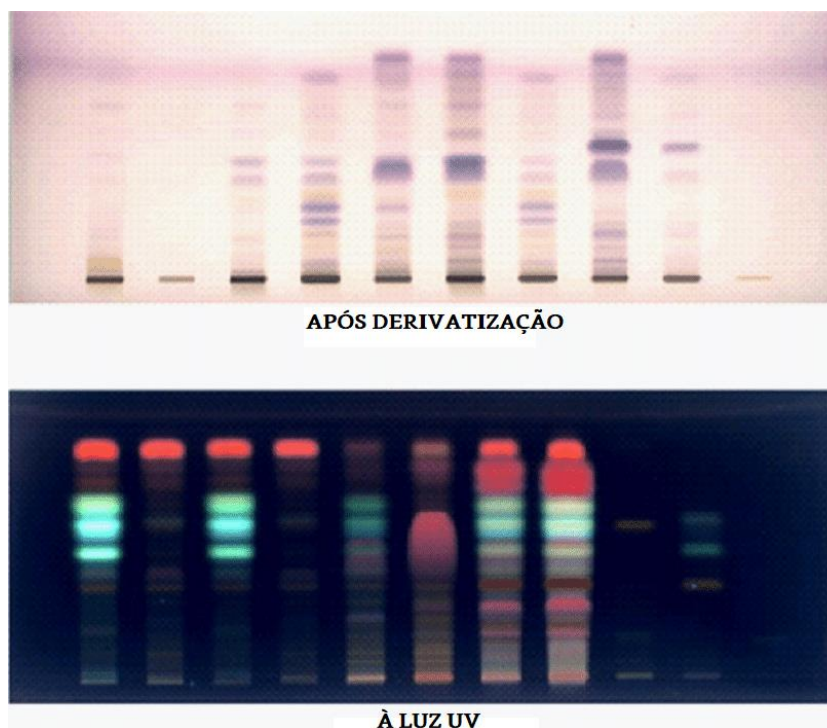
A análise de perfil químico é uma técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e Food and Drug Administration (FDA), com o objetivo de se avaliar a qualidade de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, mediante a detecção e/ou quantificação simultânea de marcadores químicos ou farmacológicos nessas matrizes (ZHA et al., 2012; MOK; CHAU, 2006). A Farmacopeia Chinesa tem sugerido o emprego do *fingerprint* cromatográfico no controle de qualidade de misturas complexas como as plantas medicinais, considerando-o um método eficaz e confiável (STEINMANN; GANZERA, 2011). O *fingerprint* consiste, pois, em uma descrição do padrão de complexidade química de amostras vegetais (MARTINS; PEREIRA-FILHO; CASS, 2011), a representação mais próxima possível da mistura de substâncias que a compõe (NICOLETTI, 2011).

Por definição, marcadores químicos são as substâncias — ou classe de substâncias — utilizadas como referência no controle de qualidade de matérias-primas vegetais ou de produtos acabados, de preferência as que lhes são mais abundantes e detêm atividade terapêutica. Não é obrigatório ao marcador químico

possuir ação biológica, mas importa que ele tenha restrição taxonômica (especificidade) suficiente e que seu padrão analítico esteja disponível no mercado. O controle de qualidade preconizado pela ANVISA envolve a determinação qualitativa e quantitativa desses marcadores (BRASIL, 2014A; BRASIL, 2014B). Em virtude de se tratar de toda a composição fitoquímica verificável em extratos brutos, o fingerprint é uma análise mais completa do que a simples determinação ou quantificação dos marcadores químicos (XU et al., 2006).

Nesse sentido, podem-se empregar técnicas espectroscópicas, eletroforéticas ou cromatográficas, sendo a CLAE a metodologia mais empregada; a mera obtenção de um cromatograma, sem identificação ou quantificação de cada metabólito, é aceita como um perfil químico da amostra vegetal (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2017; GOODARZI; RUSSELL; VANDER-HEYDEN, 2013). A figura 24 traz um exemplo de *fingerprint* de extrato vegetal, obtido por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE). Todavia, o cromatograma fornece somente os aspectos qualitativos da composição química da amostra, não revelando o número total de constituintes presentes na amostra e, por essa razão (HENDRIKS et al., 2005), deve ser associado a técnicas farmacognósticas de determinação de cinzas totais e insolúveis, teor de extrativos, índice de espuma, identificação botânica e caracterização macro e microscópica, com vistas ao desenvolvimento de uma metodologia abrangente de controle de qualidade para fitoterápicos (VIGO; NARITA; MARQUES, 2004). Recomenda-se também a utilização de ferramentas quimiométricas adequadas, que compensem, até certo ponto, as inconveniências intrínsecas à análise cromatográfica (baixa relação sinal/ruído, picos assimétricos, variação no tempo de retenção, complexidade das amostras), obtendo-se o máximo de informações úteis sobre o bioproduto no menor tempo possível (HAKIMZADEH; PARASTAR; FATTAHI, 2014).

**Figura 24** – Cromatograma ou *fingerprint* de um extrato vegetal, a que se aplicou, para leitura, reagente de derivatização e luz UV.



**Fonte:** DAS; GEZICI, 2018.

Na prática se segue o conceito de fitoequivalência, segundo o qual o cromatograma obtido da amostra vegetal — demonstrando o seu perfil fitoquímico — deve ser comparado com um cromatograma de uma planta medicinal de referência, cuja eficácia clínica tenha sido previamente comprovada. Havendo semelhança estatística entre os perfis, pode-se considerá-los equivalentes (RODRIGUEZ et al., 2012). Alguns métodos quimiométricos são aplicáveis à fitoequivalência, pois permitem a detecção de pequenas diferenças entre os perfis cromatográficos que são imperceptíveis visualmente, promovendo controles de qualidade mais precisos (YONGYU et al., 2011; ANHESINE, 2018).

O enfoque das análises de perfil químico está sobretudo no âmbito do controle de qualidade de todo o processo de fabricação de um bioproduto, tendo em vista que se tem exigido deles maior segurança toxicológica e constância na ação terapêutica, duas características fundamentalmente influenciadas pela constituição química da planta de origem, que é complexa e pode-se modificar em função da exposição a toxinas, perturbações genéticas ou ambientais, condições de armazenamento, irradiação solar, umidade, tipo de solo, tempo de colheita, diferenças nas espécies botânicas, os quimiotipos usados e a parte anatômica da

planta utilizada. O perfil químico não se restringe ao controle de qualidade industrial e à pesquisa científica: é de grande utilidade para se realizar a certificação de origem e a verificação de autenticidade ou adulteração de extratos vegetais (CABRAL, 2010; MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; DONNO et al., 2016). Outras aplicações do *fingerprint* dos marcadores químicos está na identificação de espécies ou variedades de plantas, quando, por alguma razão, for inviável fazê-lo por meio de análise morfológica (SHAW; BUT, 1995).

## 2.8 Testes de atividade antimicrobiana

Os testes de susceptibilidade (TS) têm por objetivo determinar o perfil de sensibilidade de microrganismos a antimicrobianos, e são uma das principais metodologias utilizadas em laboratórios de microbiologia clínica (CAMPANA et al., 2011). São técnicas cujos resultados orientam a escolha das terapias antimicrobianas mais apropriadas, tendo acentuada importância no controle terapêutico de infecções microbianas e no monitoramento da resistência a antimicrobianos (SOUZA et al., 2010; CAMPANA et al., 2011).

Nos TS, também designados de antibiogramas, microrganismos são submetidos ao contato com concentrações preestabelecidas de antimicrobianos, as quais são determinadas de acordo com os níveis séricos atingidos em pacientes em condições relativamente normais de saúde (TURNIDGE, 2015). Por tratar-se de um teste *in vitro*, o TS alude a duas variáveis — o antimicrobiano e o microrganismo —, ignorando portanto os aspectos da infecção mais relacionados ao organismo do paciente, como idade, sítio de infecção, *clearance* renal, entre outros, que se conheceriam através de ensaios *in vivo* (TURNIDGE, 2015).

Os resultados fornecidos pelo TS são indispensáveis para os médicos que se propõem a prever o desfecho do tratamento de infecções. Em geral existem três resultados possíveis, a saber, que um microrganismo é “sensível” ao antimicrobiano testado, que ele é “resistente”, ou que sua susceptibilidade é “intermediária”. Contudo, não se pode determinar com exatidão o sucesso da antibioticoterapia apenas com base no antibiograma, e por isso é preferível referir-se a probabilidades: quando “sensível”, há maior probabilidade de o paciente responder favoravelmente à terapia com o fármaco administrado em doses adequadas; quando “resistente”, a probabilidade maior é de que a terapia falhe; e no caso de sensibilidade



“intermediária”, exige-se do médico cautela com relação à sua prescrição, para que se altere o esquema terapêutico (posologia, fármaco etc.), caso se verifique a necessidade (TURNIDGE, 2015; PFALLER; YU, 2001).

Idealmente o TS deve proporcionar uma medida real da atividade de um ou mais agentes antimicrobianos, estar associado com a atividade *in vivo*, ser um ferramental útil no monitoramento do desenvolvimento de cepas resistentes e comprovar o potencial terapêutico de fármacos antimicrobianos há pouco descobertos (PFALLER; YU, 2001). À vista disso, realizam-se ensaios de controle de qualidade — com cepas padrões American Type Culture Collection (ATCC) — que determinarão a precisão e acurácia dos procedimentos praticados, bem como a qualidade dos materiais empregados e a conduta do analista do TS (PAIVA, 2010).

Cada país tem as suas próprias metodologias padronizadas para TS, as quais são estabelecidas em conformidade com referências técnico-científicas e publicações em consensos, o que acarreta em diferentes padrões de resistência e interpretações variadas de resultados. Recomenda-se, pois, que os patógenos analisados em TSA constem nessas padronizações e que se lhe conheça a resistência intrínseca frente a determinados agentes antimicrobianos (CLSI, 2016).

Entre os comitês internacionais responsáveis pela padronização de metodologias de TS, destacam-se o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Europa), a Société Française de Microbiologie Methodologie (França), a British Society for Antimicrobial Chemotherapy Methodology (Inglaterra), o Deutsches Institut für Normung Methodology (Alemanha) e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, EUA), que se chamava anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); o Brasil, porém, não possui normas padronizadas para si, de modo que os laboratórios brasileiros, em sua maioria, seguem as condições propostas pelo CLSI para antibiogramas (PAIVA, 2010).

Em 1982, o CLSI criou um sub-comitê com o intuito de investigar e definir variáveis para os TS, como os pontos de corte (*breakpoints*) de suscetibilidade, composição de meios de cultura, preparação e tamanho dos inóculos, temperatura e tempo de incubação, concentração de íons, porque são todos fatores críticos de reprodutibilidade das TS, que interferem na correta interpretação dos ensaios (REX et al., 2001; PAIVA, 2010; SILVA et al., 2010).

Com efeito, são diversas as metodologias disponíveis para a realização de antibiogramas (RELLER et al., 2009), mas as que se sobressaem, tidas como padrão-ouro nos laboratórios de microbiologia clínica, são precisamente a diluição em ágar e a microdiluição em caldo, as quais demonstram a sensibilidade em termos quantitativos, isto é, pela concentração inibitória mínima (CIM) (CAMPANA, 2011); a microdiluição em caldo ainda apresenta a vantagem de não ser influenciada pela velocidade de crescimento do microrganismo (OSTROSKY et al., 2008). Diferenciam-se, portanto, das técnicas qualitativas como a disco difusão, não somente na forma do resultado, mas também por se mostrarem laboriosas para execução em laboratórios de rotina e mais susceptíveis a erros, quando não são automatizadas (CAMPANA, 2011; GOULART, 2017).

Ademais, a CIM é um excelente parâmetro para a avaliação do desempenho de outras metodologias de TS e a potência de novos fármacos antimicrobianos, em laboratórios de diagnóstico (ANDREWS, 2001). No entanto, não se deve confundir os conceitos de CIM com CBM (concentração bactericida mínima); enquanto este indica a concentração mínima necessária para matar um microrganismo-teste, aquele se refere à concentração mínima necessária apenas para lhe inibir o crescimento (JAWETZ; LEVINSON, 2005; CLSI, 2008). Nos casos clínicos em que o paciente apresenta infecção leve, não há tanto a necessidade de se obter CIM, permitindo-se a prescrição de um tratamento empírico, que em geral é ágil e relativamente eficaz. Em contrapartida, as infecções graves — especialmente as que acometem pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) — de fato exigem a determinação da CIM de combinações de microrganismos/antimicrobianos, assim como uma atenção maior por parte de toda a equipe de saúde, que pode mudar o fármaco e o esquema posológico selecionados (CAMPANA, 2011).

Vale salientar que os TS possuem aplicações para além da análise de fármacos antimicrobianos. Em consequência do surgimento e disseminação de cepas resistentes, têm crescido o interesse dos pesquisadores por determinar a sensibilidade de microrganismos a extratos de plantas utilizadas na medicina popular (MENDES et al., 2011). O alvo dos estudos tem sido isolar desses extratos e de outros produtos naturais novos agentes antimicrobianos cuja eficácia e espectro de ação sejam comparáveis aos dos fármacos convencionais, e que

apresentem, ao mesmo tempo, menor toxicidade, custo e impacto ambiental que eles (CLEFF et al., 2012; BONA et al., 2014).

O TS é uma das técnicas mais importantes no *screening* de plantas com potencial antibacteriano (ALVES et al., 2008). Muito mais aqui se deve atentar para aqueles fatores que influenciam na reprodutibilidade do método e interpretação dos resultados, tais como composição do meio de cultura, características dos microrganismos-testes, método de extração (incluindo-se o líquido extrator utilizado), concentração de extrato, pH e solubilidade das amostras no meio de cultura (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988), uma vez que a uniformização de metodologias elaborada pelos comitês internacionais contempla antimicrobianos com parâmetros já conhecidos, havendo poucos estudos comparando metodologias de antibiograma para extratos vegetais, o que gera muitas discrepâncias entre os resultados obtidos por diferentes pesquisadores que investigam a mesma espécie, ainda que as condições experimentais sejam iguais (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; COWAN, 1999). Por semelhante modo ocorre com os antimicrobianos convencionais, mesmo sob condições controladas, mas neste caso se aceita como reprodutível quando a CIM tem no máximo uma diluição de diferença entre os testes realizados (CLSI, 2011).

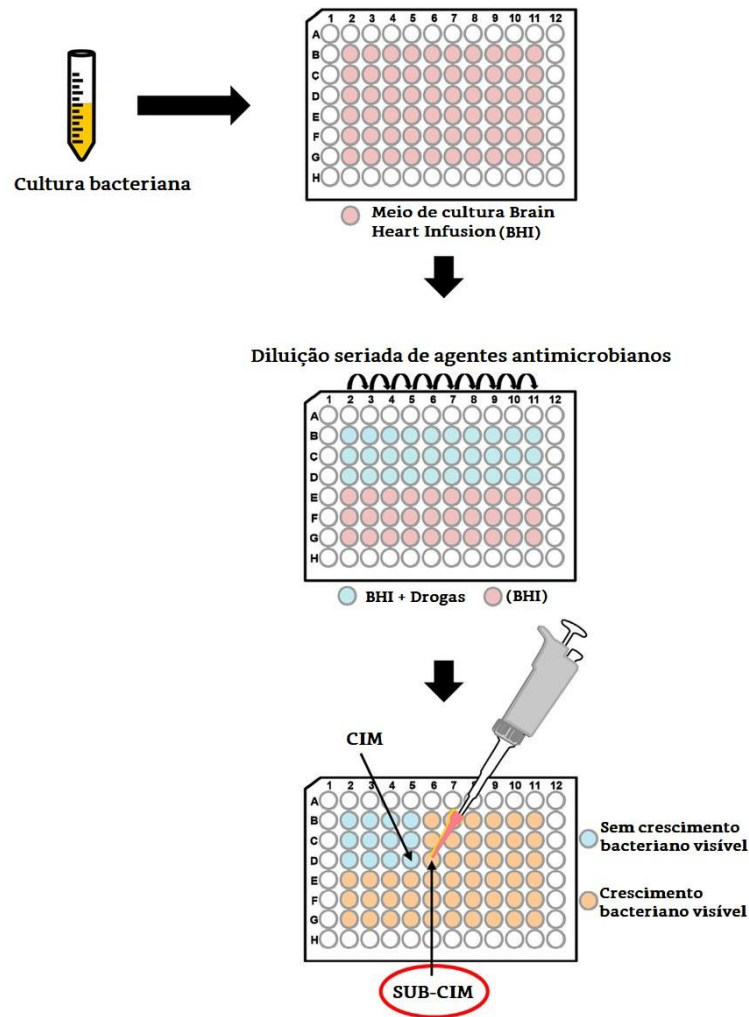
Podem-se utilizar métodos vários para a avaliação da capacidade antimicrobiana de extratos vegetais: disco-difusão, macrodiluição e microdiluição em caldo e difusão em ágar por poço (ALVES et al., 2008; BONA et al., 2014), mas se tem dado preferência aos dois últimos métodos para a determinação de CIM's e CBM's destas matrizes, devido a apresentarem maior sensibilidade (OSTROSKY et al., 2008; LEITE, 2016). Alguns autores propõem também o método de disco-difusão como forma de análise qualitativa (BONA et al., 2014), enquanto outros reforçam a necessidade de aliar o método de base caldo com o de base ágar a fim de se obterem resultados confiáveis da atividade antimicrobiana de extratos de plantas (OTHMAN et al., 2011). Não obstante o profuso conhecimento e padronização da técnica de macrodiluição, tem-se optado com frequência pela microdiluição, por esta demandar volumes pequenos de fármacos — porque é possível adicionar mais de um antimicrobiano num mesmo poço —, reagentes e meios de cultura, tornando o ensaio mais econômico, menos dependente de equipamentos e dando-lhe maior

celeridade (SOUZA et al., 2010; LEITE, 2016). Na verdade, a microdiluição é uma versão adaptada da macrodiluição em caldo.

O método de microdiluição em caldo ocorre em placas de microdiluição com 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico, todos previamente esterilizados (CLSI, 2015). O condutor do experimento, porém, deve evitar a incubação de mais de quatro placas simultaneamente, porquanto empilhá-las pode comprometer a temperatura nos poços e, por conseguinte, desviar os resultados (CLSI, 2015).

Primeiramente se devem preparar as suspensões bacterianas em caldo Mueller Hinton, na concentração de 0,5 de McFarland, a qual se pode obter por nefelometria ou mediante comparação visual com um tubo de ensaio comercial de turbidez padronizada. As suspensões são, então, transferidas para os poços e diluídas com alíquotas de Mueller Hinton, cujo volume seja o necessário para se atingir a concentração final de bactérias de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL após a adição do antimicrobiano, este também calculado conforme as concentrações finais de interesse. Em seguida se põe a microplaca em uma estufa bacteriológica, onde ela ficará durante 16 a 24 horas (*overnight*) em incubação a 35 °C e, por fim, será analisada quanto à presença ou ausência de turbidez, significando que houve crescimento microbiano ou eficácia do antimicrobiano testado, respectivamente (PAIVA, 2010). Logo, se considerará CIM a menor concentração testada que tenha sido capaz de inibir o crescimento do microrganismo, ou seja cessar a turvação (PAIVA, 2010). Mas neste ponto há uma importante observação: a CIM não representa um valor absoluto, pois o CIM real está entre o CIM obtido no teste e a concentração imediatamente abaixo a esta, na qual ainda houve crescimento (CLSI, 2011). A figura 25 contém uma ilustração esquemática desta metodologia.

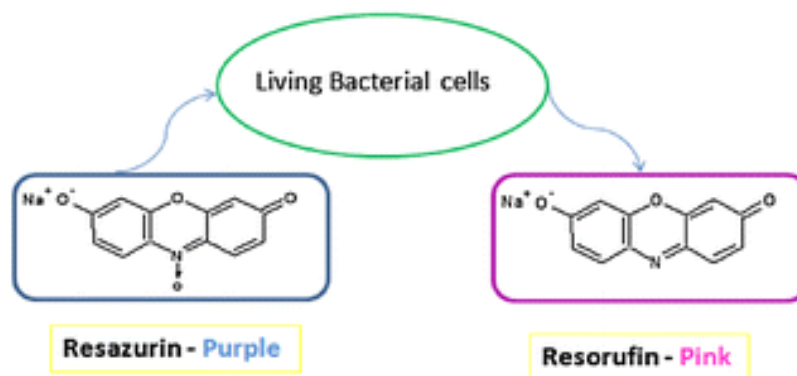
**Figura 25** – Ilustração esquemática do método de microdiluição em caldo.



**Fonte:** Adaptado de WANG et al., 2017.

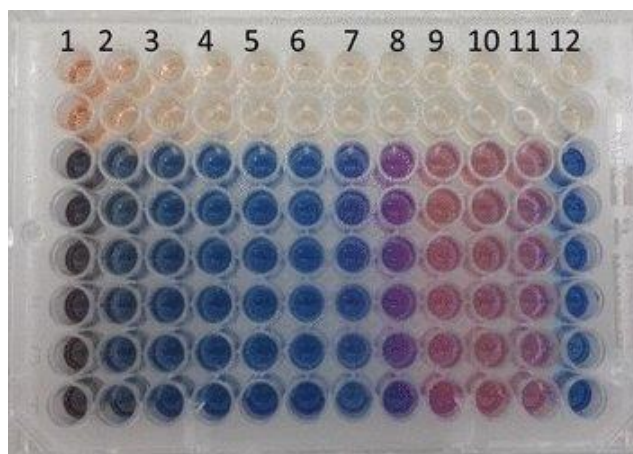
A turbidez pode ser verificada por uma simples inspeção visual ou com auxílio de algum aparelho baseado em leitura óptica, como a espectrofotometria, depois de se adicionar aos poços alguma substância reveladora de células viáveis (MOSMANN, 1983; ALVES et al., 2008). Uma das substâncias reveladoras usualmente empregadas é a resazurina, a qual reage com as células bacterianas vivas (Figura 26), produzindo a cor rosa, cuja intensidade pode-se verificar por espectrofotometria (Figura 27).

**Figura 26** – Modificações químicas na resazurina após reação com células bacterianas.



**Fonte:** Adaptado de ELSHIKH et al., 2016.

**Figura 27** – Poços contendo resazurina, após a interação antimicrobiano-bactéria. A maior intensidade da cor rosa indica maior crescimento bacteriano.



**Fonte:** ELSHIKH et al., 2016.

Uma das possibilidades de erro na aferição da CIM, na microdiluição em caldo, está no efeito inóculo. Tal fenômeno ocorre quando a concentração final de bactérias nos poços ultrapassa em muito aquela preconizada pelo CLSI; consequentemente se elevarão os valores de CIM observados no ensaio, sendo possível até mesmo a mudança de categoria de sensibilidade do microrganismo à droga, a depender da magnitude do erro, passando de “sensível” para a “resistente” (CORRADO; LANDESMAN; CHERUBIN, 1980; MIYAZAKI et al., 2009).

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da variabilidade sazonal sobre parâmetros químicos e biológicos da Própolis Vermelha de Alagoas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Coletar de amostras de PVA compreendendo um ciclo de 12 meses;
- Obter extratos brutos hidroetanólicos das amostras de PVA através de extração clássica por maceração;
- Realizar ensaio químico da capacidade de sequestro de radicais DPPH• dos extratos brutos de PVA;
- Determinar o teor total de flavonoides dos extratos brutos de PVA por meio de espectrofotometria UV-Vis;
- Identificar, utilizando a CLAE-DAD, os marcadores químicos (compostos fenólicos) que compõem a PVA;
- Determinar a CIM dos extratos brutos de PVA frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), através da metodologia de microdiluição em caldo.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Coleta das amostras de PVA

Todas as amostras de PVA utilizadas neste estudo foram provenientes do apiário Primavera (latitude sul: 9° 42.258', latitude oeste: 35° 54.391' e altura de 35,5 metros do nível do mar). Realizou-se a coleta de 30g de amostra de PVA, uma vez por mês, entre os meses de abril de 2017 a março de 2018, abrangendo assim um período de um ano. A pesquisa com a PVA tem cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), com código A2D6EF9.

Após a coleta, cada amostra era adequadamente acondicionada em uma embalagem plástica e, em seguida, armazenada em um refrigerador, permanecendo em baixas temperaturas até ao momento da extração.

Os dados meteorológicos de intensidade de chuva foram adquiridos no portal do Instituto Nacional de Meteorologia ([www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br)), terminal A303 — Maceió.

### 4.2 Extração

A extração da PVA foi realizada de acordo com o método de maceração exaustiva. Retiraram-se, para tanto, 10g de massa de cada amostra, que foram submetidos a extração com o emprego de 250 mL de solução hidroetanólica a 80% (v/v), em três ciclos, obtendo-se finalmente doze extratos líquidos, cada um com volume de 750 mL.

Posteriormente, efetuou-se a concentração dos extratos através de evaporação rotativa (Figura 28, Fisatom, Brasil), os quais foram transferidos para frascos parcialmente fechados e postos em uma estufa, onde se mantiveram até que todo o seu resíduo de líquido extrator pudesse evaporar, formando-se extratos brutos de PVA, secos (Figura 29). Estes foram armazenados em congelador, a -20 °C, até que pudessem ser analisados.

**Figura 28** – Extratos líquidos de PVA em processo de concentração por evaporação rotativa.





**Fonte:** Autor, 2022.

**Figura 29** – Parte do extrato bruto após concentração e secagem.



**Fonte:** Autor, 2022.

#### 4.3 Capacidade de sequestro do radical DPPH●

O ensaio químico de DPPH● consistiu em uma adaptação do método proposto por BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995), sendo realizado a fim de se conhecer a capacidade de sequestro de radicais DPPH● dos extratos brutos de PVA. Nesse sentido, preparou-se uma solução estoque de DPPH● na concentração de 0,1 mM, por meio da pesagem  $3,9 \times 10^{-3}$ g do reagente e, logo depois, da sua dissolução em 100 mL de etanol absoluto.

Em seguida, extratos de PVA foram preparados pesando-se 50mg dos extratos brutos, em balança analítica, com sua subsequente dissolução em 10 mL

de etanol absoluto, obtendo-se extratos de 5 mg/mL das amostras de todos os meses. Alíquotas desses extratos, bem como 2 mL da solução estoque de DPPH•, foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, os quais foram depois preenchidos com etanol absoluto até o traço de aferição, produzindo-se as misturas reacionais. Os extratos de PVA reagiram, portanto, nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL, durante 30 minutos, em ambiente protegido da luz. Este processo foi realizado em triplicata.

A absorbância da solução estoque e o consumo do DPPH• após a reação foram ambos monitorados em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UVmini-1240), no modo fotometria, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) programado para 518 nm. Os dados de absorbância obtidos na leitura foram posteriormente inseridos na equação da capacidade de eliminação experimental (% CEE), presente na figura 28, segundo OLIVEIRA (2015) — em que  $A_{\text{amostra}}$  = absorbância da solução DPPH• com amostras;  $A_{\text{branco}}$  = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH;  $A_{\text{controle}}$  = absorbância da solução referência de DPPH (etanol).

**Figura 30** – Equação da capacidade de eliminação experimental (% CEE).

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

**Fonte:** OLIVEIRA, 2015.

#### 4.4 Determinação do teor total de flavonoides por leitura direta de naringenina em UV-Vis

A fim de elaborar uma curva de calibração da naringenina, preparou-se uma solução estoque de 500 µg/mL deste padrão analítico, a partir da qual se obtiveram diluições nas concentrações de 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL e 17,5 µg/mL. Todas foram depois submetidas a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UVmini-1240), no comprimento de onda de 280 nm. A curva de calibração fora previamente validada com dados de precisão intermediária, exatidão e linearidade.

A preparação dos extratos de PVA — para posterior leitura direta no espectrofotômetro — ocorreu do seguinte modo: pesaram-se 50mg dos extratos brutos de cada mês, os quais foram dissolvidos, em seguida, em 10 mL de etanol

96% (v/v), obtendo-se soluções estoque na concentração de 5000 µg/mL. Estas foram diluídas com a retirada e transferência de alíquotas de 50 µL para balões volumétricos de 5 mL, produzindo-se extratos de PVA a 50 µg/mL.

Os extratos de PVA, referentes aos meses de abril de 2017 a março de 2018, foram então analisados diretamente no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 280 nm, e o cálculo da concentração total de flavonoides foi realizado através da equação da reta obtida na curva de calibração da naringenina.

#### 4.5 Ensaio de identificação e quantificação de marcadores (flavonoides) por CLAE-DAD

O equipamento utilizado para a execução da cromatografia (CLAE-DAD, Shimadzu) possuía, entre os seus componentes, detectores de fotodiodos (modelo EPDM-20A), detector de ultravioleta (modelo SPD-M20A), detector de fluorescência (modelo RF-20A), controlador (modelo CBM-20A), bomba de alta pressão (Nexera, modelo LC-20ADXR), desgaseificador (modelo DGU-20A3R), autoinjeter (modelo SIL-20AXR) e coluna cromatográfica em forno (CTO-20A), tudo isso gerido por um software — Shimadzu Labsolution.

Utilizaram-se neste estudo fase estacionária em modalidade reversa (C<sub>18</sub>, 150 × 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta de água Milli-Q (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A vazão, por sua vez, esteve programada em 0,3 mL/min. A eluição teve início no modo por gradiente, com 70% do solvente A e 30% do solvente B, passando, aos 40 minutos, para o modo isocrático com 100% de acetonitrila, permanecendo nesta concentração até aos 53 minutos, tempo em que se retornou ao gradiente inicial (30% de acetonitrila), mantendo-se assim até ao fim da eluição, aos 60 minutos. Todas as análises foram realizadas no mesmo dia útil, e empregaram-se tais condições tanto para os extratos como para os padrões comerciais de daidzeína, liquiritigenina, isoliquiritigenina, pinobanksina, formononetina, pinocembrina e biochanina A, com o intuito de os identificar pela comparação de tempos de retenção..

Dos padrões analíticos, ainda se prepararam soluções de 200 µg/mL que foram diluídas para as concentrações de 7,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,15 µg/mL. Com estas se elaboraram curvas de calibração no

detector ultravioleta que está acoplado ao equipamento da CLAE-DAD, com o objetivo de quantificar esses compostos.

#### 4.6 Teste de microdiluição em caldo

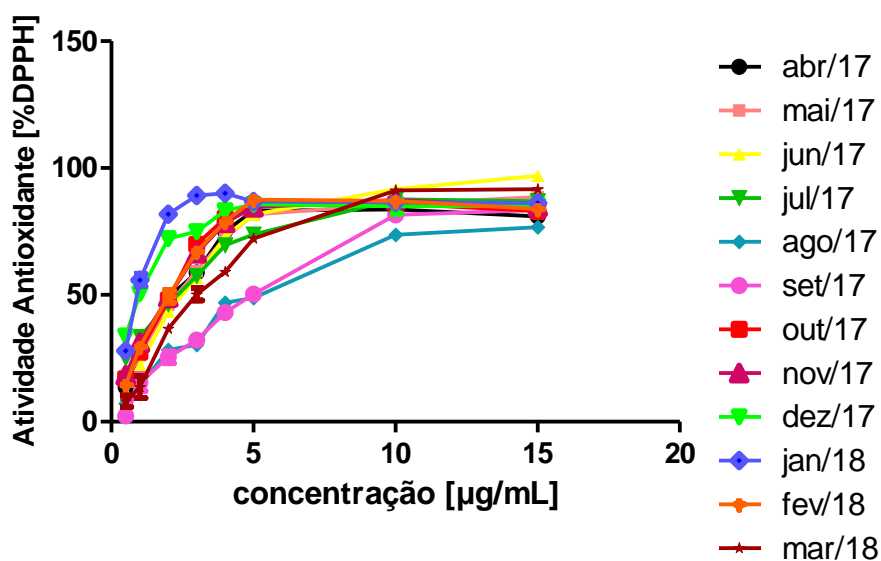
Buscou-se a determinação da CIM da PVA para as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), em conformidade com a metodologia de microdiluição em caldo preconizada pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Os extratos brutos de PVA de cada mês foram pesados e utilizados na preparação de soluções estoque em metanol, das quais se retiraram alíquotas para subsequente diluição seriada em caldo Mueller-Hinton, já em placas de microdiluição com 96 poços, atingindo-se um volume de 190 µl e concentrações de extrato de 0,25 a 4096 µg/mL. Para a obtenção do inóculo bacteriano, realizou-se primeiro o cultivo das bactérias em ágar Brain Heart Infusion (BHI), durante 24 horas, a aproximadamente 37 °C. Das culturas retiraram-se alíquotas de tal modo que, ao se inserirem 10 µl de inóculo em cada poço, se alcançassem suspensões bacterianas na concentração de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa, onde ficaram por 24 horas, a 37 °C. Ademais, o controle negativo foi realizado empregando-se apenas o solvente utilizado na preparação das soluções estoque de extrato, a fim de se avaliar a interferência do metanol nos resultados do ensaio; o controle positivo, por outro lado, realizou-se com ciprofloxacino. Encerrando-se o período de incubação, houve, para a leitura das placas, a adição de 10 µl do corante resazurina em cada poço, realizando-se em seguida uma nova incubação, que durou cerca de 2 horas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A própolis que foi objeto deste estudo faz parte do grupo 13 na classificação das variedades brasileiras (MENDONÇA, 2011), tendo evidentemente a coloração vermelha, assim como outras própolis da região Nordeste (Paraíba, Bahia, Rio Grande do Norte), mas se distingue exatamente por ser originária das áreas de manguezais do município alagoano de Marechal Deodoro — onde vegetação e fatores sazonais unem-se para formar uma própolis com propriedades físicas, químicas e biológicas próprias (TORETI et al., 2013; SIMOES et al., 2016) —, possuindo inclusive seu selo de indicação geográfica emitido pelo INPI (BRASIL, 2012). Em razão disso, importa ir além da avaliação de como a variabilidade sazonal altera as características da própolis: é preciso também comparar os resultados aqui observados com os de autores que investigaram variedades de outros estados do Nordeste, de modo que se compreendam as vantagens e desvantagens da própolis com relação às suas congêneres.

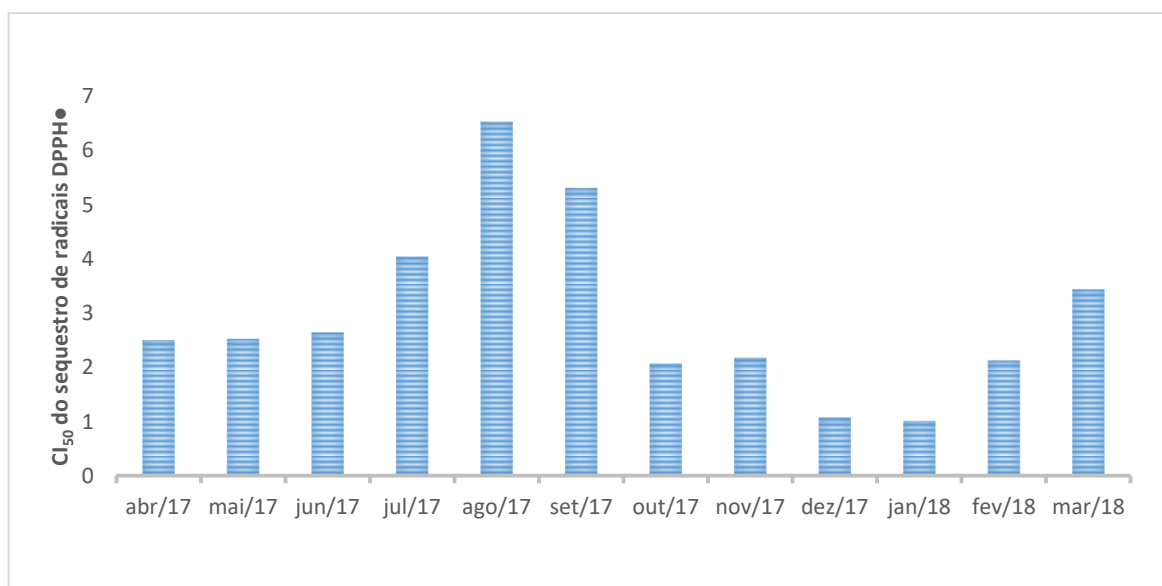
Os resultados obtidos no ensaio da atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH●, para as amostras referentes a cada mês, estão dispostos na figura 29, cujo gráfico fornece a percentagem de sequestro em função da concentração de extrato. Estes dados foram utilizados na preparação do gráfico seguinte, constante na figura 30, em que se converteu a percentagem na concentração mínima necessária para se atingir 50% de capacidade de eliminação experimental — o  $CI_{50}$ .

**Figura 31** – Percentagem de sequestro de radicais DPPH● das amostras de abril de 2017 a março de 2018, em função da concentração de extrato.



Fonte: Autor, 2022.

**Figura 32** –  $CI_{50}$  do sequestro de radicais DPPH• das amostras de abril de 2017 a março de 2018.



Fonte: Autor, 2022.

O gráfico da figura 29 demonstra que todas as concentrações analisadas apresentaram alguma ação antioxidante frente ao radical DPPH•. Ademais, as %CEE seguiram um padrão diretamente proporcional à concentração de extrato, independentemente da amostra analisada, em conformidade com o que se espera

de ensaios espectrofotométricos (AVILA, 2012), além de indicar que a metodologia foi corretamente executada pelos analistas. Ainda neste gráfico, verifica-se que as %CEE tenderam a atingir um limite na concentração de 5 µg/mL, algumas amostras mais rapidamente, outras com mais dificuldade, exceto as de setembro e agosto de 2017, precisamente porque foram estas as que tiveram um desempenho inferior no ensaio. A maior capacidade de sequestro do radical DPPH• correspondeu ao mês de janeiro de 2018 ( $\approx 1$  µg/ml), enquanto que a menor se situou no mês de agosto de 2017 ( $\approx 6,5$  µg/ml). A visualização dos resultados torna-se mais clara no gráfico da figura 30, contendo-os no formato de  $CI_{50}$ .

A amostra do mês de agosto de 2017 — de resultado inferior — apresentou CEE de 7,20% na concentração de 0,5 µg/mL, enquanto que, na concentração de 15 µg/mL, a sua CEE foi de 76,67%. Logo, os resultados do presente estudo mostraram-se superiores aos obtidos por RIGHI et al., (2011), em cujo trabalho a própolis vermelha do município de Maceió (Alagoas) demonstrou CEE de 39,12% na máxima concentração testada, 25 µg/mL; a concentração mínima testada pelos referidos autores foi de 8 µg/mL, abaixo da qual não houve sequestro de radical. Superaram também as %CEE relatadas no estudo de SILVA et al., (2019) com a variedade vermelha do estado do Rio Grande do Norte, no qual, das quatro amostras que analisaram, o melhor resultado, isto é, o menor  $CI_{50}$  verificado, foi 54,14 µg/mL, enquanto a amostra de agosto de 2017 do nosso estudo exibiu  $CI_{50}$  por volta de 6 µg/mL. O  $CI_{50}$  do sequestro de radical DPPH• de amostras da própolis vermelha produzida no município de Vitória da Conquista (Bahia), pesquisadas por REIS et al., (2019), apresentou variação entre 103,85 µg/mL e 72,70 µg/mL, sendo expressiva, mas ainda menor que a PVA de Marechal Deodoro. Com efeito, até mesmo a própolis vermelha do estado de Sergipe teve resultado inferior, apresentando  $CI_{50}$  de 294 µg/mL, segundo FROZZA et al., (2013). Essas comparações, contudo, não são muito exatas devido às diferenças nas condições de extração e de preparação das amostras entre os estudos, embora os resultados do ensaio de DPPH• não sofram interferência do tipo de substrato utilizado (MOURE et al., 2001). Os resultados comparados de DPPH• entre as regiões de origem estão fixados na tabela 5.

**Tabela 5** – Comparação da capacidade antioxidante com própolis vermelhas de outras regiões.

Própolis Vermelha (Nordeste)		PVA (Marechal Deodoro)	Referências
<b>Maceió (AL)</b>	39,12%, a 25 µg/mL	76,67%, a 15 µg/mL (ago/17)	<i>RIGHI et al., (2011)</i>
<b>Rio Grande do Norte</b>	54,14 µg/mL (CI50)	≈6,5 µg/mL (CI50, ago/17)	<i>SILVA et al., (2019)</i>
<b>Bahia</b>	72,70 µg/mL (CI50)	≈6,5 µg/mL (CI50, ago/17)	<i>REIS et al., (2019)</i>
<b>Sergipe</b>	294 µg/mL (CI50)	≈6,5 µg/mL (CI50, ago/17)	<i>MOURE et al., (2001)</i>

**Fonte:** Autor, 2022.

MELO et al., (2010) propuseram uma classificação da atividade antioxidante de extratos que parece relevante. Pode-se considerá-la, segundo tais autores, boa ( $CI_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$ ), moderada ( $CI_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$ ) e baixa ( $CI_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$ ); a própolis do presente estudo enquadra-se, pois, como possuindo boa atividade antioxidante em todos os meses.

Os resultados tão promissores de atividade antioxidante devem-se, em grande parte, ao fato de que a PVA é muito rica em compostos fenólicos (ANDRADE et al., 2017), que atuam sinergicamente a fim de estabilizar espécies reativas de oxigênio (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Está extensamente relatada na literatura a correlação dos flavonoides e ácidos fenólicos com a atividade antioxidante em sistemas aquosos e sistemas lipofílicos (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). No entanto não se deve ignorar que há outras classes de compostos contribuindo para esta atividade, como as benzofenonas isopreniladas, por exemplo,



as quais são substâncias menos polares que os flavonoides (TRUSHEVA et al., 2006).

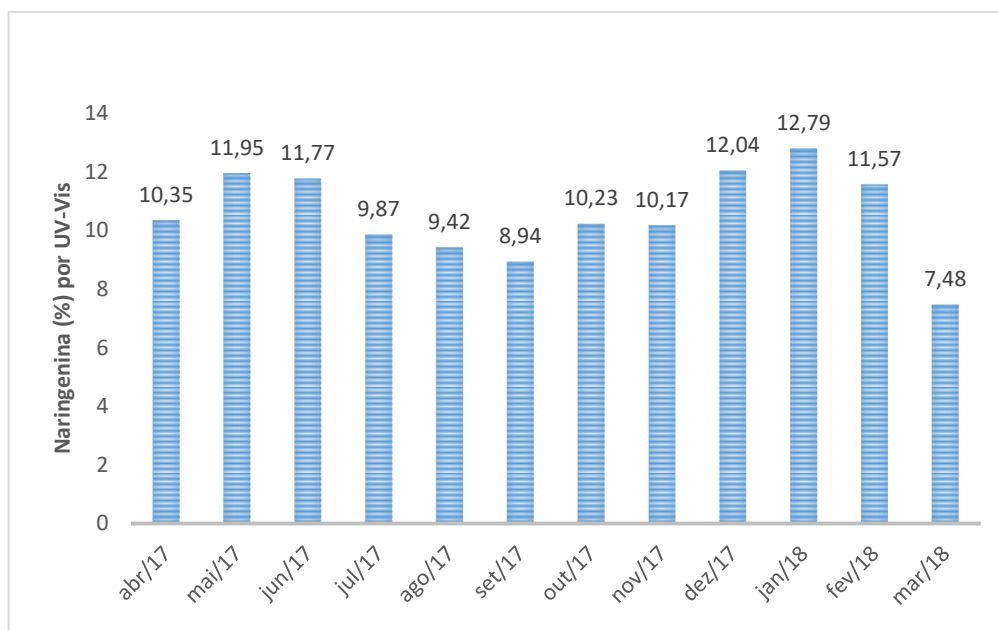
Bioprodutos como a PVA, detentores de boa atividade antioxidante, são efetivos em diminuir o risco de doenças como a doença coronariana, inflamação e doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e câncer, posto que sua etiologia está fortemente correlacionada com o estresse oxidativo, seja por peroxidação de lipídios de membrana celular, inativação da enzima sulfidril, cross-linking de proteínas ou quebra de DNA humano (AHN et al., 2007).

Os dados obtidos no ensaio de quantificação total de flavonoides por UV-Vis estão representados no gráfico da figura 31, em termos percentuais. Em março de 2018 observou-se a menor concentração desses compostos (7,48%), a qual atingiu seu maior valor em janeiro de 2018 (12,79%).

Tomando, para fins de comparação, o mês que apresentou teor mais baixo de flavonoides — março de 2018 (7,48%) —, vê-se que neste parâmetro a PVA de Marechal Deodoro excedeu também, em qualidade, as variedades vermelhas de Sergipe (3,14%, ANDRADE et al., 2017) e Maceió (3,29%, RIGHI et al., 2011), aproximando-se ou mesmo ultrapassando, ao longo dos meses, os valores observados nos estudos com amostras da Bahia (5,70%-9,03%, REIS et al., 2019) e do Rio Grande do Norte (8,35%, SILVA et al., 2019). A concentração total de flavonoides na PVA variou de 7,48% (março de 2018) a 12,79% (janeiro de 2018).

Houve, portanto, similaridade entre os resultados de flavonoides totais e sequestro de DPPH• no mês de janeiro de 2018, não ocorrendo o mesmo nos meses de agosto de 2017 e março de 2018. Tal disparidade indica haver, além dos flavonoides, mais classes de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, ligninas, lignanas, cumarinas, entre outras) exercendo ação antioxidante ao longo dos meses. A tabela 6 compara os teores de flavonoides quantificados na PVA com as própolis das regiões citadas acima.

**Figura 33** – Teor total de flavonoides (%) das amostras de abril de 2017 a março de 2018, em função da concentração de extrato.



**Fonte:** Autor, 2022.

**Tabela 6** – Comparação do teor total de flavonoides com própolis vermelhas de outras regiões.

Própolis Vermelha (Nordeste)		PVA (Marechal Deodoro)	Referências
Maceió (AL)	3,29%	7,48% (mar/18)	RIGHI et al., (2011)
Rio Grande do Norte	8,35%	7,48%-12,79%	SILVA et al., (2019)
Bahia	5,70%-9,03%	7,48%-12,79%	REIS et al., (2019)
Sergipe	3,14%	7,48% (mar/18)	MOURE et al., (2001)

**Fonte:** Autor, 2022.

É já amplamente relatado na literatura o alto teor de flavonoides na constituição química da PVA, bem como o seu grande papel na atividade biológica da PVA, conferindo-lhe efeitos antibacterianos, antifúngicos, anticâncer e

antioxidante, alguns deles sendo, aliás, marcadores químicos indicadores de qualidade (ANDRADE et al., 2017; RUFATTO et al., 2018.). A toxicidade dos flavonoides é considerada rara (HAVSTEEN, 2002), todavia, está presente em mamíferos que os consomem por longos períodos (RIBEIRO et al., 2006) e, quando ingeridos em altas concentrações, podem ocasionar reações alérgicas em 3-5% da população, ainda que sejam fracamente antigênicos (MEOTTI, 2006).

Com relação à sensibilidade bacteriana à PVA, os valores de CIM detectados constam da tabela 7, os quais variaram de 1024 µg/mL (março de 2018) a 128 µg/mL (maio, junho e dezembro de 2017) para a bactéria *S. aureus*, e de 1250 µg/mL (setembro de 2017—março de 2018) a 625 µg/mL (abril de 2017—agosto de 2017).

**Tabela 7** – CIM da PVA entre abril de 2017 e março de 2018, frente às cepas *S. aureus* e *E. coli*.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de PVA												
	abr/ 17	mai/ 17	jun/17	Jul/17	ago/ 17	set/17	out/17	nov/17	dez/17	jan/18	fev/18	mar/18
<b>S.</b>	256	128	128	256	512	512	512	512	128	256	512	1024
<b><i>aureus</i></b>												
<b>(µg/mL)</b>												
<b>E. coli</b>	625	625	625	625	625	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
<b>(µg/mL)</b>												

**Fonte:** Autor, 2022.

RUFATTO et al., (2018) desenvolveram um ensaio de sensibilidade da cepa *S. aureus* CIP 4.83 (Collection of Institute Pasteur) à própolis vermelha coletada de região relativamente distante do município de Marechal Deodoro. Seu extrato bruto demonstrou CIM de 125 µg/mL, ao passo que, em nosso estudo, a PVA conseguiu aproximar-se desse valor apenas nos meses de maio e junho de 2017, sendo superada nas demais amostras.

No estudo elaborado por NETO et al., (2018), a própolis vermelha do estado de Pernambuco, coletada no período de seca, exibiu CIM de 161,3 µg/mL e 512 µg/mL frente às cepas *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538,

respectivamente. Contra a *E. coli*, os resultados obtidos por esses autores foram significativamente melhores que os da PVA; por outro lado, quanto à *S. aureus*, foram superiores as CIM's na PVA dos meses de abril a julho de 2017, igualando-se no período de agosto a novembro de 2017, havendo um aumento na atividade da PVA de dezembro de 2017 a janeiro de 2018 e uma tendência à perda de atividade nos meses de fevereiro e março de 2018. Vale ressaltar que, nesse mesmo estudo, a própolis coletada no período de chuvas teve melhor atividade que todas as amostras de PVA frente à *E. coli* (512 µg/mL), sendo-lhe inferior frente à *S. aureus* (>1024 µg/mL), também em todos os meses.

LOPEZ et al., (2015), por seu turno, realizaram testes de susceptibilidade das cepas *E. coli* (ATCC 10538), *E. coli* (ATCC 8739) e *S. aureus* (ATCC 25923) à própolis vermelha de Cuba e dos estados brasileiros de Sergipe e Paraíba. A própolis cubana demonstrou altíssima atividade contra todas as cepas — com CIM de 100 µg/mL para a *E. coli* (ATCC 10538), >200 µg/mL para a *E. coli* (ATCC 8739) e 50 µg/mL para a *S. aureus* (ATCC 25923). As duas amostras da Paraíba tiveram igual eficiência, com as mesmas CIM's frente à mesmas cepas. De Sergipe os autores testaram três amostras de própolis vermelha, resultando em CIM's entre 12,5 µg/mL e 200 µg/mL para a *E. coli* (ATCC 10538), >200 µg/mL para a *E. coli* (ATCC 8739) e entre 50 µg/mL e 100 µg/mL para a *S. aureus* (ATCC 25923). Todas as variedades analisadas evidenciaram melhor desempenho antibacteriano que a PVA de nosso estudo. Destaca-se aqui, outra vez, que os diferentes métodos de extração das própolis, além da sua composição, podem ter tido influência sobre os resultados. A tabela 8 resume as comparações de atividade antimicrobiana supracitadas.

**Tabela 8** – Comparação da atividade antimicrobiana com própolis vermelhas de outras regiões.

Própolis Vermelha (local de origem)		PVA (Marechal Deodoro)	Referências
<b>Alagoas (<i>S. aureus</i>)</b>	125 µg/mL (CIP 4.83)	128 µg/mL em mai/17 e jun/17 (ATCC 25923)	<i>RUFATTO et al., (2018)</i>

<b>Pernambuco (<i>S. aureus</i>)</b>	512 µg/mL (ATCC 6538)	128 µg/mL em mai/17 e jun/17 (ATCC 25923)	<i>NETO et al., (2018)</i>
<b>Pernambuco (<i>E. coli</i>)</b>	161,3 µg/mL (ATCC 25922)	625 µg/mL, de abr/17 a ago/17 (ATCC 25922)	<i>NETO et al., (2018)</i>
<b>Sergipe (<i>S. aureus</i>)</b>	50-100 µg/mL (ATCC 25923)	128 µg/mL em mai/17 e jun/17 (ATCC 25923)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>
<b>Sergipe (<i>E. coli</i>)</b>	12,5-200 µg/mL (ATCC 10538)   >200 µg/mL (ATCC 8739)	625 µg/mL, de abr/17 a ago/17 (ATCC 25922)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>
<b>Paraíba (<i>S. aureus</i>)</b>	50 µg/mL (ATCC 25923)	128 µg/mL em mai/17 e jun/17 (ATCC 25923)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>
<b>Paraíba (<i>E. coli</i>)</b>	100 µg/mL (ATCC 10538)   >200 µg/mL (ATCC 8739)	625 µg/mL, de abr/17 a ago/17 (ATCC 25922)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>
<b>Cuba (<i>S. aureus</i>)</b>	50 µg/mL (ATCC 25923)	128 µg/mL em mai/17 e jun/17 (ATCC 25923)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>
<b>Cuba (<i>E. coli</i>)</b>	100 µg/mL (ATCC 10538)   >200 µg/mL (ATCC 8739)	625 µg/mL, de abr/17 a ago/17 (ATCC 25922)	<i>LOPEZ et al., (2015)</i>

**Fonte:** Autor, 2022.

No presente estudo, a bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) foi mais susceptível à PVA do que a *E. coli* (ATCC 8739). A literatura tem atribuído as propriedades antibacterianas da própolis vermelha aos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e ácidos fenólicos e seus ésteres (KUJUMGIEV, 1999), dando-se destaque à flavonona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster fenético do ácido cafeico (UZEL et al., 2005). Além disto se tem reconhecido a participação de isoflavonoides (TRUSHEVA et al., 2006) e chalconas nesse efeito terapêutico, os

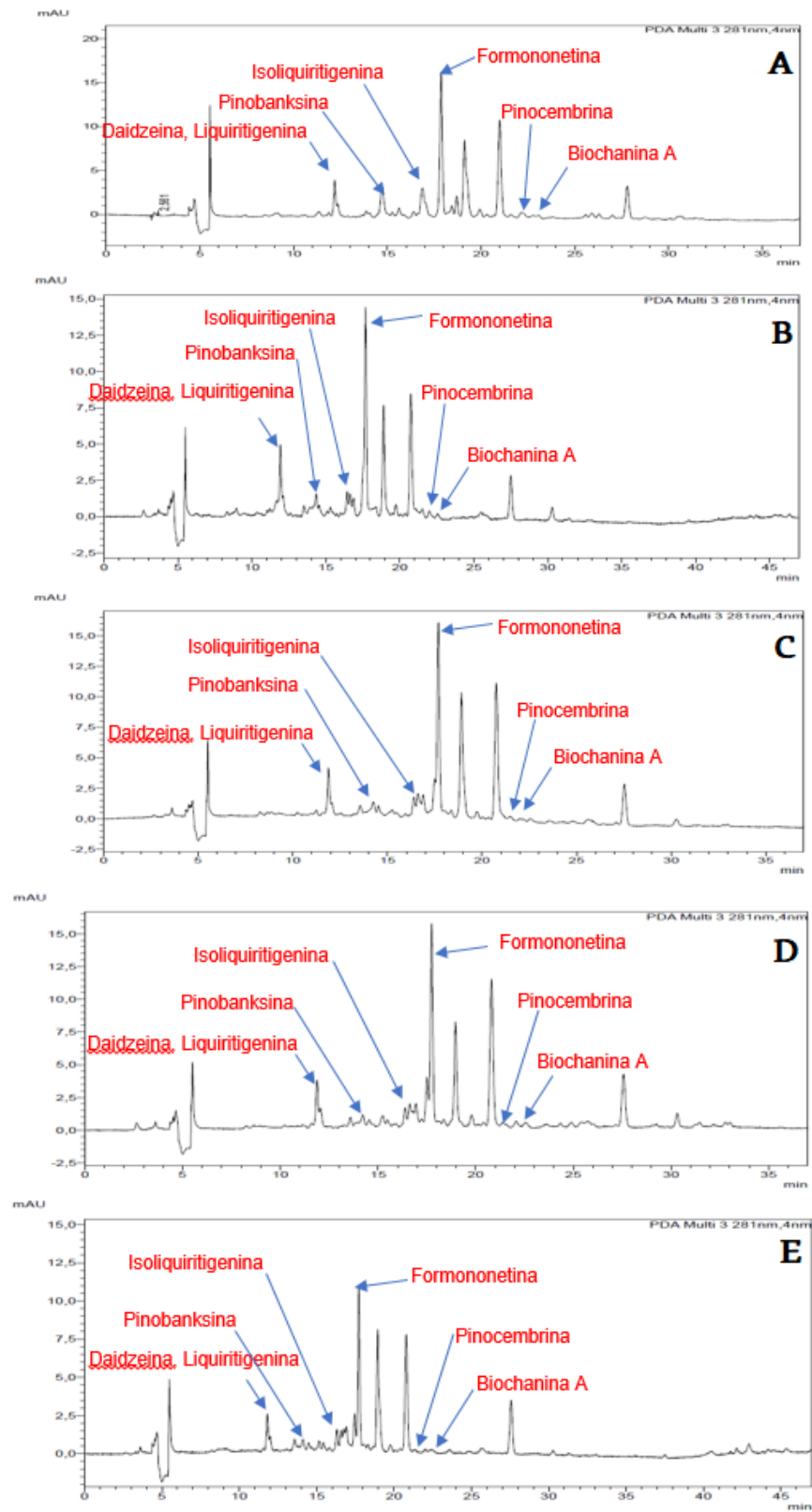
quais estão presentes na composição da própolis (NOWAKOWSKA; KĘDZIA; SCHROEDER, 2008). BUENO-SILVA et al., (2017), em seu estudo do perfil químico e antimicrobiano da própolis vermelha, chega a afirmar que tal atividade parece ser suscitada por um sinergismo de diferentes compostos, ativando muitas vezes mecanismos de ação complementares.

A própolis é notável por sua atividade antibacteriana; alguns mecanismos de ação associados a este efeito consistem na bacteriólise parcial, inibição da síntese proteica (RNA polimerase) e desorganização do citoplasma, da membrana citoplasmática e da parede celular bacteriana, causando a inibição da divisão celular e, conseqüentemente, do crescimento bacteriano (KIKUNI; SCHILCHER, 1994).

Em seu regulamento para produção do extrato de própolis vermelha dos manguezais de Alagoas, o INPI estabelece as medicarpina (pterocarpano), vestitol (isoflavana), isoliquiritigenina (chalcona), formononetina e daidzeína (isoflavonas) como os marcadores químicos da PVA, cuja análise cromatográfica constitui um dos vários requisitos para o controle de qualidade deste produto (BRASIL, 2012). Tendo em vista que a maioria pertence à classe dos flavonoides, optou-se por analisar o cromatograma, na CLAE-DAD, em comprimento de onda de 281 nm, semelhantemente ao que se fez no ensaio de flavonoides totais.

O *fingerprint* constante na figura 32 (A-E) refere-se às amostras dos meses de abril de 2017, agosto de 2017, setembro de 2017, janeiro de 2018 e março de 2018, e possibilitam algumas considerações. Puderam-se identificar todos os marcadores químicos da PVA testados — formononetina, daidzeína e biochanina A (isoflavonoides), liquiritigenina, pinocembrina e pinobanksina (flavanonas), e isoliquiritigenina (chalcona) —, os quais demonstraram tempos de retenção e intensidades de pico muito similares entre os cromatogramas, exceto pelo mês de março de 2018, em que os picos apresentaram-se mais baixos, corroborando o resultado do ensaio de flavonoides totais para o mesmo mês.

**Figura 34 (A-E)** – Perfil cromatográfico dos extratos de abril de 2017 (A), agosto de 2017 (B), setembro de 2017 (C), janeiro de 2018 (D) e março de 2018 (E), obtido mediante CLAE-DAD.

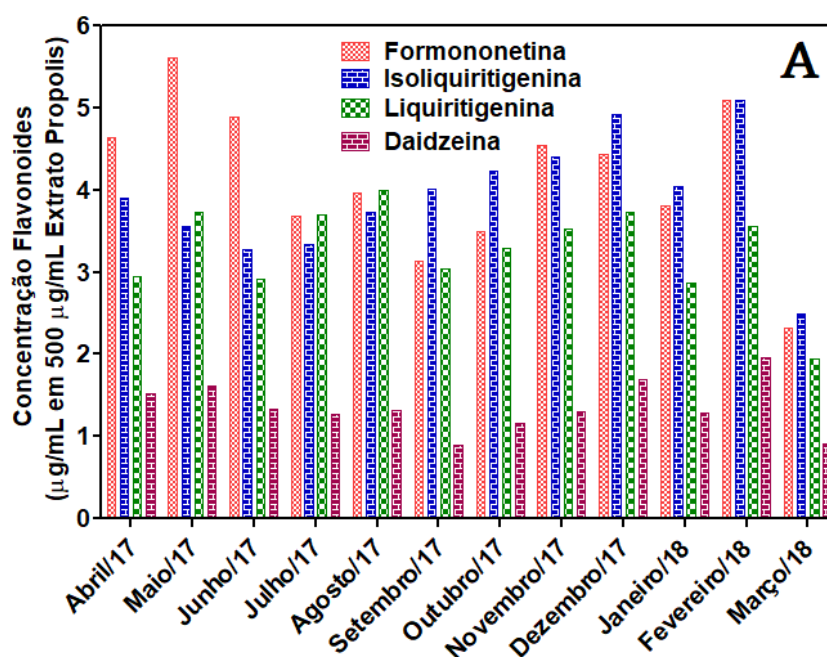


Fonte: Autor, 2022.

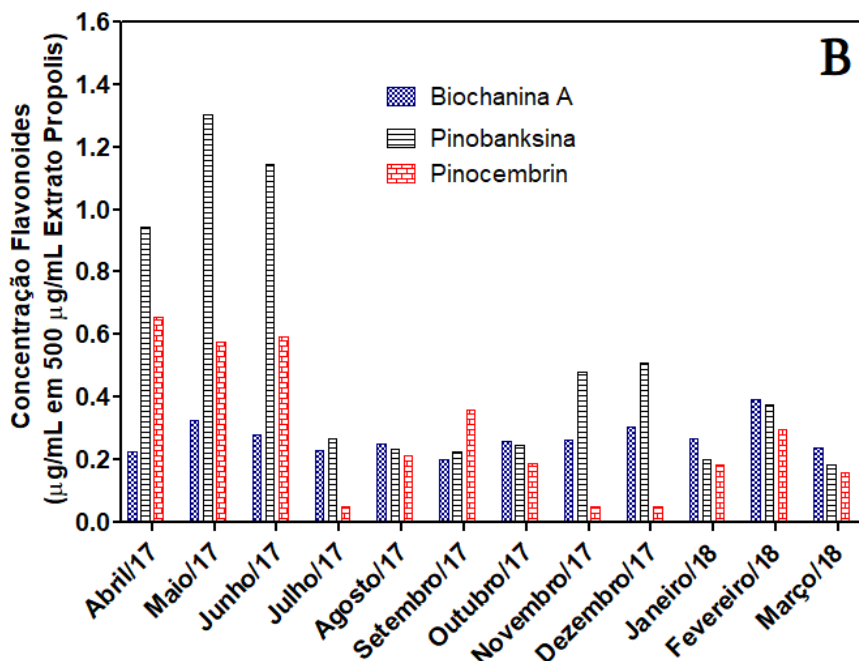
Os picos de daidzeina e liquiritigenina exibiram algum grau de coeluição em todas as análises, não impedindo, contudo, que se os distinguíssem. Ademais, foi a formononetina a substância que teve pico mais intenso, estando também entre os de boa resolução. A mera observação da intensidade dos picos já indica haver, em todos os meses, maior concentração de formononetina, daidzeina, liquiritigenina e isoliquiritigenina, em relação à biochanina A, pinocembrina e pinobanksina, cujos picos foram demasiado discretos.

Tomando-se em conjunto os resultados dos ensaios supracitados, somando-se-lhes o que resultou da investigação quantitativa de marcadores por CLAE-DAD (Figura 33 A-B) e alguns dados meteorológicos, pode realizar-se uma importante análise comparativa, mesmo porque são os flavonoides a classe mais influente sobre as atividade da PVA, conforme já se mencionou.

**Figura 35 (A-B)** – Quantificação de flavonoides majoritários de abril de 2017 a março de 2018, na PVA.







**Fonte:** Autor, 2022.

Na quantificação dos marcadores, confirma-se a observação de que a biochanina A, pinocembrina e pinobanksina estavam presentes em menor quantidade que os demais compostos, pois ficaram abaixo de 0,8 µg/mL, exceto a pinobanksina nos meses de abril a junho de 2017 (Figura B). Na verdade, esses foram os três meses em que, de maneira mais clara, os resultados de todos os ensaios confluíram para os melhores efeitos terapêuticos da PVA, verificando-se nela altos níveis de flavonoides (Figura 31),  $CI_{50}$  do sequestro de radicais DPPH• (Figura 30) e atividade antimicrobiana (Tabela 5), contra ambas as cepas testadas, bem como as maiores concentrações de formononetina (em média >4 µg/mL), daidzeína (≈1,5 µg/mL) e — entre os marcadores minoritários — de biochanina A (0,3 µg/mL), pinobanksina (1,3 µg/mL) e pinocembrina (≈0,6 µg/mL).

O segundo ciclo de bons resultados compreendeu os meses de outubro de 2017 a fevereiro de 2018; contudo, neste ciclo os resultados apresentaram maior oscilação entre os ensaios, tornando mais difícil a sua compreensão e correlação. É fácil identificar, por exemplo, que a atividade antioxidante seguiu rigorosamente o teor total de flavonoides e os marcadores químicos — todos se elevaram. Em contrapartida, no ensaio antimicrobiano a cepa *E. coli* (ATCC 25922) mostrou-se mais resistente à PVA, sendo a sensibilidade da *S. aureus* (ATCC 25923) variável e

inconclusiva; todavia, ambas demonstraram as menores CIM's nos meses de abril a junho de 2017, em conformidade com os demais ensaios, além de a *S. aureus* parecer ter sido mais influenciada pela concentração de flavonoides do que a *E. coli* (comparar, entre os ensaios, os meses de agosto e setembro de 2017, nos quais houve menor teor de flavonoides, bem como os meses de dezembro de 2017 e janeiro de 2018, em que tais compostos estiveram mais concentrados). A explicação para tal seletividade pode estar no fato de que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à própolis, de um modo geral, em comparação às Gram-negativas (PINTO et al., 2001). Era previsível a dificuldade em se definirem os ciclos de maior e menor efeito antibacteriano, pois que o CIM real encontra-se entre o CIM obtido no teste e a concentração imediatamente abaixo a esta, na qual ainda houve crescimento (CLSI, 2011).

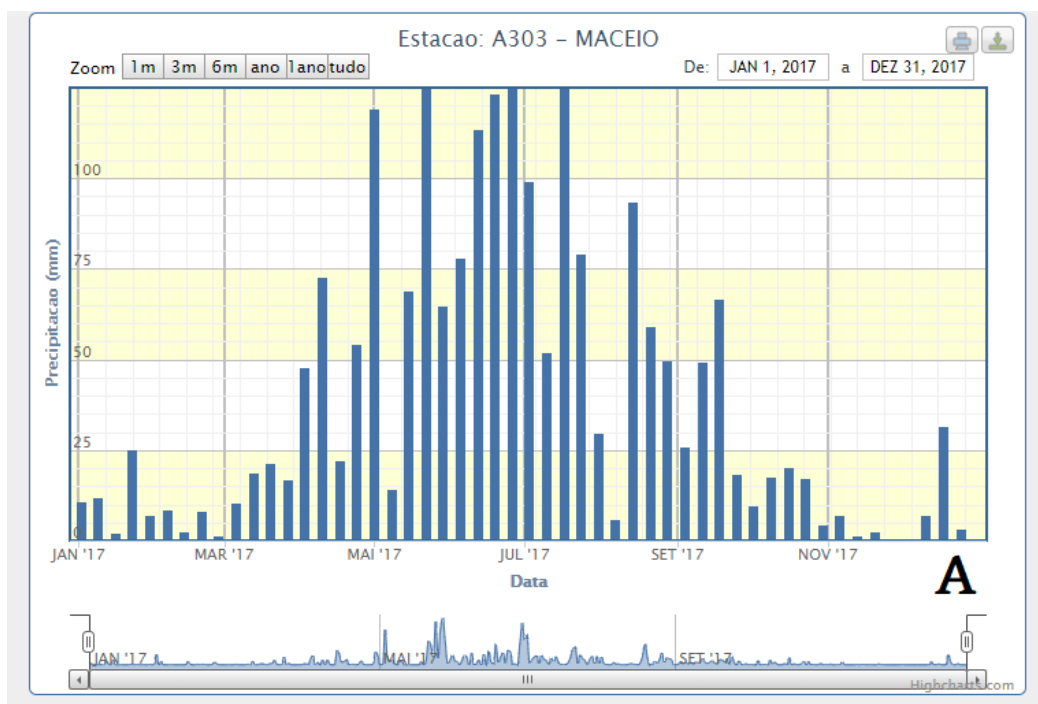
O grupo de compostos a que se tem atribuído a maior parcela da atividade antibacteriana da PVA, segundo revisões de literatura, são os flavonoides e o ácido cafeico nela encontrados (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002), não havendo, contudo, efeito sinérgico entre esses compostos e aqueles responsáveis pela atividade antioxidante (CABRAL et al., 2009).

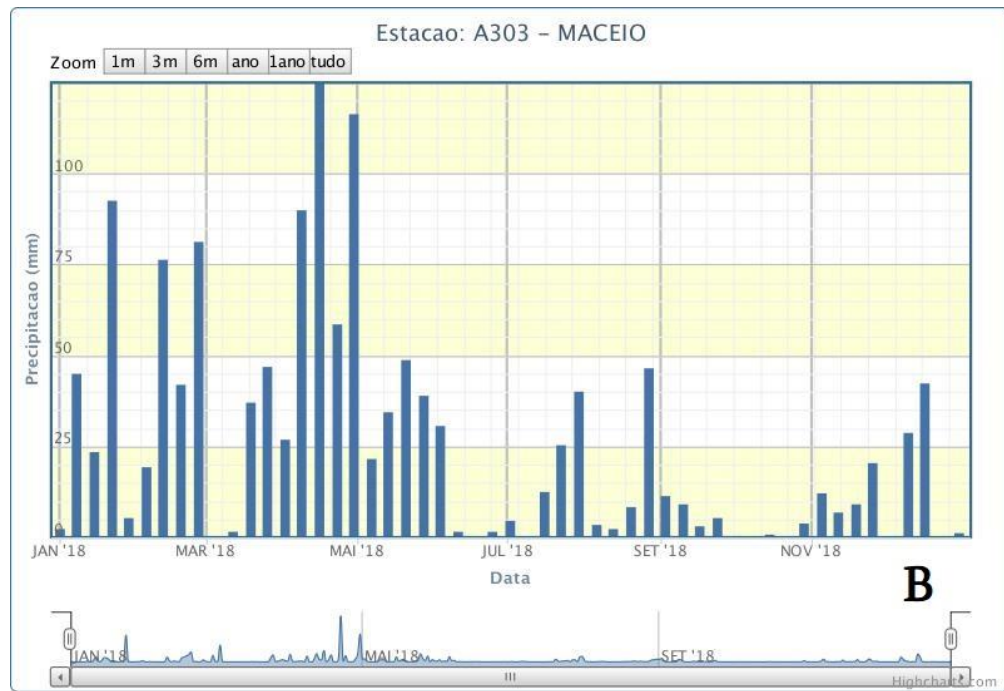
Os demais meses foram os que tiveram desempenhos mais baixos, formando um ciclo entre julho e setembro de 2017 e ficando isolado o mês de março de 2018, este com resultados notavelmente mais inferiores em todos os ensaios. Fugiu à regra a liquiritigenina, que se manteve alta mesmo nesse período. Isto condiz com as pesquisas de variabilidade sazonal da própolis que relatam um aumento na concentração de vestitol, neovestitol e isoliquiritigenina — compostos de atividade antibacteriana importante — em meses de chuva (BUENO-SILVA et al., 2017; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

De acordo com o gráfico da pluviometria (Figura 35 A-B), os meses em que a PVA apresentou melhores resultados corresponderam a um período mais seco na região das colmeias, isto é, com pouca precipitação. Isto se confirma quando se vê que os meses em que as amostras tiveram desempenho inferior foram precisamente os de maior precipitação de chuvas, coincidindo com a estação do inverno. São padrões de influência sazonal concordantes com SILVA et al., (2008), segundo os quais períodos de alta pluviosidade diminuem o teor de cera na própolis, mas elevam o teor de resinas, e com VALENCIA et al., (2012), que relataram haver

diminuição nas concentrações totais de compostos fenólicos e flavonoides no inverno. Os baixíssimos resultados do mês de março de 2018 não parecem condizer com a quantidade de chuvas que houve naquele mês, sendo razoável supor que outros fatores ambientais estavam a alterar o perfil químico da PVA nesse período. NETO et al., (2017), em TS's com a própolis vermelha de Pernambuco, obtiveram menores CIM's com as amostras coletadas em períodos de seca. Por fim, a investigação da PVA realizada por NASCIMENTO et al., (2019) sugere que os períodos de baixa umidade produzem diversas condições de estresse sobre a planta, a qual, por mecanismo de defesa, aumenta a produção de metabólitos secundários derivados da via do acetato-malonato e ácido chiquímico, tais como os flavonoides e as benzofenonas isopreniladas, que podem ter sido os grandes responsáveis pelos resultados aqui verificados.

**Figura 36 (A-B)** – Precipitação de chuvas em Maceió, entre janeiro de 2017 (A) e dezembro de 2018 (B).





Fonte: Autor, 2022.

## 6. CONCLUSÃO

Todas as metodologias foram efetivas em revelar quais os ciclos de variação sazonal dos parâmetros de qualidade da PVA entre o mês de abril de 2017 e março de 2018, apresentando boa sensibilidade.

A despeito de o resultado da microdiluição em caldo para a cepa *E. coli* ter-se demonstrado destoante dos demais ensaios, puderam-se identificar dois ciclos de altos níveis de flavonoides, marcadores químicos, % de sequestro de radicais DPPH• e atividade antibacteriana, e um ciclo de menor qualidade da própolis, havendo uma possível correlação desses parâmetros com as chuvas na região das colmeias, o que está em pleno acordo com os relatos da literatura sobre a influência sazonal em plantas e, por consequência, na própolis.

O ensaio de sequestro de radicais DPPH• apresentou resultados que podem ser classificados como altos, os quais estiveram muito acima da %CEE de variedades de própolis vermelha da região Nordeste do país.

No que se refere aos teores totais de flavonoides, a PVA exibiu altas concentrações e, quando comparadas às própolis vermelhas dos estados da Bahia, de Sergipe, do Rio Grande do Norte e do município de Maceió, teve desempenho variável de acordo com o mês analisado, ora mais baixo, ora superior, ora equiparando-se a elas.

O teste de microdiluição em caldo corroborou outros estudos já desenvolvidos com própolis, sendo a cepa Gram-positiva (*S. aureus*) mais sensível à PVA que a Gram-negativa (*E. coli*). Neste ensaio, embora a PVA tenha-se mostrado inferior à maioria das variedades vermelhas de outras regiões, suas CIM's revelaram-se boas em todos os meses investigados.

Os marcadores químicos puderam ser adequadamente identificados e quantificados mediante CLAE-DAD, havendo maiores concentrações de formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina e daidzeína em relação aos compostos biochanina A, pinocembrina e pinobanksina, estes possuindo teores mais baixos independentemente do mês de análise.

A comparação dos resultados de todos os ensaios com os índices pluviométricos fornecidos pelo portal do Instituto de Meteorologia indica que o perfil químico e a atividade biológica da PVA tendem a perder qualidade nos períodos de maior precipitação de chuvas, enquanto que os dois ciclos de melhores resultados

— (1) de abril a junho de 2017 e (2) entre outubro de 2017 e fevereiro de 2018 — estão associados aos períodos mais secos do ano, em concordância com pesquisas de outros autores.

Adicionalmente, tais resultados contribuem para a elucidação de requisitos de qualidade como o perfil químico e biológico da PVA, tal como o seu potencial relativamente a outras variedades brasileiras. Este estudo, portanto, tem diversas implicações legais, mercadológicas e terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AHN, M. R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ALBUQUERQUE, I. L. **Estudo dos constituintes químicos de duas amostras de própolis: Alto Santo - Ceará e Passa Quatro - Minas Gerais**. 2007. 194 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.
- ALVARENGA, F. C. R. et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, p. 442-448, 2009.
- ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, L. D. S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

ANHESINE, N. B. **Perfil cromatográfico (*fingerprinting*) por LC-DAD-MS de espécies do gênero *Erythrina*: desenvolvimento e validação de método para controle de qualidade de drogas vegetais**. 2018. 177 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. 2011. Vol. 1. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o++Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. S1, p. 5-16, 2001.

ARRUDA, R. E S. **Efeito da sazonalidade na composição química e atividades antimicrobiana, antioxidante e tripanossomicida de extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas**. 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

ASSIMOS, A. A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

AVILA, H. J. C. **Desenvolvimento e caracterização de dispositivos orgânicos eletroluminescentes (OLEDs) baseados em novos complexos tetrakis 8-**



**hidroxiquinolina de terras raras**. 2012. Dissertação (Mestrado em Física) - PUC, Rio de Janeiro, 2012.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography A**, v. 242, n. 1, p. 135-143, 1982.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

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

BARBOZA, F. M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, v. 33, p. 747-749, 2010.

BASTOS, E. M. A. F. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.

BAURES, E. et al. Fast characterization of non domestic load in urban wastewater networks by UV spectrophotometry. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, n. 9, p. 959-965, 2007.

BELITZ, H.-D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. Vegetables and vegetable products. **Food Chemistry**, p. 772-805, 2004.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BHATTARAM, V. A. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine**, v. 9, p. 1-33, 2002.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. L. W. T. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and from South America. **Zeitschrift für Naturforschung c**, v. 49, n. 11-12, p. 712-718, 1994.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

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. Diário Oficial da União de 23/01/2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014(A). Disposições sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União de 21/08/2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014(B). Determina a publicação do Guia de Orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Diário Oficial da União de 02/06/2014.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, Exterior. Registro de denominação de origem Manguezaís de Alagoas. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, 2012.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica**. 4. ed. Pearson Universidades, 2006.

BISPO J. W. et al. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. **Semina**, v. 33, p. 3-10, 2012.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncology reports**, v. 10, n. 6, p. 1663-1682, 2003.

BUKMAN, L. **Análise por injeção em fluxo para determinação da capacidade antioxidante total de vinhos utilizando o método DPPH: otimização das condições a partir metodologia de superfície de resposta**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

BULBOVAS, P. et al. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil). **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 4, p. 687-696, 2005.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

BUTERA, D. et al. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6895-6901, 2002.

BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144954, 2015.

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

CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de *Fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais**. 2010. 145 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CAMPANA, E. H. et al. Avaliação das metodologias MICE®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 47, p. 157-164, 2011.

CARVALHO, R. S.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 206439, 2015.

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

CHANDRASEKAR, D. et al. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations.

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 460-464, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia Líquido de alto desempenho: HPLC**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

CLEFF, M. B. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. 3. ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2009.

CLSI. **Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**. 3. ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2011.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. 10. ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. **Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved guideline M23**. 4. ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CORRADO, M. L.; LANDESMAN, S. H.; CHERUBIN, C. E. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin, and N-formimidoyl

thienamycin (MK0787) against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 893-896, 1980.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNHA, L. C. et al. A propolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 105-124, 2011.

DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 557-566, 2012.

DAS, K.; GEZICI, S. Secondary plant metabolites, their separation and identification, and role in human disease prevention. **Ann. Phytomedicine**, v. 7, p. 13-24, 2018.

DAUGSCH, A. et al. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v. 89, p. 2-15, 2006.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, n. 1, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DEGU, A. et al. Metabolite profiling elucidates communalities and differences in the polyphenol biosynthetic pathways of red and white Muscat genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 24-33, 2015.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of propolis: IV. prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.

DONNELLY, D. M. X.; KEENAN, P. J.; PRENDERGAST, J. P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochemistry*, v. 12, n. 5, p. 1157-1161, 1973.

DONNO, D. et al. Phytochemical fingerprint and chemometrics for natural food preparation pattern recognition: An innovative technique in food supplement quality control. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 2, p. 1071-1083, 2016.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, 2007.

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

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 6, p. 1015-1019, 2016.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.

FERREIRA, F. B. A. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FURLONG, E. B. et al. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, p. 105-114, 2003.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, v. 32, p. 488-492, 2009.

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

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOODARZI, M.; RUSSELL, P. J.; VANDER-HEYDEN, Y. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 16-28, 2013.

GRAIKOU, K. et al. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 261-267, 2016.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography–mass



spectrometry. **Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences**, v. 232, n. 1268, p. 249-272, 1987.

GROHMANN, K.; MANTHEY, J. A.; CAMERON, R. G. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 2, p. 141-146, 2000.

GOULART, T. M. **Comparação entre Etest® e microdiluição em caldo para avaliação da susceptibilidade à polimixina B em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC**. 2017. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

HAKIMZADEH, N.; PARASTAR, H.; FATTAHI, M. Combination of multivariate curve resolution and multivariate classification techniques for comprehensive high-performance liquid chromatography-diode array absorbance detection fingerprints analysis of *Salvia reuterana* extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1326, p. 63-72, 2014.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**, 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

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

HENDRIKS, M. M. et al. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.

HIGSON, S.P.J. **Uma introdução ao uso da luz visível e da radiação ultravioleta em medidas analíticas**. 6. ed. São Paulo: LTC, 2009.

HRAZDINA, G.; BORZELL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3, 5-digucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HOSTETTMANN, K. et al. On-line high-performance liquid chromatography: ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 283, p. 137-147, 1984.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. 1. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IMEH, U.; KHOKHAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6301-6306, 2002.

INOUE, H. T. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Arch Latinoam. Prod. Anim. ISSN**, p. 1022-1301, 2007.

JAWETZ, E.; LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

JIMÉNEZ-CARVELO, A. M. et al. One input-class and two input-class classifications for differentiating olive oil from other edible vegetable oils by use of the normal-phase liquid chromatography fingerprint of the methyl-transesterified fraction. **Food chemistry**, v. 221, p. 1784-1791, 2017.

JUNIOR, O. D. et al. Investigation of the Anti-inflammatory and Analgesic Activities of a Sample of Brazilian Propolis. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 285-291, 2004.

KASOTE, D. M. et al. Herbal remedies for urinary stones used in India and China: A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 203, p. 55-68, 2017.

KHURSHID, Z. et al. Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 11, n. 4, p. 265, 2017.

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

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; ALENCAR, S. M. Própolis e segurança alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2011.

LANÇAS, F. M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAZARY, V. M. D. Efeitos do consumo da isoflavona na prevenção do câncer de mama. 2010.

LEITE, R. F. **Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite bovina**. 2016. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

LEMOS, T. L. G. et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, 2018.

LI, J. et al. A turbidity compensation method for COD measurements by UV-vis spectroscopy. **Optik**, v. 186, p. 129-136, 2019.

LIMA, E. S. **Síntese, caracterização química e atividades biológicas de um novo derivado da naringenina**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

LOPES, G. L. L. **Seaweeds from the Portuguese coast: chemistry, antimicrobial and antiinflammatory capacity**. 2014. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Porto, Porto, 2014.

LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2010.

LOPEZ, B .G. C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677-687, 2015.

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

MADSEN, H. L. et al. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. **Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 331-337, 1996.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

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

MARCUCCI, M. C. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics Phytochem.**, v. 2, p. 115-123, 1999.

MARIANO, R. S. **Determinação de cafeína em bebidas estimulantes por cromatografia líquida e espectrofotometria UV-Vis.** 2018. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

MARTÍNEZ-PÉREZ, R. B. et al. Characterization of cannonball jellyfish (*Stomolophus* sp. 2) blue protein: a pH-stable pigment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 23, p. 28597-28606, 2020.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing?. **Burns & trauma**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 2, p. 469-481, 2011.

MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R.; ANDRADE, C. H. S. Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 3, p. 825-826, 1975.

MATTIVI, F. et al. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7692-7702, 2006.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus: estudo comparativo de métodos de extração.** 2005. 67 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

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

MENDES, L. P. M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, 2011.

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

MENNEN, L. I. et al. Risks and safety of polyphenol consumption. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 326S-329S, 2005.

MEOTTI, F. C. **Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudo in vivo e in vitro**. 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5. ed. Chichester: Wiley, 1993.

MIGUES, V. H. **Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise multivariada no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos**. 2018. 447 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

MIYAKE, T. Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

MILARDOVIĆ, S.; IVEKOVIĆ, D.; GRABARIĆ, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 2, p. 175-180, 2006.

MIYAZAKI, H. et al. Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of  $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. **Current microbiology**, v. 58, n. 1, p. 18-24, 2009.

MOK, D. K. W.; CHAU, F. T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, n. 1-2, p. 210-217, 2006.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 411-424, 2004.

MOREIRA, T. F. Chemical composition of propolis: vitamins and aminoacids. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 12-19, 1986.

MOREIRA, T. M. S; SALGADO, H.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 20, p. 435-440, 2010.

MORONEY, M. A. et al. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 11, p. 787-792, 1988.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.

NEILL, S. O. et al. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 4, p. 539-547, 2002.

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

NETO, M. S. R. et al. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 119, p. 215-221, 2018

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 818-823, 2011.

NOWAKOWSKA, Z.; KĘDZIA, B.; SCHROEDER, G. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 4, p. 707-713, 2008.



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

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Process analytical chemistry: applications of ultraviolet/visible spectrometry in environmental analysis: an overview. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 245-265, 2009.

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

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

ORSI, R. O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, p. 205-219, 2000.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 161-166, 2011.

PAIVA, R. M. **Concentração inibitória mínima de vancomicina para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa resistente à metilicina: comparação entre os métodos de microdiluição em caldo e etest e correlação com falha terapêutica em pacientes com bacteremia.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PALANISAMY, U. D. et al. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 21-27, 2011.

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

PASSOS, E. A. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO UV-VIS. [s. d.]. Disponível em: <[https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/18025316022012Metodos\\_Instrumentais\\_de\\_Analise\\_-\\_Aula\\_02.pdf](https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/18025316022012Metodos_Instrumentais_de_Analise_-_Aula_02.pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2022.

PELZER, L. E. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, n. 6, p. 421-424, 1998.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 4. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food research international**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PFALLER, M. A.; YU, W. Antifungal susceptibility testing: new technology and clinical applications. **Infectious Disease Clinics**, v. 15, n. 4, p. 1227-1261, 2001.

PINHEIRO, M. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, 2009.

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

PRZYBYŁEK, I; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83-88, 1997.

REIS, J. H. O. et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, 2019.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

RELLER, L. B. et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina+naringenina. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 38. n. 1. p. 23-27, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RITA, L. P. S. et al. Indicação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas: antecedentes e apropriabilidade em um sistema setorial de inovação. **Congreso ALTEC**. 2013.

ROCHA, A. B. B. et al. Produção e caracterização de adesivo dentinário com quercetina e própolis vermelha de alagoas. In: 70ª Reunião Anual da SBPC. Maceió, AL, jul. 2018.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, L. R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, n. 5, 2006.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 181 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade do Rio Grande do Sul, Recife, 2002.

RODRIGUEZ, M. V. et al. **Macro to nano spectroscopy**. 1. ed. Rijeka: IntechOpen, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

ROJCZYK, E. et al. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies.

**Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 113159, 2020.

ROUSSIS, I. G. et al. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 614-621, 2008.

RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological research**, v. 214, p. 74-82, 2018.

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

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, p. 727-734, 2010.

SASSAKI, K. T. **Espectrofotometria de absorção**: princípios gerais. São Paulo: FOAUNESP, 2009.

SAVOI, S. et al. Transcriptome and metabolite profiling reveals that prolonged drought modulates the phenylpropanoid and terpenoid pathway in white grapes (*Vitis vinifera* L.). **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2016.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. **Actividad antioxidante. Alimentaria**, n. 329, p. 29-40, 2002.

SANTOS, D. S. Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para determinação de espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, p. 604-610, 2007.

SEBRAE. Própolis: alternativa para diversificar a produção apícola. 2013. Disponível em: <<https://www.sebrae-sc.com.br/observatorio/relatorio-de-inteligencia/propolis-alternativa-para-diversificar-a-producao-apicola>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SHAW, P. C.; BUT, P. P. H. Authentication of Panax species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. **Planta Medica**, v. 61, n. 05, p. 466-469, 1995.

SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 55-59, 2008.

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

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, I. G. S. **Influência dos Métodos de Sensibilidade aos Antimicrobianos no Uso Clínico das Polimixinas**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

SILVA, J. B. et al. Hepatoprotective and antineoplastic potencial of red propolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 744-756, 2019.

SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. California: Cengage learning, 2013.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Non-ionic samples: reversed-and normal-phase HPLC. **Practical HPLC method development**, p. 264-267, 1997.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 59-64, 2008.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V. C. **Microdiluição em caldo para teste de susceptibilidade de *Malassezia furfur*, *Malassezia obtusa* e *Malassezia sympodialis***. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

SPUDEIT, D. A. Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel utilizando espectrofotometria UV/Vis. 2009. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/99781>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 744-757, 2011.

SUMATHI, R.; TAMIZHARASI, S.; SIVAKUMAR, T. Bio-dynamic activity of naringenin—a review. **Int. J. Curr. Adv. Res**, v. 4, n. 8, p. 234-236, 2015.

KIKUNI, N. B. T.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta medica**, v. 60, n. 03, p. 222-227, 1994.

THOMAS, O.; BURGESS, C. **UV-visible spectrophotometry of water and wastewater**. Elsevier, 2017.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. **Analytica chimica acta**, v. 690, n. 2, p. 148-161, 2011.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

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, p. 697390, 2013.

TORRES, A. M.; MAU-LASTOVICKA, T.; REZAAIYAN, R. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 35, n. 6, p. 921-925, 1987.



TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

TURNIDGE, J. D. Susceptibility test methods: general considerations. **Manual of clinical microbiology**, p. 1246-1252, 2015.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; KOLAK, U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 233-302, 2005.

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

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

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal-raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C. **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. Santa Maria: UFSM, 2005.

VITURRO, C.; MOLINA, A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 422-424, 1999.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of food science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008.

WANG, S. et al. Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial species?. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. 1127-1138, 2017.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.

WU, J. et al. Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101492, 2014.

XU, Cheng-Jian et al. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 253-259, 2006.

ZAIAS, H. **Desenvolvimento de um novo gel e otimização de leitor para dosimetria química**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

YONGYU, Z. et al. **Quality Control of Herbal Medicines and Related Area**. 1. ed. Rijeka: IntechOpen, 2011.

ZHA, X. Q. et al. Enzymatic fingerprints of polysaccharides of *Dendrobium officinale* and their application in identification of *Dendrobium species*. **Journal of natural medicines**, v. 66, n. 3, p. 525-534, 2012.

ZHANG, Wei; CUE, Berkeley W. **Green techniques for organic synthesis and medicinal chemistry**. 2. ed. John Wiley & Sons, 2018.