



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

ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
MICROBIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Maceió

2020

ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
MICROBIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^o Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sâmia Andrícia Souza da Silva

Maceió

2020

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

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

D812e Duarte, Ilza Fernanda Barboza.

Estudo dos constituintes voláteis e atividades antioxidante e microbiológica dos extratos de própolis vermelha de Alagoas / Ilza Fernanda Barboza Duarte. – 2020.
96 f. : il. color.

Orientador: Irinaldo Diniz Basílio Júnior.

Co-orientadora: Sâmia Andrícia Souza da Silva.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 75-96.

1. Própolis. 2. Óleos voláteis. 3. Testes microbiológicos. 4. Cromatografia gasosa. 5. Espectroscopia de massa em tandem. I. Título.

CDU: 615.279:638.135



Ata de Exame de defesa de dissertação

Aos vinte e quatro dias do mês de janeiro de 2020, às dez horas, reuniu-se na Sala 206 do PPGCF/UFAL, a banca examinadora composta pelos docentes doutores, Irinaldo Diniz Basílio Júnior e Johnnatan Duarte de Freitas, e pelas docentes doutoras Sâmia Andrcia Souza da Silva e Lara Mendes de Almeida, para o exame de defesa da dissertação intitulada: "Estudo dos constituintes voláteis e atividades antioxidante e microbiológica dos extratos de própolis vermelha de Alagoas", elaboradora pela mestranda Ilza Fernanda Barboza Duarte, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 40 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 40 horas, os examinadores consideram a dissertação () APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO, emitindo o seguinte parecer: MEDIANTE ALTERAÇÃO DA BANCA

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 12:30 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela mestranda.

Maceió, 24 de janeiro de 2020

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Sâmia Andrcia Souza da Silva

Examinadora Interna: Profa. Dra. Lara Mendes de Almeida

Examinador Externo: Johnnatan Duarte de Freitas

Mestranda: Ilza Fernanda Barboza Duarte

A Deus, aos meus pais e todos àqueles que foram grandes incentivadores e que sempre acreditaram em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela saúde que me concedeu, persistência, força e determinação ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Ilson Leão e Maria de Fátima, por terem me educado com sabedoria, esforço e paciência, transmitindo através de pequenos gestos, segurança, apoio e amor. É por vocês que lutaram pela minha vitória que estou aqui, e é para vocês que dedico tudo o que fiz até hoje e ainda farei. Amo vocês mais do que tudo!!

Aos meus irmãos Junior, Ielson, Ivens e Neto, por todo o incentivo, apoio, compreensão e amizade, e por sempre torcerem e acreditarem nesta conquista, se fazendo presentes em todos os momentos.

As minhas cunhadas Lidyane Ignácio, Lidiane Maria, Iris, Gabriela e Chiara por me proporcionarem momentos de alegria, descontração e por sempre dar uma palavra de conforto quando necessário.

Ao meu noivo, Davi, por todo amor e carinho, pela paciência diária ao longo desta trajetória, por sempre estar disposto a me ajudar onde estiver e por se fazer sempre presente com sua alegria e auto-estima, te amo!!

Aos meus lindos e amados sobrinhos Ian, Letícia, Leonardo, e Igor, por me fazerem a tia mais feliz e mais babona desse mundo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior, que com tanta presteza deu-me a oportunidade de fazer parte do seu laboratório desde 2014, onde realizei este trabalho e vem me acompanhando desde então. Agradeço também pela paciência, orientação e ensinamentos direcionados nessa jornada.

A Prof^a Sâmia Silva, por ter aceito essa co-orientação e ao Prof. Ticiano Gomes, pois além dos ensinamentos, esclarecimento de dúvidas, estão sempre dispostos a ajudar e contribuíram na realização desse trabalho.

Ao Prof. Johnnatan Duarte, que conheço desde a época do CEFET, por se dispor a se fazer presente nesse momento e por me socorrer sempre, tirando dúvidas ou ajudando em alguma análise.

A Prof^a Lara Almeida, por ter aceito participar da banca de defesa mesmo que de última hora, porém acontecimentos desse tipo abrem portas para novas amizades e parcerias.

Ao Rodrigo, por se disponibilizar para a realização dos ensaios microbiológicos.

Não poderia esquecer dos meus amigos do LABTCOM e da vida, Valdemir, Carol e Naianny, por toda ajuda no laboratório sempre que precisei, pelos momentos de risadas e de amizade. Vocês fizeram com que os perrengues e os erros do dia a dia se tornassem mais leves.

Aos grandes amigos, Suene e Yuri, por acompanharem minha trajetória torcendo junto com a minha família pelo meu sucesso.

A Jocimara, por ter dividido esse sonho comigo de forma igual, se fazendo sempre presente, mesmo que em algumas vezes, estivesse longe. Obrigada pela sua amizade sincera, pelo acolhimento, pela palavra amiga, obrigada por tudo.

Ao meu gato, Nick, por ser meu anti stress diário, por me dar sempre seu carinho e me presentear com sua companhia em todos os dias.

Aos amigos que fiz durante a minha caminhada na universidade Samaysa, Alessandro e Laleska, por dividirem comigo as dificuldades e alegrias durante esses anos, por me fazerem feliz nos momentos que mais quis chorar, obrigada por serem meus companheiros.

A todos que se fizeram presente e me ajudaram de alguma forma, torcendo, rezando, dando um ombro ou uma palavra amiga.

O meu, Muito obrigada!!!

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco que em conformidade viver...

Martin Luther King

RESUMO

As investigações fitoquímicas utilizando a própolis vermelha de Alagoas (PVA) possibilitaram a identificação de diversas classes de compostos na sua composição, porém ainda não se conhece muito bem a sua composição volátil. O trabalho teve como objetivo extrair o óleo essencial da própolis vermelha (OEPV), caracterizar físico-quimicamente os os extratos: extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV), extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV), extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e o OEPV do estado de Alagoas, avaliando as suas atividades biológicas. Foram realizadas as pesquisas físico-químicas, atividade antioxidante, análise do perfil cromatográfico e fitoquímico por CG-EM, extração por Headspace e UPLC-DAD e a avaliação da atividade antibacteriana frente as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* CCCD-S010, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 14942. Observou-se nas análises físico-químicas que os extratos EEPV, EEBPV, EAPV e OEPV estão dentro dos padrões preconizados pelo Ministério da Agricultura (MAPA), sendo encontrado valores respectivos de 216,1, 272,93, 188,37 e 713,95 mg EAG.g⁻¹ para fenóis e 25,3, 20,1 e 27,3 mg EQ.g⁻¹ para flavonoides totais. A atividade antioxidante dos extratos mostrou valores de IC₅₀ de 11,88 µg/mL para o EEPV, 13,81 µg/mL para o EEBPV, 18,81 µg/mL para o EAPV e 64,20 µg/mL para o OEPV. A análise por CG-EM e a extração por Headspace mostraram a presença de compostos fenólicos como o anetol e metileugenol. O UPLC-DAD mostrou a presença de flavonoides presentes na própolis vermelha nos EEPV, EEBPV e no EAPV. Nos testes de atividade antimicrobiana os extratos EEPV, EEBPV e OEPV apresentaram CIM > 1000 µg/mL contra as cepas testadas, já o EAPV apresentou atividade contra *S. aureus* (CIM 250 µg/mL), *S. epidermidis* (CIM 500 µg/mL), *P. aeruginosa* (CIM 1000 µg/mL) e *E. coli* (CIM 500 µg/mL). Desta forma, foi possível concluir que os resultados inéditos são promissores e oferecem uma base para ampliar o escopo da pesquisa com própolis vermelha, observando nos extratos características físico-químicas, perfis cromatográficos e fitoquímicos semelhantes, com características de uma própolis vermelha de boa qualidade.

Palavras-chave: Própolis vermelha. Óleos essenciais. Atividade microbiológica. Cromatografia gasosa. UPLC-DAD.

ABSTRACT

Phytochemical investigations using the red propolis from Alagoas (PVA) have made it possible to identify several classes of compounds in their composition, but their volatile composition is not yet well known. The work aimed to extract the essential oil of red propolis (OEPV), to characterize the extracts physically-chemically: ethanolic extract of red propolis (EEPV), ethanolic extract of red propolis sludge (EEBPV), aqueous extract of red propolis (EAPV) and the OEPV of the state of Alagoas, assessing their biological activities. Physical-chemical research, antioxidant activity, chromatographic and phytochemical profile analysis by GC-MS, extraction by Headspace and UPLC-DAD and evaluation of antibacterial activity against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* CCCC-S010, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 14942. It was observed in the physical-chemical analyzes that the extracts EEPV, EEBPV, EAPV and OEPV are within the standards recommended by the Ministry of Agriculture (MAPA), with respective values of 216.1, 272.93, 188.37 and 713.95 mg EAG.g⁻¹ for phenols and 25.3, 20.1 and 27.3 mg EQ.g⁻¹ for total flavonoids. The anti-toxicity activity of the extracts showed IC₅₀ values of 11.88 µg/mL for EEPV, 13.81 µg/mL for EEBPV, 18.81 µg/mL for EAPV and 64.20 µg/mL for OEPV. Analysis by CG-EM and extraction by Headspace showed the presence of phenolic compounds such as anethole and methyleugenol. UPLC-DAD showed the presence of flavonoids present in red propolis in EEPV, EEBPV and EAPV. In the tests of antimicrobial activity, the extracts EEPV, EEBPV and OEPV presented MIC > 1000 µg/mL against the strains tested, whereas the EAPV presented activity against *S. aureus* (MIC 250 µg/mL), *S. epidermidis* (MIC 500 µg/mL), *P. aeruginosa* (MIC 1000 µg/mL) and *E. coli* (MIC 500 µg/mL). Thus, it was possible to conclude that the unprecedented results are promising and offer a basis for expanding the scope of research with red propolis, observing in the extracts physical-chemical characteristics, chromatographic and phytochemical profiles similar, with characteristics of a good quality red propolis.

Keywords: Red propolis. Essencial oils. Microbiological activity. Gas chromatography. UPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Abelha africanizada da espécie <i>Apis mellifera scutellata</i>	19
Figura 2 – Amostra de própolis vermelha e verde.....	22
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides	25
Figura 4 – Algumas classes de flavonoides encontrados em própolis	26
Figura 5 – Exemplos de compostos fenólicos encontrados na própolis	27
Figura 6 – Própolis vermelha de Alagoas.....	31
Figura 7 – Algumas estruturas dos compostos químicos encontrados na própolis vermelha de Alagoas.....	31
Figura 8 – Fac-simile da carta de outorga da IG-PVA, emitida em 2012 pela INPI	32
Figura 9 – Sistema de Clevenger	43
Figura 10 – Fluxograma do planejamento experimental	49
Figura 11 – Aparelho de Clevenger.....	50
Figura 12 – Fluxograma da obtenção dos óleos essenciais.....	51
Figura 13– Borra de própolis vermelha seca após hidrodestilação	53
Figura 14– Óleo essencial de própolis vermelha obtido por hidrodestilação.....	62
Figura 15 – Cromatograma do óleo essencial de própolis vermelha obtido por CG-EM.....	63
Figura 16 – Cromatograma do óleo essencial de própolis vermelha obtido por HS-SPME	64
Figura 17 – EEPV (A), EEBPV (B) e EAPV (C).....	66
Figura 18 – Curvas termogravimétricas de degradação da própolis vermelha bruta (A) e da borra de própolis vermelha (B)	68
Figura 19 – Curva padrão de ácido gálico para quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	70
Figura 20 – Curva padrão de quercetina para quantificação de flavonoides totais pelo método de $AlCl_3$	70
Figura 21 – Perfil cromatográfico dos marcadores do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) e extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) – 500 μ g/mL	75
Figura 22 – Perfil cromatográfico dos marcadores do extrato aquoso da própolis vermelha (EAPV) – 500 μ g/mL.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da própolis brasileira	24
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de própolis vermelha	63
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de própolis vermelha obtido por headspace.....	64
Tabela 4 – Conteúdos totais de fenois e flavonoides em amostras de extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV), extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV), extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e óleo essencial de própolis vermelha (OEPV).....	71
Tabela 5 – Atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV), extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) , extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e óleo essencial de própolis vermelha (OEPV) (% inibição do radical DPPH).....	73
Tabela 6 – Identificação dos marcadores da própolis vermelha do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) e extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) por UPLC-DAD	76
Tabela 7 – Identificação dos marcadores da própolis vermelha do extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) por UPLC-DAD.....	77
Tabela 8 – Concentração inibitória mínima dos extratos de própolis vermelha e do óleo essencial de própolis vermelha	78

LISTA DE ABREVIATURAS

BPV	Borra de própolis Vermelha
CONABEE	Conselho Nacional do Agronegócio Apícola
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
CRPV	Cera Residual de Própolis Vermelha
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EAPV	Extrato aquoso de própolis vermelha
EEBPV	Extrato etanólico da borra de própolis vermelha
EEPV	Extrato etanólico de própolis vermelha
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESPV	Extrato seco de própolis vermelha
FPS	Fator de proteção solar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HS-SPME	HeadSpace solid phase microextraction
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IG	Indicação geográfica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OEPV	Óleo Essencial de Própolis Vermelha
OMS	Organização Mundial da Saúde
PV	Própolis vermelha
PVB	Própolis Vermelha Bruta
PVA	Própolis vermelha de Alagoas
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu
TGA	Thermogravimetric analysis / Análise termogravimétrica
UPLC-DAD	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detector– Tandem Mass Spectrometry

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 A apicultura no cenário brasileiro	19
2.2 Própolis: características gerais.....	21
2.2.1 Composição química da própolis	24
2.2.2 Composição volátil da própolis.....	29
2.3 Própolis Vermelha de Alagoas (PVA).....	30
2.4 Propriedades biológicas e farmacológicas da própolis.....	32
2.4.1 Atividade antioxidante	33
2.4.2 Atividade antineoplásica.....	35
2.4.3 Atividade antiviral	36
2.4.4 Atividade anti-hipertensora.....	36
2.4.5 Atividade antidiabética.....	37
2.4.6 Atividade antiprotozoária	37
2.4.7 Atividade antimicrobiana	38
2.4.8 Atividade antifúngica	38
2.4.9 Atividade anti-inflamatória	39
2.4.10 Atividade imunomodulatória	40
2.5 Extração de compostos voláteis.....	41
2.5.1 Hidrodestilação.....	42
2.5.2 Extração por <i>Headspace</i>	43
2.6 Identificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	44
2.7 Reaproveitamento residual da própolis	45
3. OBJETIVO	48
3.1 Objetivos geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4. METODOLOGIA	49
4.1 Caracterização da área de estudo: Marechal Deodoro	49
4.2 Coleta, armazenamento e caracterização da PVA.....	49
4.3 Extração dos compostos orgânicos voláteis (COV)	50
4.4 Rendimento do óleo	51

4.5 Extração por <i>Headspace</i>	52
4.6 Preparo dos extratos de própolis vermelha (PV).....	52
4.6.1 Extrato etanólico da própolis vermelha bruta	52
4.6.2 Extrato etanólico da borra de própolis vermelha	53
4.6.3 Extrato aquoso da própolis vermelha	53
4.7 Teor de umidade	54
4.8 Análise termogravimétrica (TGA) e teor de cinzas.....	54
4.9 Teor de ceras	54
4.10 Quantificação de fenois totais	55
4.10.1 Construção da curva de calibração	55
4.10.2 Teor de fenois totais dos extratos de PVA	55
4.11 Quantificação de flavonoides totais.....	56
4.11.1 Construção da curva de calibração	56
4.11.2 Teor de flavonoides totais dos extratos de PVA.....	57
4.12 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	57
4.13 Identificação dos marcadores da PV nos extratos por UPLC-DAD	58
4.14 Atividade antimicrobiana	59
4.15 Análises estatísticas.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Coleta, armazenamento e caracterização da PVA.....	61
5.2 Rendimento do óleo obtido por hidrodestilação	61
5.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis.....	62
5.4 Extratos obtidos por maceração e decocção.....	66
5.5 Teor de umidade	66
5.6 Análise termogravimétrica (TGA) e teor de cinzas.....	66
5.7 Teor de ceras	69
5.8 Curva de calibração de fenois e flavonoides totais	69
5.9 Determinação de fenois e flavonoides totais.....	70
5.10 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	72
5.11 Identificação dos marcadores da própolis vermelha nos extratos por UPLC-DAD	74
5.12 Atividade antimicrobiana	77
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
---------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto de mistura complexa formada por material resinoso e balsâmico de origem vegetal, coletada por abelhas de diferentes espécies e modificada pela adição de secreções como saliva e cera após seu transporte para a colônia. Tem função de vedar, impermeabilizar e esterilizar a colmeia, sendo ainda um isolante térmico. Suas aplicações são conhecidas desde a antiguidade e sua ação terapêutica é comprovada em diversas propriedades farmacológicas (CARDOSO et al., 2015).

Variações regionais e sazonais modificam a composição da própolis e a amplitude de suas atividades terapêuticas. Como consequência desta variação na composição química, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas (MENEZES, 2005; CARDOSO et al., 2015). Diversos estudos vêm sendo publicados, revisando as suas propriedades como ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, imunomodulatória, entre outras (GALINDO, 2007).

A composição da própolis pura varia de acordo com seu tipo e região. Em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo restos orgânicos. (PEREIRA, 2008). Dependendo da origem, pode conter mais de 400 substâncias químicas com funções ainda desconhecidas na fisiologia humana (SIMIONATTO, 2004).

Muitos óleos essenciais da própolis foram analisados e substâncias químicas como terpenóides, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos e cetonas alifáticas têm sido relatadas (CLAIR; PEYRON, 1981; PETRI et al., 1988; BANKOVA et al., 1998; BANKOVA et al., 1999; BRACHO, 2000; KUSUMOTO et al., 2001; PINO et al., 2006). A composição química dos óleos essenciais pode apresentar variações qualitativas e quantitativas devido a influência da sazonalidade e local de origem (CLAIR; PEYRON, 1981).

Já existem relatos de atividade antibacteriana do óleo essencial de própolis proveniente dos estados do Paraná, Piauí e Rio de Janeiro (BANKOVA et al., 1999; ZWOLAN; MERESTA, 2000; OLIVEIRA, 2010).

O estudo da composição química da própolis é importante, pois, considerando a relação com a flora do local de sua produção, pode-se obter resultados que indiquem sua origem, correlacionando a atividade farmacológica da flora apícola e da própolis (SOUSA, 2006). Tais estudos ainda são escassos com o óleo da própolis vermelha de Alagoas e, devido ao fato de o Estado ser um dos maiores produtores dessa própolis, em específico, a necessidade dessas análises torna-se ainda maior.

A principal forma de utilização da própolis é na forma do extrato alcoólico, o que é largamente utilizado para fins terapêuticos e farmacológicos em humanos, porém, um subproduto deste processamento é a “borra” ou resíduo da extração alcoólica da própolis que ainda não possui valor comercial e poderia ainda conter os princípios ativos da própolis vermelha, acreditando-se que este resíduo possa representar uma alternativa viável e promissora para a produção de novos produtos como suplementos alimentares e beberagens, no preventivo de enfermidades e em aplicações tópicas (FUNARI; FERRO, 2006; SANTOS et al., 2013).

Um inconveniente da extração etanólica/hidoetanólica de própolis bruta é que pequena parte das resinas e ceras é incorporada ao extrato. Quando o extrato é diluído em água imediatamente se forma um filme composto pelas ceras e resinas insolúveis em água. Esse filme adere às superfícies próximas como paredes internas de recipientes e paredes do sistema digestivo. No sistema digestivo esse filme pode dificultar a absorção dos componentes bioativos (também chamados componentes úteis) presentes no extrato. No entanto, os extratos etanólicos e hidroetanólicos são preferidos, em relação a outros solventes orgânicos, pela possibilidade de ingestão. Contudo essa ingestão é rejeitada por muitos indivíduos, principalmente idosos e crianças, por causa da presença do etanol (TORRES; ROSA; SANTOS, 2011).

Diante desse contexto, o presente estudo objetivou extrair e caracterizar o óleo essencial da própolis vermelha, reaproveitando o resíduo da extração para produção de um novo extrato, avaliar as características físico-químicas e antioxidante dos extratos de própolis vermelha, além de avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial da própolis vermelha de Alagoas, frente aos diferentes extratos dessa própolis, assim como a realização de ensaios fitoquímicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A apicultura no cenário brasileiro

Apicultura é a parte da zootecnia que possui a arte/ciência de criar e estudar as abelhas (ROCHA, 2008; OLINTO, 2014). É uma das práticas mais antigas e importantes do mundo e existe a mais de 7.000 a.c., fato fornecido pelas pinturas rupestres encontrado na Cova da Aranha, Valencia, Espanha. Nessas pinturas se observam figuras humanas coletando favos de colônias alojadas em cavidades rochosas, e abelhas voando ao seu redor (DIB, 2009).

As abelhas *Apis mellifera* chegaram ao Brasil através do Padre Antônio Carneiro Aureliano em 1839. As subespécies ou raças dessas abelhas são de origens europeias (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. iberiensis*). A introdução da espécie africana (*Apis mellifera scutellata*) (Fig. 1), ocorreu em 1956, no qual se disseminou e se multiplicou rapidamente na natureza, cruzando com espécies europeias de várias origens, formando um políbrido conhecido como abelha africanizada. Atualmente, predominam suas características morfológicas, comportamentais, ecológicas, bioquímica do carbono da cutícula, frequência alélica, sistema enzimático e padrão do DNA nuclear e mitocondrial. (ROCHA, 2008; ZANUSSO, 2016; PEGORARO et al., 2017).

Figura 1 – Abelha africanizada da espécie *Apis mellifera scutellata*.



Fonte: WaspWeb, 2019.

A técnica de exploração racional das abelhas presta uma grande contribuição ao homem através da produção do mel, da geleia real, da própolis, da apitoxina, da cera e do pólen, contribui à agricultura pelos serviços indiretos de polinização, além de, ajudar na geração de emprego, acrescentar renda, por não requerer

exclusividade, podendo o apicultor ter outros trabalhos e dedicar às abelhas somente algumas horas semanais e é um fator de diversificação da propriedade rural, proporcionando benefícios sociais, econômicos e ecológicos (ROCHA, 2008; SILVA, 2008; OLINTO, 2014).

Com relação aos produtos apícolas, a geleia real, a apitoxina (veneno) e a própolis, são utilizados como medicamentos e cosméticos, estão sendo cada vez mais procurados e valorizados, tendo mercados específicos (SILVA, 2018). A cera sempre foi utilizada para cosméticos e velas artesanais, e seu mercado foi ampliado para indústrias de medicamentos e têxtil, bem como para fabricação de polidores e vernizes, e embalagens de alimentos (SILVA; BRAZ, 2015). O mel e o pólen estão sendo muito pesquisados como alimentos nutracêuticos, ou seja, alimentos que possuem compostos bioativos e que desempenham papéis importantes na saúde levando em conta à prevenção e o tratamento de doenças (FARIAS, 2016).

A geleia real apresenta ação biocatalizadora nos processos de regeneração de células no corpo humano, composta por proteínas, carboidratos, vitaminas, hormônios, enzimas e substâncias minerais, sendo produzida pelas abelhas operárias a partir das glândulas hipofaríngeas e mandibulares e é usada como alimento das larvas e da rainha (FARIAS, 2016).

A própolis é mundialmente reconhecida como um fármaco "natural" e valorizada pela presença de seus flavonoides, que são 10 vezes mais ativos que os flavonoides de origem vegetal (SILVA; BRAZ, 2015). Ela é utilizada há séculos e por diferentes povos, como os egípcios, para embalsamar seus mortos e evitar a putrefação dos corpos; pelos gregos e romanos, como agente antisséptico e cicatrizante; e pelos incas, como antipirético. No Brasil, índios usavam a própolis elaborada por abelhas nativas melíponas (geoprópolis) na fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamentos (De-Melo et al., 2014).

A apitoxina é o veneno das abelhas operárias, que é armazenado na base do ferrão e usado na defesa da colmeia. É uma substância transparente, solúvel em água, composta de proteínas, aminoácidos, lipídeos e enzimas. (PAULA NETO; ALMEIDA NETO, 2006; SILVA, 2007). Esse veneno é comercializado para laboratórios em gramas, e utilizado na fabricação de pomadas e vacinas. Porém, o mercado desse produto é ainda bastante incipiente, mas com grande potencial de crescimento (VILELA, et al., 2006; SILVA, 2007).

O mel é produzido a partir da coleta de nectar e/ou secreções de partes vivas das plantas, no qual é coletado, transformado e combinado com secreções próprias das abelhas, para ser posteriormente armazenado nos alvéolos dos favos e consumido por elas como alimento (PAULA NETO; ALMEIDA NETO, 2006; SILVA, 2007). É também utilizado como alimento humano, sendo um ótimo revigorante para pessoas cansadas, bom para prevenir ou mesmo combater gripes e resfriados e está presente em várias formulações cosméticas, como shampoo, sabonetes; cremes para o rosto e para a pele, creme dental, entre outros produtos (SEBRAE, 2006). Segundo Santos (2016), a sua produção é uma atividade inovadora no combate a mudanças climáticas, uma vez que, cada kg de mel produzido pode neutralizar até 16kg de dióxido de carbono (CO₂) que são lançados na atmosfera.

O pólen é fonte de proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares, oligoelementos e enzimas. É utilizado pelo homem como complemento alimentar, em casos de esgotamento físico e/ou mental stress, depressão, impotência, prevenção de problemas de próstata, anemias e queda de cabelos. As abelhas usam o pólen como fonte de proteínas, para alimentar as crias e para produção de geleia real (SILVA, 2007).

2.2 Própolis: características gerais

O termo própolis é derivado do grego: *pro* – em defesa de, e *polis* – cidade. Ela é utilizada pelas abelhas para fechar frestas da colmeia, embalsamar insetos mortos e manter o ambiente asséptico. A própolis é tão antiga quanto o mel, e tem sido utilizada pelo homem há séculos. Os primeiros registros da sua utilização remontam ao Egito antigo (1700 a.C.; “cera negra”) e era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos (ÁSSIMOS, 2014; FERREIRA, 2014; PEREIRA et al., 2015; SILVA, 2018).

Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre as propriedades químicas e “composição”, indexado no Chemical Abstracts (referência n. 192). Em 1968 surgiu nessa mesma revista o resumo da primeira patente utilizando a própolis Romena, para a produção de loções para banho (Pereira, et al., 2002; FRANCO, 2011).

Ela é uma mistura complexa formada por um material resinoso e balsâmico de origem vegetal, coletada por abelhas de diferentes espécies a partir do exsudato de diversas partes das plantas, como cascas e botões florais e modificada ela

adição de cera e secreções salivares (enzima 13-glicosidase) acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas. A própolis bruta geralmente está no estado sólido, sendo dura a 15°C e maleável a partir dos 30°C. Suas propriedades físicas, como cor, odor e faixa de fusão (60°C - 70°C) variam de uma amostra para outra. A sua composição química varia devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras, como também a espécie de abelha coletora. Dessa forma, estas características irão refletir nas diversas atividades biológicas e farmacêuticas apresentadas por este produto (SILVA, 2009; CARDOSO, et al., 2015; PETER et al. 2017; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

A própolis, sob a forma de extratos, é preparada em solução aquosa e solução alcóolica, a partir da própolis *in natura*. A preparação de extrato etanólico, segundo Park e colaboradores (1998) foi a que produziu melhores efeitos farmacológicos. Ela possui grande importância medicinal e econômica, sendo comercializada em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, tais como: comprimidos, pastilhas, dentrífcios, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, etc. (BANKOVA, ET AL., 2000; PARK, et al., 2002; FRANCO, 2011)

Na área comercial, tanto a própolis verde como a vermelha (Fig. 2), se destacam no mercado nacional e internacional de produtos apícolas, sendo, o Brasil, um dos principais produtores mundiais de própolis, tem a maior parte da produção exportada, especialmente para o Japão. O país possui condições climáticas, geográficas e características da vegetação que favorecem esta produção (COSTA et al., 2014; KOLC, 2014; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

Figura 2 – Amostra de própolis vermelha e verde.



Fonte: Antoninho Perri/Jornal da UNICAMP, 2011.

Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores de própolis do mundo, ele não é considerado como um mercado atraente para a proteção dessa tecnologia, revelado através do pequeno número de patentes de não residentes, muito

provavelmente pela falta de competitividade tecnológica, sendo necessários mais incentivos, tanto dos produtores como das indústrias, que visem aumentar o cenário inovativo do país (MACHADO ET AL., 2012; KARLA CAMYLA MORAIS DA SILVA, 2007).

A grande procura pela própolis verde se dá em função da presença de um composto químico, Artepilina C (ácido 3,5- diprenil-4-hidroxicinâmico), o qual tem despertado grande interesse em razão de suas propriedades biológicas (atividade anti-tumoral, pela promoção da apoptose e cura da leucemia, favorecendo o aumento da resposta imunológica, além de apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante) (PAREDES-GUZMÁN et al., 2003; SILVA, 2009).

Porém, tem-se uma preocupação com um padrão definido para própolis *in natura* ou para extrato em relação ao controle de qualidade (SILVA, 2009). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) juntamente com representantes do Conselho Nacional do Agronegócio Apícola (CONABEE), da Confederação Brasileira de Apicultura, associações, empresas, pesquisadores e técnicos do MAPA elaboraram uma proposta afim de normatizar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis. A Instrução Normativa n. 3, de 2001 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do MAPA estabelece um padrão oficial que contempla a própolis *in natura* e o extrato de própolis. O Anexo VII desta Instrução fixa e descreve a composição, propriedades físicas e químicas (umidade, cera, cinzas, compostos fenólicos, flavonóides e oxidação), características sensoriais (aroma, sabor, consistência e granulometria); acondicionamento e demais condições a que um extrato deve obedecer para ser considerado apto para comercialização e consumo (ausência de contaminantes de origem sintética e aditivos, e critérios de qualidade higiênico sanitárias) (MALASPINA; PALMA, 2000; BRASIL, 2001; SILVA, 2009).

Atualmente a própolis está classificada em 13 grupos, essa divisão é baseada nas características físico-químicas e em relação à sua localização. A própolis vermelha, oriunda dos manguezais do litoral e das margens de rios no Nordeste, ocupa o 13º grupo (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação da própolis brasileira.

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

Fonte: Arruda, 2019.

2.2.1 Composição química da própolis

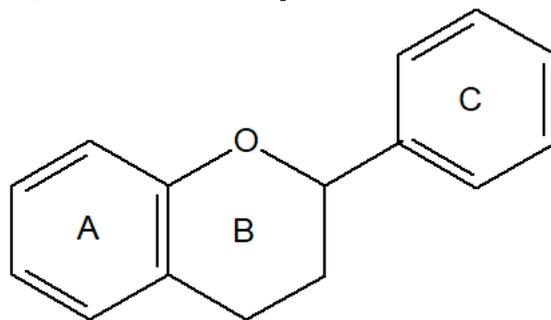
A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos, sendo composta basicamente de 47% resinas (vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como: flavonoides, ácidos graxos, álcoois aromáticos, e ésteres), 30% ceras, 4-15% substâncias voláteis, 13% sujidade e compostos desconhecidos e 5% pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de

vitaminas A, B1, B2, B6, C e E, no qual, a proporção dessas substâncias varia e depende do local e da época da coleta (PARK et al., 2002; FUNARI; FERRO, 2006; MENEZES, 2005; SILVA, 2009; DUARTE, et al., 2018).

O potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes. Mais de 400 compostos químicos já foram identificados e eles podem ser organizados em alguns grupos principais como: açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres alifáticos, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, esteróides, cetona, charconas e D-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, gutiferas, entre outros (MARCUCCI et al., 2001; LIMA, 2006; LÓPEZ et al., 2014; DUARTE, et al., 2018). No entanto, ainda pode conter substâncias químicas com funções desconhecidas. A investigação da composição química possibilita estabelecer a correlação de seus constituintes e a atividade farmacológica destes (SOUSA, et al., 2006; SILVA, 2009).

Os flavonóides (Fig. 3) são substâncias aromáticas constituídos por 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, possuindo nessa estrutura três anéis aromáticos C6-C3-C6 (A, B e C), sendo o maior grupo de compostos isolados da própolis (PEREIRA, 2008; SILVA, 2009).

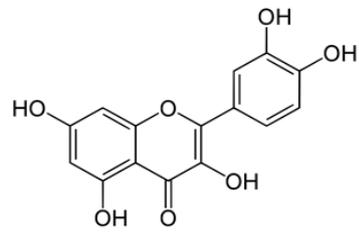
Figura 3- Estrutura básica dos flavonoides.



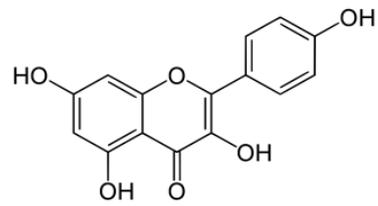
Fonte: Silva, 2009.

Algumas estruturas de flavonóides (Fig. 4) comumente encontradas na própolis são: canferol, quercetina, isorramnetina e galangina são flavonóis; apigenina, luteolina e crisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavonona e a pinobancsina é um diidroflavonol.

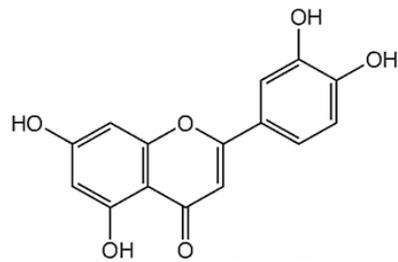
Figura 4- Algumas classes de flavonoides encontrados em própolis.



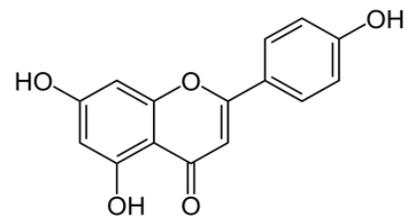
Quercetina



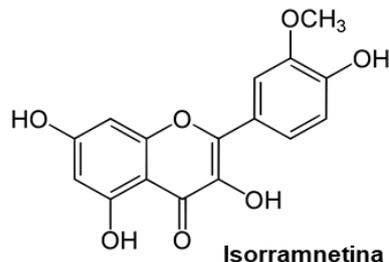
Canferol



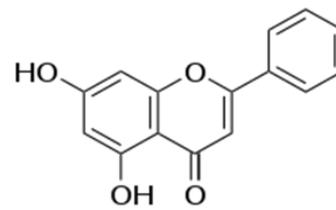
Luteolina



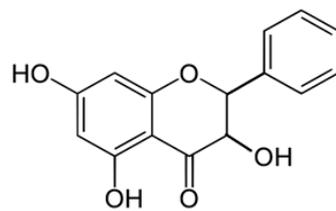
Apigenina



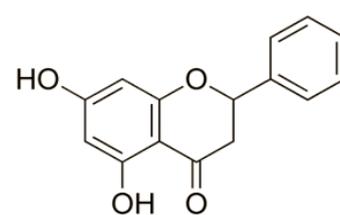
Isorramnetina



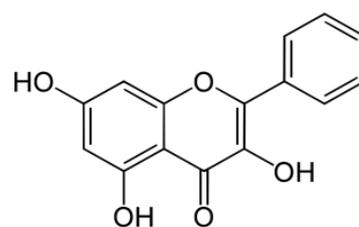
Crisina



Pinobanksina



Pinocembrina

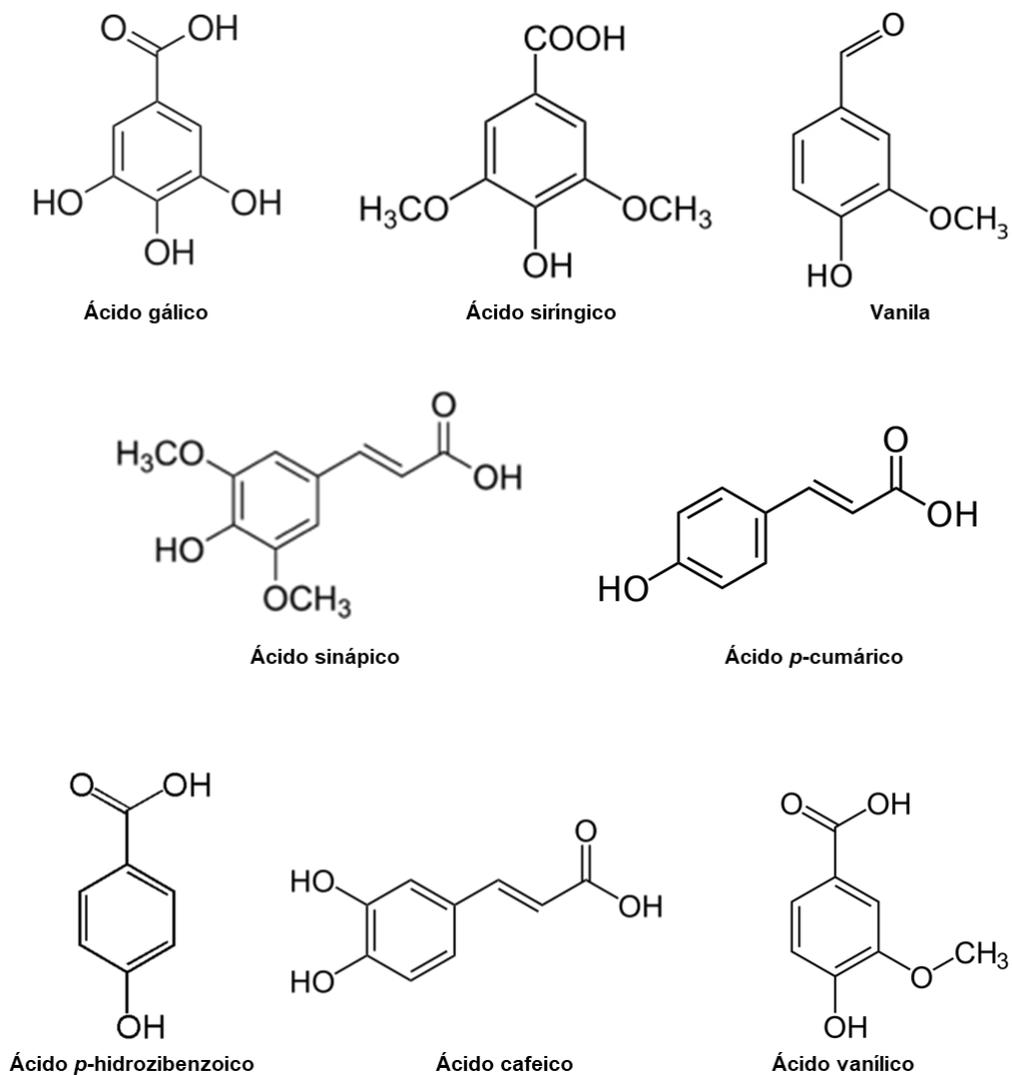


Galangina

Fonte: Marcucci, *et al.*, 1998.

Já os ácidos fenólicos (Fig. 5), são identificados por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e ainda um ou mais grupamentos hidroxílicos ou metoxílicos, o que confere as características antioxidantes. São divididos em três grupos principais, o primeiro e o mais simples encontrado na natureza é o ácido benzóico e derivados, que possuem sete átomos de carbono; os ácidos cinâmicos formam o segundo grupo, e em sua estrutura estão contidas as cumarinas; e os ácidos fenólicos, formando o terceiro grupo, podem apresentar-se tanto em sua forma natural, ligados entre si ou com outros compostos (ARRUDA, 2019).

Figura 5- Exemplos de compostos fenólicos encontrados na própolis.



Fonte: Marcucci et al., 1998.

De maneira geral, a composição heterogênea da própolis se dá pelo grupos químicos (WALKER; CRANE, 1987; GREENAWAY et al., 1990; MARCUCCI, 1995; FONTANA et al., 2000; BANKOVA et al. 2000; PEREIRA et al., 2002; PEREIRA, 2008):

- a) Hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanoshexanos);
- b) Álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico);
- c) Ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e ésteres derivados (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- d) Ácidos aromáticos (benzóico, cafeico, cinâmico, cumáricos (-o, -m, -p, ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e ésteres aromáticos derivados (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);
- e) Ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oleico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);
- f) Aldeídos (benzaldeído, aldeído capróico, vanilina, isovanilina, phidroxibenzaldeído);
- g) Cetonas (acetofenona e seus derivados);
- h) Flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferid; 3, 7, 4', 5'tetrametil éter da quercetina);
- i) Flavanonas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butirato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobina);
- j) Chalconas e diidrochalconas (alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3- acetato, pinocembrina, pinostrobina);
- k) Terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno, β -bisabolol, 1,8-cineol, derivados do clerodano, derivados do labdano, β -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);
- l) Esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);

m) Aminoácidos (alanina, β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina, tirosina);

n) Açúcares (d-ribofuranose, d-frutose, d-glucitol, d-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);

o) Lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofurano);

p) Vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);

q) Minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

2.2.2 Composição volátil da própolis

Compostos orgânicos voláteis (COV) são moléculas pequenas de baixa a moderada hidrofiliabilidade, de alta pressão de vapor e podem atravessar facilmente as membranas celulares para serem liberados para a atmosfera (GRESSLER, 2010). São compostos por uma mistura variável de terpenoides, hidrocarbonetos de baixo peso molecular, ácidos, alcoóis, aldeídos, cumarinas, entre outras classes de compostos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido atribuída principalmente aos terpenos e derivados, sendo estes compostos capazes de interagir com diferentes moléculas alvo e funções das células bacterianas. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana destes compostos e relataram diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético (PROBST, 2012).

A própolis possui em sua composição compostos voláteis que desempenham um papel importante ao contribuir para o aroma característico e para as suas atividades biológicas, porém, estão em baixas concentrações. Pesquisadores aplicaram vários métodos para obter os voláteis de própolis como destilação a vapor ou hidrodestilação (BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2014).

Ainda assim, mesmo presentes em baixas concentrações, podem dar valiosas informações como, por exemplo, acerca da sua atividade antimicrobiana e das classes de compostos presentes na fração volátil dos exsudatos vegetais utilizados na sua elaboração, contribuindo, portanto, para a identificação da origem botânica da própolis. (TORRES, et al., 2008).

Estudos sobre óleos essenciais de própolis brasileira indicaram a existência de diferenças significativas na sua composição qualitativa, embora em todos eles a presença de sesquiterpenos tenha sido acentuada e, quase sempre, predominante. Constituíram exceções importantes em amostras de própolis de Pacajus (CE) e Picos (PI), nas quais ocorreu uma predominância não usual de hidrocarbonetos alifáticos saturados, além de uma amostra de Prudentópolis (PR), que apresentou monoterpenos como a classe dominante, sendo o *p*-cimen-8-ol o seu constituinte majoritário (11,4%) (TORRES, et al., 2008). Os sesquiterpenos predominaram, também, em uma amostra de própolis búlgara do tipo β -eudesmol e em duas amostras originárias das Ilhas Canárias (Espanha). Nas amostras de própolis das Ilhas Canárias o nerolidol e o espatulenol foram os sesquiterpenos de maior ocorrência, seguidos do ledol e do (E)-cariofileno. O nerolidol (12,3%) e o espatulenol (10,4%) foram também os constituintes majoritários de uma amostra de própolis produzida por abelhas indígenas sem ferrão da espécie *Tetragona clavipes* em Prudentópolis (PR) (BANKOVA, et al., 1995; BANKOVA, et al., 1998; BANKOVA, et al., 1999).

A constituição dos compostos voláteis de própolis depende, também, das espécies de abelhas que a elaboraram. Estudos realizados por Pino, et al. (2006) compararam os COV da própolis oriunda de abelhas *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão *Melipona beechei* da mesma região (península de Yucatán, no México), tendo sido identificados 120 substâncias, 21 delas presentes apenas na própolis de *A. mellifera* e outras 15 encontradas unicamente na própolis de *M. beechei*. Logo, observaram diferenças acentuadas na composição de cada amostra, embora a vegetação existente nas regiões onde elas foram coletadas seja similar, o que indica que diferentes espécies de abelhas apresentam preferência por variadas fontes botânicas para a elaboração da própolis.

2.3 Própolis Vermelha de Alagoas

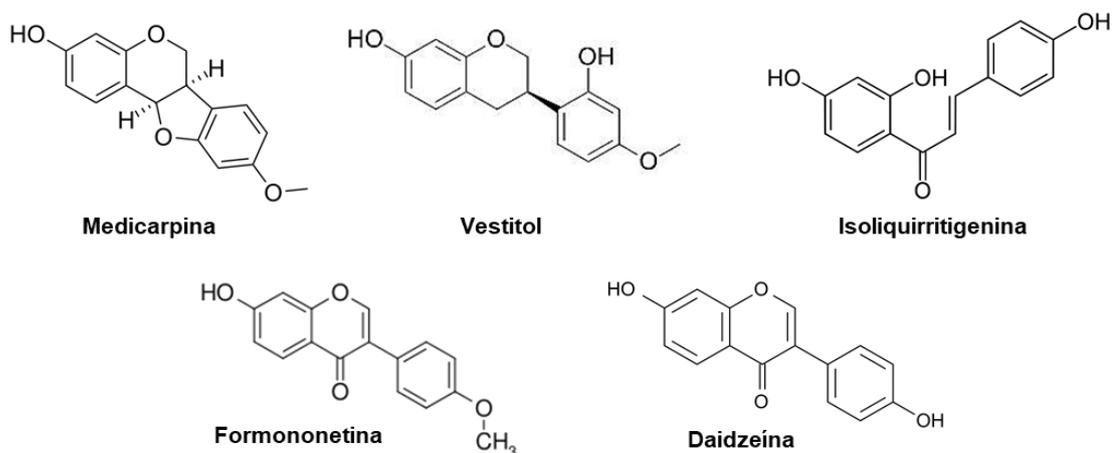
Segundo o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) a “Própolis Vermelha de Alagoas” (PVA) (Fig. 6) é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, de brotos, flores e exsudatos predominantemente da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae, nome popular: Rabo de Bugio), de ocorrência na região litorânea e estuarino-lagunar do Estado de Alagoas, acrescidos das secreções salivares desses insetos, além de cera e pólen, para elaboração final do produto cuja composição apresenta, entre outros compostos químicos (Fig. 7), medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina, formononetina e daidzeína (ALTEC, 2013; DUARTE, et al., 2018).

Figura 6 – Própolis Vermelha de Alagoas.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 7 – Algumas estruturas dos compostos químicos encontrados na própolis vermelha de Alagoas.



Fonte: Autora, 2019.

Alguns flavonoides e ácidos fenólicos da própolis vermelha de Alagoas já foram identificados, são eles: ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, 16-formononetina, quercetina, catequina, liquiritigenina, dalbergina, crisina, pinocebrina, isoliquiritigenina, dentre outros (ÁSSIMOS, 2014; DUARTE, et al., 2018).

O INPI outorgou em 17 de agosto de 2012, a Indicação Geográfica (IG) – Denominação de Origem, para o domínio “Própolis Vermelha e Extrato de Própolis Vermelha”, categoria Mista, incluindo a designação do selo “Denominação de Origem – Manguezais de Alagoas”, conforme Figura 8 (ALTEC, 2013).

Figura 8 - Fac-simile da carta de outorga da IG-PVA, emitida em 2012 pela INPI.



Fonte: Altec, 2013.

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

2.4 Propriedades biológicas e farmacológicas da própolis

Como já foi comentado anteriormente, a própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas diversas propriedades como: antimicrobiana,

antiparasitária, antifúngica, antiviral, imunoestimulante, antioxidante, antitumoral, antisséptica, espasmolítica, cicatrizante e anestésica. (LUSTOSA et al., 2008; PEREIRA, 2008; LÓPEZ et al., 2014; DUARTE et al., 2018).

Pereira et al. (2015), citam também outras diversas atividades desempenhadas pela própolis, como propriedades hepatoprotetoras, analgésica, atividade estrogênica, atividade antiangiogênica e regenerativa de cartilagem e ossos, através do estímulo na proliferação de condrócitos. Com relação às propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras, feridas e hepatoproteção, possivelmente estão relacionadas com a atividade antioxidativa da própolis.

O potencial biológico está diretamente ligado a composição química, exercendo uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas, e esta possivelmente é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a variação da flora da região, partes da planta e época da colheita, a técnica empregada, assim como a espécie da abelha, modifica essa composição (PEREIRA, 2008).

No caso da Própolis Vermelha de Alagoas, essas atividades se atribuem principalmente aos isoflavonoides, ácidos fenólicos, gutiferas e terpenos (LÓPEZ et al., 2014; DUARTE, et al., 2018).

Aguiar et al. (2018), avaliaram a PVA frente a atividade anticolinesterase, no qual encontraram resultados positivos. Os autores propuseram que ela pode ser usada como auxiliar em doenças degenerativas como Alzheimer.

Já Santos, et al. (2016), estudaram o efeito neuroprotetor da própolis vermelha em modelo experimental da doença de Parkinson com roedores, obtendo resultados positivos com o uso de 10 mg/kg de própolis.

Estudos realizados por Nascimento, et al. (2009), observaram um aumento relativo no valor do FPS (Fator de proteção solar), quando incorporaram extratos de própolis a um filtro solar químico, obtendo uma maior proteção contra os raios solares.

2.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente (em conjunto com outros) para caracterizar

diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO), tendo como exemplo os radicais livres (ARNAO, 2000).

Um radical livre é uma espécie química que possui elétrons desemparelhados, localizados nos átomos de oxigênio. Podem ser produzidos através de reações metabólicas, exposição a radiações ultravioletas, ingestão e/ou inalação de substâncias químicas, podendo provocar alterações no corpo humano através da oxidação de várias biomoléculas como o ácido desoxirribonucleico (DNA), vitaminas, proteínas e lipídeos, podendo resultar em danos teciduais e inclusive na morte celular (HALLIWELL, 2006).

Os antioxidantes são compreendidos por De-Melo et al. (2014), como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem, consideravelmente, a sua oxidação. Os antioxidantes exógenos, quando presentes na dieta em quantidades significativas, contribuem para a prevenção de doenças graves e crônicas, como alguns tipos de câncer, cardiopatias, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias associadas à formação de radicais, durante o processo de oxidação.

Uma variedade de métodos estão sendo utilizados para determinar a capacidade antioxidante (FERRONATO et al., 2006). Dentre esses métodos destaca-se uma metodologia simples, rápida e informativa usando o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) para determinar o potencial de neutralização de radicais livres. Assim, colocando-se os compostos testados em contato com a solução contendo DPPH, é possível monitorar a diminuição da absorvância ocorrida durante a reação (TEIXEIRA, 2003; CARVALHO, 2013).

Durante a medida da atividade antioxidante dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é que a eficiência do sequestro do radical é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical, mas também pela concentração. O segundo fator está relacionado com o espectro de ação do antioxidante por sua vez modulado pela solubilidade (aquoso ou organossolvente), por exemplo, a vitamina C (ácido ascórbico) é um potente sequestrador de radicais hidrofílicos, mas não de radicais lipofílicos (NIKI, 2002).

A própolis contém uma grande quantidade de compostos que possuem a capacidade de remover o excesso de radicais livres (LIMA, 2006). Entre eles os flavonóides e outros compostos fenólicos. Esta ação antioxidante se deve ao fato de que os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI et al., 1998; RUSSO et al., 2002). De fato, esses biopolifenóis demonstram interferir não apenas na propagação da reação, mas também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição quanto pela inibição de enzimas envolvidas na inicialização da reação (RUSSO et al., 2002).

2.4.2 Atividade antineoplásica

A formação de células neoplásicas pode ser induzida por radicais livres e o uso de fármacos anticancerígenos naturais como agentes quimiopreventivos tem ganho uma crescente popularidade. Assim, compostos como os florotaninos, podem ser utilizados para eliminar esses radicais minimizando o processo inerente à formação da neoplasia (LI *et al.*, 2011).

Diversos compostos isolados da própolis apresentaram atividade inibitória no crescimento de diversos tumores. Matsuno (1995) constatou a atividade inibitória de um diterpeno (PMS-1) sobre hepatocarcinoma humano. MITAMURA et al. (1996), estudando o efeito do PMS-1 sobre tumor de pele sugeriu que esta atividade esteja relacionada com a inibição na síntese de DNA destas células. O éster fenetílico do ácido cafeico isolado de própolis, apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B, mas mostrou-se inócua quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo (JIN et al., 2005).

Outro composto, a crisina, também isolada de própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma C6 de rato; as células mantiveram-se estacionárias na fase G1 do ciclo celular (WENG *et al.*, 2005).

Diversos outros compostos com atividade inibitória sobre crescimento de tumores foram isolados em outros estudos, como de TAKAI *et al.* (1996), MATSUNO *et al.* (1997), BANSKOTA *et al.* (1998), KIMOTO *et al.* (1998), WEYANT *et al.* (2000), entre outros. SUZUKI *et al.* (1996) e Orsolich *et al.* (2005) isolaram compostos hidrossolúveis da própolis que, atuando sinergicamente, potencializaram a atividade de drogas tumorocidas, inibindo assim o desenvolvimento de tumores acíticos de Ehrlich.

2.4.3 Atividade antiviral

Os compostos bioativos naturais e os seus derivados constituem uma promissora alternativa aos fármacos já existentes, dada a sua eficácia e limitados efeitos colaterais (THOMAS; KIM, 2011).

A atividade antiviral da própolis e seus derivados já foram descritos frente a vírus de importância em medicina e medicina veterinária como o herpes vírus humano tipo 1 (HSV1) e dois, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da influenza aviária, Herpes Vírus Bovino (BoHV-5) e o Parvovírus Suíno (PPV) e demonstraram resultados promissores da própolis frente a vírus patogênicos para humanos e animais (PETER et al., 2017).

O autor ainda destaca que a atividade antiviral da própolis brasileira na região de fronteira com o Uruguai, sul do Brasil, também foi identificada, especificamente contra o HIV. Os compostos melliferone (novo triterpenoide), os ácidos morônico, anwuweizônico, betulônico, 4-hidroxi-3-metoxipropiofenona, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, 3-(3, 4-dimetoxifenil)-2-propenal, 12-acetoxi tremetona, ácido 3 β -hidroxi 3- desoximorônico e ácido 3-O-(3', 3'dimetil succinil) morônico foram isolados e testados quanto à atividade anti-HIV em linfócitos H9, no qual, o ácido morônico apresentou atividade anti-HIV significativa (TOMAZZOLI, 2015).

2.4.4 Atividade anti-hipertensora

A ingestão de alimentos ricos em antioxidantes tem sido apontada como auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares. No que respeita à hipertensão, uma das principais estratégias farmacológicas para controlar os níveis de pressão sanguínea é o recurso a fármacos capazes de inibir a enzima conversora da angiotensina I em angiotensina II (vulgarmente designados de IECAs) (ABDALA, 2016).

As isoflavonas daidzeína, biochanina A, formononetina genisteína, vestitol e neovestitol, encontradas na PVA (ALENCAR et al., 2007; DAUGSCH et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014), apresentam relevantes ações cardiovasculares como efeitos vasorrelaxante, anti-hipertensivo, antioxidante e cardioprotetor (WANG et al., 2005; WANG et al., 2006; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007; ZHU et al., 2007; MARTIN et al., 2008; GILANI et al., 2009; SUN; LIU; CAO, 2011; SUN et al., 2013) motivo pelo qual são empregados no tratamento e prevenção de doenças

cardiovasculares, tal qual hipertensão arterial sistêmica (HAS) (DUNCAN; PHIPPS; KURZER, 2003; JACKMAN; WOODMAN; SOBEY, 2007).

Estudos realizados por Herculano (2017), observou que o uso de extrato seco de propolis vermelha (ESPV) promoveu uma hipotensão em ratos, sem alterar a frequência cardíaca, no que parece ocorrer devido à uma redução da resistência vascular periférica através de ações no endotélio vascular. A autora também relata que a presença de isoflavonas no ESPV eleva seu potencial terapêutico para doenças que acometem o sistema cardiovasculares.

2.4.5 Atividade antidiabética

A diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica causada por uma deficiência (hereditária ou adquirida) na produção de insulina e/ou por uma resistência periférica à ação da insulina. Este fato resulta num aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea, o que pode danificar muitos dos sistemas e tecidos (ABDALA, 2016).

Estudos realizados por Choi et al. (2011) investigaram os efeitos da Artepilina C, presente na própolis, na diferenciação de adipócitos e regulação da glicose em Adipócitos 3T3-L1. Os dados revelaram que a artepilina C estimula a diferenciação de adipócitos e melhora o transporte de glicose nos adipócitos, induzindo a expressão e translocação de GLUT1 e vesículas GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 como um ligando PPAR γ . A artepilina C também reverteu a efeitos inibitórios do TNF- α na diferenciação de adipócitos.

2.4.6 Atividade antiprotozoária

A própolis mostrou-se ativa contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas spp.* e *Giardia lamblia* (Dantas et al., 2006). Testes in vitro com extratos de própolis foram realizados contra *Trypanosoma cruzi* e mostraram atividade contra as formas epimastigotas desse parasita, sendo uma possível alternativa para o tratamento da Doença de Chagas (Prytyk et al., 2003). UNICAMP (2006) estudaram a atividade da própolis brasileira no tratamento da leishmaniose observando ser eficaz em culturas de macrófagos infectados, baseado nesse e em outros estudos requisitaram patente para um método de tratamento para leishmaniose com própolis brasileira. Mais tarde outros estudos realizados com própolis vermelha, oriunda do nordeste do

Brasil, mostrou ser ativo contra leishimania sem ser tóxico para os macrófagos (Ayres et al., 2007).

2.4.7 Atividade antibacteriana

O surgimento cada vez maior de bactérias resistentes a antimicrobianos comerciais tem levado à busca por substâncias naturais eficientes na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, de humanos e organismos marinhos e as algas são possíveis fontes de componentes farmacológicos (MAGALLANES et al., 2003).

Aga et al. (1994) determinaram os compostos prenilados como os maiores constituintes da própolis brasileira e relatam que a atividade antibacteriana destes compostos pode tornar-se maior com o aumento do número de resíduos prenil na molécula.

Alguns estudos mostram que algumas bactérias são sensíveis à própolis, são elas: *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* e *Providencia stuartii*. (KUJUMGIEV et al., 1993; MIRZOEVA et al., 1997; STEPANOVIC et al., 2003; UGUR; ARSLAN, 2004; RIGHI et al., 2011).

Bispo Junior et al. (2012) observaram efeito inibitório da própolis vermelha, em baixas concentrações, frente a *Staphylococcus coagulase negativa*; na concentração de 1%, o extrato etanólico da própolis vermelha foi eficiente para *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* e *Shigela flexneri*.

2.4.8 Atividade antifúngica

São atribuídos à própolis também efeitos fungicidas e fungistáticos, sendo o efeito fungicida relacionado ao composto pinocembrina (METZNER; SCHNEIDEWIND; FRIEDRICH, 1977). Age contra dermatófitos (CIZMÁRIK; TRUPL, 1976) e inibe a produção da ocratoxina produzida por *Aspergillus sulphureus* (BURDOCK, 1998).

Diante do que foi dito por Bezerra (2015), vários estudos têm comprovado a ação da própolis sobre leveduras, em especial sobre *Candida albicans* (VARGAS; ARNDT, 2014; Bezerra, 2015).

Fernandes *et al.* (2007) avaliaram o efeito inibitório de extrato de própolis contra o crescimento do fungo *Cryptococcus neoformans*, considerando-o como fungicida.

2.4.9 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória também é característica da Própolis Vermelha de Alagoas e estudos apontam que essa característica está ligada aos flavonoides e esses compostos podem inibir a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase, dessa forma inibindo o processo inflamatório (NETTO *et al.*, 2013). Bueno-Silva *et al.* (2013) e Silva *et al.* (2017) demonstraram essa ação da PVA em sua pesquisa, pois demonstrou atividade inibitória contra a migração de neutrófilos. É importante notar que o extrato de própolis é tão efetivo quanto o padrão-ouro dexametasona a 10 mg/kg na prevenção da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, demonstrando que possui um notável potencial anti-inflamatório que deve ser explorado no futuro.

Um dos mecanismos de ação deste produto na inflamação pode relacionar-se com a inibição da enzima hidrofolato-redutase, possivelmente mediante o ácido cafeico da própolis (FRANCO, 2011).

Pereira *et al.* (2015), falam que a própolis possui propriedades anti-inflamatórias, as quais atuam contra doenças do sistema muscular articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções. As substâncias ácido salicílico, apigenina, ácido felúrico e galangina foram identificadas na própolis e são capazes de inibir a inflamação.

A própolis e o mel também são usados, em muitos países, para o tratamento de infecções das vias aéreas. Em modelos *in vitro*, extratos de própolis inibiram a agregação plaquetária e a síntese de eicosanóides, sugerindo propriedades anti-inflamatórias (Khayyal *et al.*, 1993; Paulino *et al.*, 2003).

Tani *et al.* (2010), investigaram pacientes com rinite alérgica e propuseram que o extrato de própolis induz a supressão da liberação de leucotrienos de leucócitos periféricos. Os eicosanóides são metabólitos do ácido aracdônico,

fosfolípido das membranas celulares, que são liberados através da ação de certas enzimas. As enzimas ciclooxigenases dão origem as prostaglandinas e tromboxanos e as enzimas lipoxigenases dão origem aos leucotrienos. Os eicosanóides se unem aos receptores de vários tipos celulares e podem mediar virtualmente cada passo da inflamação (ROBBINS; COTRAN, 2005).

2.4.10 Atividade imunomodulatória

A própolis atua como dessensibilizante nas alergias, tanto respiratória como dermatológicas e digestórias. (FERRO, 2006).

Conte (2017), aponta que a própolis pode induzir aumento na atividade antimicrobiana de macrófagos contra *Paracoccidioides brasiliensis*, contra *Samonella Typhimurium*, de monócitos contra *Candida albicans*, e células dendríticas contra *Streptococcus mutans*. Além de apresentar outras atividades sobre o sistema imunológico, sendo capaz de modular os eventos iniciais da resposta imune, induzindo a expressão de moléculas importantes no desenvolvimento da resposta imunológica, como os receptores semelhante a Toll (TLR)-2 e TLR-4, a molécula co-estimulatória CD80 e citocinas pró e anti-inflamatórias, modulando vias do sistema complemento, ativando o fator de transcrição NF-κB, bem como aumentando a produção de anticorpos.

Fischer et al. (2008), diz que a função imunomoduladora da própolis foi evidenciada por diversos autores que adicionaram a própolis a vacinas inativadas de herpesvírus bovino tipo 5 BoHV-5 visando avaliar seu efeito adjuvante. Foi observado que os bovinos que receberam vacina com própolis apresentaram níveis significativamente mais elevados de anticorpos em relação ao grupo controle sem própolis. Ocorreu a resposta imune celular nos camundongos que receberam a vacina com a própolis e, posteriormente, verificaram incremento na resposta imune celular e humoral nos camundongos que receberam vacinas contendo extrato etanólico associado ao antígeno (SuHV-1) e hidróxido de alumínio. Outros efeitos benéficos promovidos pela própolis, ao sistema imune de camundongos foram o aumento na permeabilidade das membranas mitocondriais, aumento na atividade dos linfócitos Natural 45 Killer (NK), atividade imunossupressora, aumento no número total de linfócitos T auxiliares, dentre outros.

Estudos realizados por Volpert e Elstner (1996) afirmaram que o sistema de

enzimas mieloperoxidase e NADPH oxidase era inibido pelos extratos de própolis. Em 2008, Missima e Sforcin verificaram que a própolis tinha efeito imunomodulador, principalmente aumentando a produção de H_2O_2 por macrófagos obtidos de ratos. A destruição de microrganismos pela fagocitose nas células depende em grande parte por mecanismos dependentes de Oxigênio. Nos lisossomos de neutrófilos e macrófagos através do sistema da enzima NADPH oxidase gera-se H_2O_2 e na presença do Cl^- e da enzima mieloperoxidase, converte-se o H_2O_2 em hipocloreto (HOCl), potente agente antimicrobiano agindo pela halogenação (ROBBINS; COTRAN, 2005).

2.5 Extração de compostos voláteis

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis em sua maioria, mono e sesquiterpenos. Geralmente, odoríferos e líquidos em temperatura ambiente, são responsáveis pela interação entre os vegetais e o meio no qual habitam, desempenhando funções como atração de polinizadores, proteção da planta contra altas temperaturas, dentre outras (SAITO; SCRAMIN, 2000). A obtenção desses óleos a partir de matérias primas de origem vegetal é uma atividade de grande interesse para a indústria de alimentos, perfumes, cosméticos, farmacêutica entre outras. Os compostos presentes nos óleos voláteis apresentam diversas propriedades que os tornam altamente valiosos, seja para fins medicinais, aromatizantes para alimentos, corantes ou para a fabricação de perfumes (MARTÍNEZ, 2005).

Como descrito anteriormente, a composição da própolis é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da ecoflora de cada região. A quantidade e composição destes óleos essenciais podem variar tanto a nível genético e fisiológico, como também devido a fatores externos, entre os quais, condições de cultivo, colheita, condições pós-colheita e fatores ambientais (LUBBE; VERPOORTE, 2007; COSTA, 2008). Além disso, outros aspectos que podem contribuir na variação química da própolis: o tipo e tempo de extração (quente, frio ou com diferentes fontes de aquecimento) ou mesmo o tipo de solvente com a qual a própolis é extraída (PARK et al., 1998), metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida. Diversos autores comprovam que ao se modificar o tipo de extração, tempo ou mesmo o solvente,

os componentes químicos da própolis variam podendo influenciar sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007; VIEIRA, 2012).

Dentre as técnicas para extração de óleos essenciais, destaca-se a hidrodestilação, da qual encontram-se registros de 3000 a.C. (FRASER; WISH, 1997). Esta técnica laboratorial consiste no contato direto da água quente com o material a ser extraído. No entanto, essa técnica apresenta como desvantagem uma perda de voláteis relevante durante esse tipo de extração (GOMES, 2003).

Outra técnica de extração que pode ser utilizada, para a caracterização e comparação dos constituintes químicos voláteis, é o *Headspace*, que consiste no aquecimento de uma quantidade de amostra em um frasco próprio para análise, onde a amostra fica lacrada, seguido da coleta da fração volátil na parte superior do material vegetal. Este método de extração permite que o processo ocorra a temperaturas mais baixas, reduzindo a probabilidade de degradação dos componentes voláteis, assim como a não utilização de solventes orgânicos sendo empregada pequena quantidade da amostra para esse tipo de análise (SOARES; COSTA, 2017).

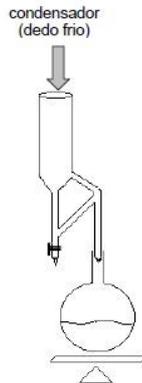
Abaixo estão descritos esses métodos de extração que foram utilizados no estudo deste trabalho.

2.5.1 Hidrodestilação

O processo de hidrodestilação resulta na extração do óleo essencial (OE), que também é chamado de óleo volátil (BURT, 2004). Os óleos essenciais são, em geral, misturas complexas de compostos orgânicos, a maioria volátil (90-95%), e são responsáveis pelas características odoríferas e flavorizantes do material vegetal (GRESSLER, 2010).

Esta técnica baseia-se no aquecimento do material vegetal em água, fazendo com que os produtos voláteis sejam arrastados juntamente com o vapor d'água por um sistema tipo Clevenger (Fig. 9) (PACHECO et al., 2008). Esses aparelhos são amplamente utilizados para esta técnica por recomendação da OMS (Organização Mundial da Saúde), devido à praticidade e ao baixo custo (WHO, 1998), sendo esse, o método mais empregado para extrair COV.

Figura 9 – Sistema de Clevenger.



Fonte: Google imagens.

Esta técnica utiliza água aquecida para promover a volatilização dos compostos voláteis e é normalmente realizado num período de 4 horas (GRESSLER, 2010). Se este for visível, seu volume é medido e coletado em frasco para posterior análise de seus compostos. Se o óleo não for visível, ou seja, caso permaneça parcialmente miscível em água, coleta-se o material e procede-se a extração com uso de funil de separação com éter etílico (PACHECO et al, 2008). No entanto, apesar da hidrodestilação ser menos dispendiosa quando comparada com as outras técnicas de destilação, o fato de haver aquecimento direto leva a ocorrência de degradações e/ou oxidações do material vegetal e consequente perda de alguns constituintes do óleo essencial (GOLMAKANI; REZAEI, 2008; FERREIRA, 2014).

2.5.2 Extração por *Headspace*

A extração por headspace (HS – headspace ou espaço confinado, que é definido como sendo constituído dos compostos voláteis contidos na fase de vapor sobre uma solução em equilíbrio, mantida em ambiente fechado) (DAMASCENO, 2007) é um método não destrutivo de extração de COV, dando um perfil mais realístico da composição volátil do material (THOLL et al., 2006). A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de determinação dos componentes voláteis na amostra a ser estudada de forma direta, ou seja, através da introdução da amostra no cromatógrafo a gás sem pré-tratamento (LOLI, 2004).

Neste processo, os constituintes voláteis da amostra são primeiramente transferidos para a forma gasosa com posterior análise por cromatografia gasosa

(GRESSLER, 2010). Esse método utiliza apenas uma pequena quantidade de massa de material para extração, não utiliza solventes e é capaz de extrair compostos voláteis de menor abundância. Essa técnica pode ser dividida em estática, dinâmica e acoplada a microextração em fase sólida (HS-SPME) (GRESSLER, 2010; THOLL et al., 2006).

No modo estático, a amostra é inserida num frasco o qual é hermeticamente selado e este frasco é inserido num forno de temperatura controlada. Neste sistema, os COV são capturados e, após o equilíbrio ser estabelecido, parte destes COV da atmosfera saturada é removida com o auxílio de uma seringa e injetada no GC para análise (GRESSLER, 2010).

O modo dinâmico é o mais utilizado para extração por headspace. O método utiliza um fluxo contínuo de um gás inerte (geralmente gás hélio) através da amostra. Os COV são capturados num adsorvente, que pode ser de vários materiais, concentrando-os. Após este processo, uma etapa de dessorção, geralmente térmica, é necessária (THOLL et al., 2006).

Já o método de extração por headspace acoplado a microextração em fase sólida (HS-SPME) utiliza uma fibra de SPME, que pode ser de vários materiais e diâmetros, para adsorver e concentrar os COV. Este método integra extração e concentração num único passo, resultando num alto desempenho analítico e menor manipulação da amostra (GRESSLER, 2010).

Embora as técnicas de headspace tenham sido recomendadas para evitar artefatos, também foram apontadas as dificuldades em obter dados quantitativos usando esse método. No entanto, é bem aceito que a técnica headspace permite a análise de um alto número de amostras em um tempo relativamente curto, aliada a procedimentos rápidos e simples de preparação de amostras e é facilmente automatizada (JORGE; TRUGO, 2003).

2.6 Identificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa é a técnica mais comum para a caracterização de compostos orgânicos voláteis, sendo um método sensível de detecção (GRESSLER, 2010).

Em razão da variedade de funções químicas presentes na mistura de compostos voláteis na própolis vermelha, o CG-EM precisa ser capaz de cobrir um largo espectro de constituintes, desde não polares a polares. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é uma ferramenta amplamente utilizada para a identificação desta variedade de compostos, pois se mostra capaz de separar e identificar compostos halogenados, sulfatados, não-halogenados e não-sulfatados (GRESSLER, 2010; HATTAB *et al.*, 2007).

A análise dos compostos voláteis é realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas disponíveis (Wiley, NBS, NIST e Mass Finder), com os da literatura e/ou por co-injeção de padrões comerciais (GRESSLER, 2010).

2.7 Reaproveitamento residual da própolis

Muitos tipos de solvente podem ser utilizados para extrair componentes de interesse da própolis, isto é, dissolver e separar a parte resinosa e balsâmica, que contém os princípios ativos, dos componentes insolúveis e com pequena ou nula atividade farmacológica, que é a parte residual, formam a chamada borra da própolis. No entanto, nem sempre, as condições de extração proporcionam um bom aproveitamento da própolis bruta, pois uma quantidade considerável dos constituintes solúveis da própolis pode ser perdida na borra após a separação do extrato líquido (MARIANO, 2014).

Segundo Brand (2015), esse residual descartado pelos apicultores como lixo incomodo é possível obter um pó de alto potencial medicinal e alimentar, pois é portador de muitas substâncias biologicamente ativas:

ARGUMENTOS

I. Ainda contém a maioria das substâncias não retiradas no processo de obtenção do extrato da própolis e outras permanecem intactas, pois são insolúveis no álcool.

II. Possui em sua massa uma quantidade apreciável de pólen.

III. A cera componente da própolis bruta não é dissolvida pelo solvente álcool etílico, portanto permanece no residual. Na literatura encontramos numerosos

trabalhos demonstrando os valores dos componentes químicos da cera das abelhas, principalmente o ácido palmítico.

IV. Junto o material recolhido pelas abelhas nas plantas as resinas (metabólicos secundários) vem agregados muitos tecidos vegetais (tricomas, células de revestimento, etc..) que tem valor biofitoterápicos e que fazem parte do residual (Borra).

V. A própolis bruta quando ingerida diretamente pelos animais é fracamente assimilável o que não acontece com o residual que é facilmente absorvido.

POSSÍVEIS APLICAÇÕES DO RESIDUAL

- a) Como antiviral e bacteriano.
- b) Conservação dos alimentos.
- c) Contém inúmeras substâncias necessárias a formação dos grupos prostéticos da proteína (coenzima). Importantes no metabolismo animal.
- d) Medicamento barato que podem fazer parte das rações de animais (mantém a sanidade principalmente dos animais em confinamento).
- e) Reduzir a poluição ambiental (exemplo: neutraliza a dioxina, um poluente encontrado em águas das cidades industrializadas).
- f) Contém fitoalexinas, plataformas químicas para a formação de hormônios vegetais (fitohormônios).
- g) Tem na sua composição inúmeros microelementos, de alto valor nas dietas alimentares de animais e humanos.

DIFICULDADES

- a) Obtenção do produto da matéria prima (borra), o residual é normalmente descartado, pois o seu valor é desconhecido e como tal não é comercializado.
- b) A dificuldade técnica da transformação do residual em pó seco para que possa ser aplicado. Do residual deve ser retirado o álcool remanescente, seco e fragmentado até se tornar pó para que possa ser misturado a ração animal ou mesmo humana.
- c) Cultural: dificuldade ou desconhecimento dos apicultores em aplicar técnicas ou cuidados para obter própolis bruta higienicamente e sem impurezas.

d) Pesquisas: embora o Brasil seja o país campeão mundial de diversidades de própolis (tanto de *Apis* como de abelhas sem ferrão) o número de pesquisas é reduzido, principalmente nas suas aplicações práticas.

Com base no exposto, faz-se necessário que aumente o interesse de pesquisa, por parte dos produtores, pesquisadores e indústrias apícolas, dessa fração residual, visto que, ao final da produção dos extratos de própolis a borra normalmente é descartada podendo ainda apresentar um grande potencial farmacológico e alimentar e ser utilizada na produção de produtos inovadores como nutracêuticos e dermocosméticos.

3. OBEJTIVO

3.1 Objetivo geral

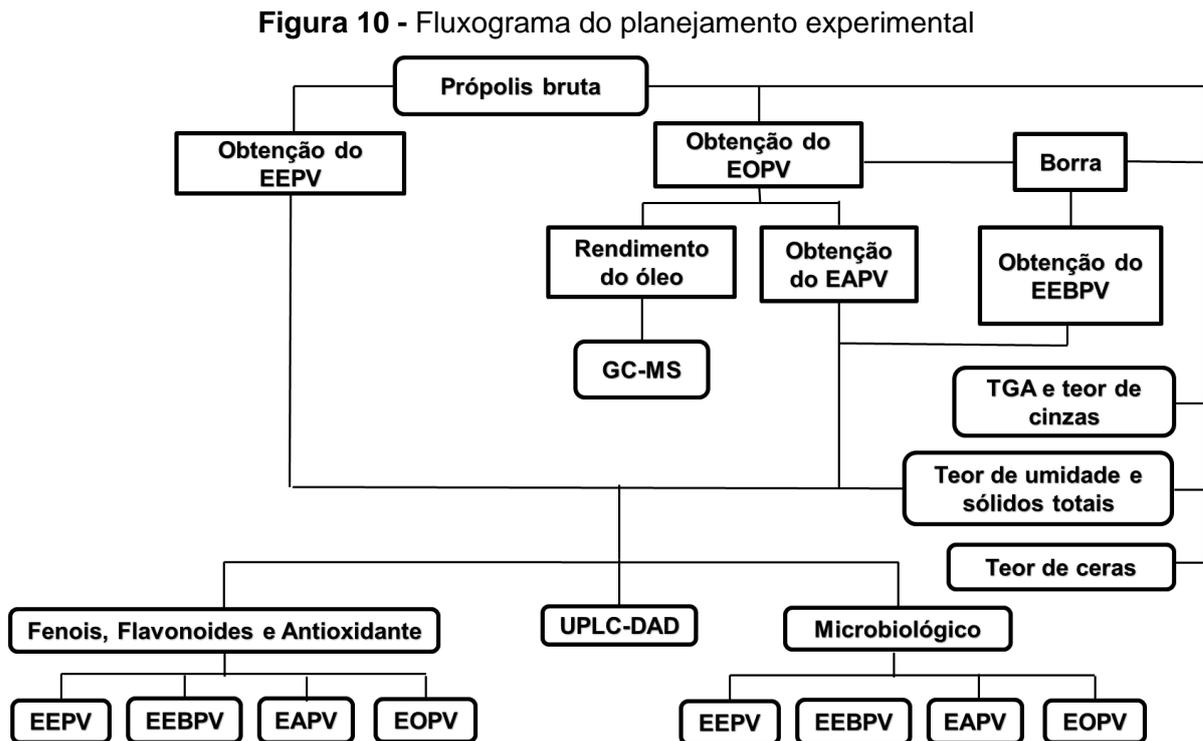
Extrair o óleo essencial da própolis vermelha de Alagoas (PVA), preparar extratos etanólicos e aquoso dessa própolis, realizando suas caracterizações físico-químicas, fitoquímicas, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato oleoso de própolis vermelha (OEPV);
- Preparar o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV);
- Obter o extrato aquoso da própolis vermelha (EAPV) e o extrato etanólico da borra de própolis (EEBPV);
- Caracterizar físico-quimicamente o EEPV, EEBPV, EAPV e o OEPV;
- Analisar a estabilidade térmica da PVA por TGA e determinar seu teor de cinzas;
- Avaliar atividade antioxidante do EEPV, EEBPV, EAPV e OEPV, através da técnica de DDPH;
- Quantificar a concentração de fenóis e flavonoides do EEPV, EEBPV, EAPV e OEPV;
- Avaliar atividade antibacteriana do EEPV, EEBPV, EAPV e OEPV;
- Caracterizar o OEPV através de CG-EM
- Extrair por HS-SPME os compostos voláteis da própolis vermelha;
- Caracterizar o EEPV, EEBPV e EAPV em UPLC-DAD.

4. METODOLOGIA

O fluxograma do planejamento experimental desse estudo pode ser observado abaixo na Figura 10:



Fonte: Autora, 2019.

4.1 Caracterização da área de estudo: Marechal Deodoro

A matéria-prima vermelha da própolis obtida do apiário Primavera na cidade de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas, Brasil, com coordenadas geográficas de latitude sul: 9° 42.258', latitude oeste: 35° 54.391' e altura de 35,5 metros acima do nível do mar.

4.2 Coleta e armazenamento da PVA

A amostra de própolis vermelha (500g) foi obtida dos apiários localizados na região de mangue do município de Marechal Deodoro-AL, sendo coletada no mês de dezembro de 2018, acondicionada em saco plástico opaco, hermeticamente fechado e conservado sob refrigeração (entre -10 e -5°C) até o momento das análises, visando evitar perdas dos constituintes voláteis.

4.3 Extração dos compostos orgânicos voláteis (COV)

Foram pesados 100g de própolis vermelha bruta, triturada e adicionada a um balão de fundo redondo contendo 1L de água destilada, sendo submetida a destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger por um período de 5 horas (GRESSLER, 2010) (Fig. 11).

Figura 11 – Aparelho de Clevenger.



Fonte: Autora, 2019.

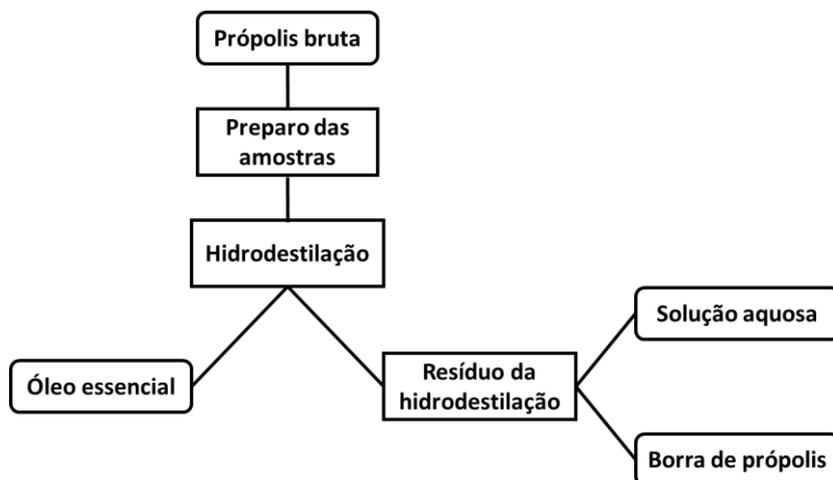
Com o processo de hidrodestilação, foi obtido o óleo essencial, que em seguida foi tratado com sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual. O óleo, no final do processo, foi armazenado em vial âmbar para posterior análise.

A fim de se obter uma análise qualitativa do óleo da própolis vermelha, 1 μ L do óleo obtido foi injetado no CG-EM modelo SHIMADZU GC-2010 com as seguintes condições cromatográficas: coluna do tipo capilar Rtx-5 (ligação cruzada 5% Difênolo/95% Dimetil polissiloxano) 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno; temperatura do injetador de 150°C e do detector de 280°C; programação da temperatura do forno de 75°C a 200°C (6°C/min); volume de injeção de 1,0 μ L; split de 1:10; gás de arraste He, a um fluxo constante de 0,5 mL/min. O modo de ionização utilizado foi impacto eletrônico (70 eV) (SOUSA et al., 2006).

A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação dos espectros de massas de compostos de referência das bibliotecas NIST11.lib (National Institute of Standards and Technology) disponível no equipamento.

A partir do óleo essencial obtido nessa hidrodestilação, preparou-se uma solução estoque na concentração de 8 mg/mL, armazenando-a sob refrigeração para análises posteriores. Afim de se reaproveitar todo o material, a própolis remanescente, após a hidrodestilação, foi filtrada e tanto a fração aquosa como a borra de própolis, foram armazenadas sob refrigeração para realização dos estudos. A figura 12 mostra o fluxograma da obtenção dos óleos essenciais.

Figura 12 – Fluxograma da obtenção dos óleos essenciais.



Fonte: Autora, 2019.

4.4 Rendimento do COV

O resíduo orgânico (óleo essencial) foi pesado obtendo a massa para o cálculo do seu rendimento conforme equação 1 (COSTA et al., 2017):

Equação 1

$$\%RO_u = \frac{M}{B_m}$$

Onde:

%RO_u = rendimento do óleo

M = massa do óleo extraída (mL)

B_m = biomassa vegetal (g)

4.5 Extração por Headspace

A análise foi realizada pelo método HS-SPME no sistema GC-MS (Shimadzu), composto pelo GC2010 cromatógrafo a gás e quadripolo QP2010S espectrômetro de massa, de acordo com KAŠKONIENĚ e colaboradores (2014) tendo algumas modificações.

Uma alíquota da amostra do óleo de própolis vermelha foi adicionada a ampola de 10 mL, selado imediatamente com septo de silicone e em seguida foi submetida a aquecimento até a temperatura de 40°C permanecendo por 10 minutos, a fim de garantir o equilíbrio dos compostos voláteis na ampola.

Posteriormente, acoplou-se a fibra de SPME a ampola que continha o OEPV deixando-a exposta durante 1 hora, a fim de capturar os compostos voláteis por adsorção. Passado o tempo, a alíquota da fase gasosa acima da amostra em estudo foi injetada no injetor do cromatógrafo a gás (CG-EM). Foram definidas as seguintes condições do equipamento para análise: coluna ZB-5HT (15 metros de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno), temperatura de incubação 40°C, tempo de incubação 10 min., a temperatura do injetor foi mantida em 250°C. O gradiente de temperatura do forno começou a 50°C por 3 min e depois aumentada para 310°C a 2°C min⁻¹. O gás hélio foi usado como gás de arraste com uma vazão constante de 3,0 mL min⁻¹. A identificação dos compostos foi realizada de acordo com seus espectros de massa.

4.6 Preparo dos extratos de PVA

Para este estudo, foram preparados três extratos para as análises experimentais.

4.6.1 Extrato etanólico da própolis vermelha bruta

A própolis bruta foi limpa, retirando qualquer impureza, cortada em pequenos pedaços, pesada em balança analítica à quantidade correspondente de 30g do material.

A amostra foi submetida ao processo de maceração com álcool de cereais (100mL) a temperatura ambiente, com troca do solvente de 24 em 24 horas durante 5 dias.

O material foi filtrado e rotaevaporado a 65°C para evaporação do solvente obtendo-se como produto final, o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV). Em seguida foi acondicionado sob refrigeração em recipientes de vidro protegido da luz e devidamente identificados para conservação dos constituintes da própolis e posterior análises.

4.6.2 Extrato etanólico da borra de própolis vermelha

Após a hidrodestilação, a borra da própolis (Fig. 13) foi seca em estufa a 30°C durante 3 horas, afim de eliminar a maior parte da umidade.

O extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) foi obtido a partir da borra de própolis seca e o preparo do extrato foi realizado conforme a metodologia anterior.

Figura 13 – Borra de própolis vermelha seca após hidrodestilação.



Fonte: Autora, 2019.

4.6.3 Extrato aquoso da própolis vermelha

O EAPV foi obtido pela decocção da própolis bruta em aparelho de Clevenger, no qual, ao término do procedimento, o material foi filtrado e armazenado sob refrigeração.

4.7 Teor de umidade

A determinação da perda por dessecação foi realizada por meio de balança eletrônica de umidade com secador infravermelho Shimadzu MOC-120H®, utilizando o método gravimétrico.

Pesou-se cerca de 1g das amostras sólidas e 1mL dos extratos, tomando-se o cuidado de distribuir o material de maneira uniforme pelo prato da balança. Definiu-se a temperatura de secagem de 105°C por tempo suficiente para que o material fosse completamente seco até massa constante.

O teor de umidade foi calculado pela relação do volume de água obtido em função da massa de amostragem e os resultados foram obtidos a partir dos valores médios de três determinações. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.8 Análise termogravimétrica (TGA) e teor de cinzas

A análise termogravimétrica e o teor de cinzas da própolis vermelha bruta (PVB) e da cera residual de própolis vermelha (CRPV) foi determinado em equipamento Shimadzu TGA-50® afim de avaliar e correlacionar suas perdas de massa. Usou-se um cadinho de platina, atmosfera de nitrogênio, com vazão de 20 mL/min, entre as bandas de temperatura de 25 a 900°C, com taxas de aquecimento de 10°C/min. A massa inicial das amostras analisadas foram aproximadamente 5 mg.

4.9 Teor de ceras

A metodologia foi realizada com algumas modificações, de acordo com BRUSCHI e colaboradores (2002).

Pesou-se, em balança analítica, 1g de própolis bruta triturada e colocada em frasco de vidro, acrescido de 10mL de álcool etílico. O frasco com o material foi submetido a aquecimento até ebulição do álcool por 5 minutos, repetindo o procedimento por três vezes. A fração alcoólica foi desprezada e a amostra de própolis remanescente foi seca em estufa a 80°C durante 2 horas, e submetida à nova pesagem após arrefecimento. O mesmo procedimento foi realizado com a borra de própolis vermelha.

O cálculo da porcentagem de cera foi determinado pela equação 2:

Equação 2 $\%Cera = \frac{(P_3 - P_2)}{P_1}$
--

Onde:

%Cera= percentual de cera

P₁= massa inicial da amostra (g)

P₂= peso do elermeyer (g)

P₃= peso do elermeyer + cera (g)

4.10 Quantificação de fenois totais

4.10.1 Construção da curva de calibração

A determinação do conteúdo total de fenois foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC) descrito por Woisky (1998), com algumas modificações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se ácido gálico em diferentes concentrações (2,0, 3,0, 4,0 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 µg/mL). Adicionou-se para um balão volumétrico de 5 mL, contendo 3 mL de água destilada, uma alíquota correspondente a cada concentração e 0,4 mL de RFC. Homogeneizou-se levemente por 15 segundos e no intervalo de 1 a 9 minutos, adicionou-se 0,6 mL da solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 20%. Completou-se com água destilada até o menisco e homogeneizou-se por mais 15 segundos. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis. A presença de fenóis é observada pela mudança de coloração, de esverdeado para azul. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

4.10.2 Teor de fenois totais dos extratos de PVA

A partir da solução estoque (8 mg/mL do EEPVA, 8 mg/mL da EEBPV, 8 mg/mL do EAPVA e 8 mg/mL do OEPV), diluiu-se cada extrato em balões de 5 mL com concentração final de 10 µg/mL.

Em outro balão volumétrico, adicionou-se uma alíquota de extrato, contendo 3 mL de água destilada. Em seguida, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item acima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras

foram substituídos na variável y , da equação $y = ax + b$, onde y é o valor da absorbância, a é o coeficiente linear, x é o valor da concentração de ácido gálico e b o coeficiente angular (SILVA, 2019).

O branco das amostras foi feito com uma pequena alíquota de água + RFC + etanol absoluto + Na_2CO_3 20%.

Para calcular a porcentagem de fenois totais presentes nas amostras analisadas utilizaram-se as fórmulas 3 e 4:

Equação 3	Equação 4
$C = \frac{\text{Absorbância} - A}{B}$	$\% = \frac{C}{M} \times 100$

Onde:

% = percentual de ácido gálico;

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

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

A = coeficiente linear da equação da reta;

B = coeficiente angular da equação da reta;

4.11 Quantificação de flavonoides totais

4.11.1 Construção da curva de calibração

A determinação dos flavonoides totais foi realizada de acordo com o método de cloreto de alumínio, descrito por Woisky (1998), com pequenas alterações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se quercetina em concentrações correspondentes de 4,0 até 14 $\mu\text{g/mL}$. Adicionou-se em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 3mL de metanol uma alíquota de acordo com cada concentração e 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) (5%). O volume final completado com metanol, em seguida agitou-se levemente por alguns segundos e deixou a reação acontecendo no escuro. Após o tempo de 30 minutos fez a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

4.11.2 Teor de flavonoides totais dos extratos de PVA

A partir da solução estoque (8 mg/mL do EEPVA, 8 mg/mL da EEBPV, 8 mg/mL do EAPVA e 8 mg/mL do OEPV), diluiu-se cada extrato em balões de 5 mL com concentração final de 100 µg/mL.

Em outro balão volumétrico (5 mL), adicionou-se uma alíquota de extrato contendo previamente 3 mL de metanol. Posteriormente, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item a cima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y , da equação $y = ax + b$, onde y é o valor da absorbância, a é o coeficiente linear, x é o valor da concentração de quercetina e b o coeficiente angular (SILVA, 2019).

O branco das amostras foi feito com uma pequena alíquota de metanol + $AlCl_3$.

Para calcular a porcentagem de flavonoides totais presentes nas amostras analisadas, utilizou-se as equações 3 e 4 descritas anteriormente:

Equação 3	Equação 4
$C = \frac{\text{Absorbância} - A}{B}$	$\% = \frac{C}{M} \times 100$

Onde:

% = percentual de quercetina;

C = concentração de quercetina em µg/mL;

M = Massa da amostra µg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta;

B = coeficiente angular da equação da reta;

4.12 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade sequestrante do radical DPPH foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Sales (2012), com modificações. Preparou-se uma solução 0,1 mM de radical DPPH (Sigma Aldrich) em etanol absoluto e foi armazenada em vidro âmbar. Em solução etanólica o radical DPPH tem coloração violeta, que ao entrar em contato com a amostra, reage e é sequestrado de acordo com a potência antioxidante, desbotando gradualmente a cor violeta para o tom de amarelo pálido.

Com a solução de DPPH em temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL em balões volumétricos âmbar (5 mL), em seguida adicionou-se alíquota do extrato na concentração de 1, 5, 10, 15, 25 e 50 µg/mL e completou-se com álcool absoluto até o menisco aguardando a reação no escuro durante 30 minutos. A absorvância das amostras foi obtida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm.

O branco das amostras foi feito com uma pequena alíquota de etanol absoluto + DPPH e do etanol sozinho. A porcentagem de radical DPPH• remanescente, no tempo de 30 minutos, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de DPPH}\bullet_{\text{remanescente}} = [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})] \times 100$$

Onde:

A_{amostra} = absorvância da reação entre a solução do DPPH• e a amostra antioxidante;

A_{branco} = absorvância da solução de solvente utilizado para preparar a amostra antioxidante;

A_{controle} = absorvância do DPPH• com uma pequena alíquota do solvente utilizado para preparar a amostra, em substituição à solução da própria amostra em estudo.

Após a determinação do DPPH•_{remanescente}, determinou a porcentagem de inibição do DPPH• através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}\bullet = 100 - \% \text{ DPPH}\bullet_{\text{remanescente}}$$

4.13 Identificação dos marcadores da própolis vermelha nos extratos por UPLC-DAD

A identificação dos flavonoides contidos nos extratos etanólicos e aquoso foi realizada a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com um detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD) modelo Shimadzu, descrito por Nascimento et al 2016. O UPLC consiste dos seguintes módulos: uma bomba de alta pressão (Modelo LC- 20ADXR), desgaseificador (modelo DGU-20A3R), auto-injetor (modelo SIL-20AXR), forno de coluna cromatográfica, detectores de arranjo de diodos (modelo EPDM-20A) e detector de fluorescência (RF-20A modelo), um

controlador (modelo CBM-20A) e um software Shimadzu Labsolution. A separação dos flavonoides ocorreu utilizando uma coluna de fase reversa (C 18, 150 x 4,6 mm; 5 μ m), uma fase móvel que consistiu de solvente A (água Milli-Q) e o solvente B (acetonitrila), bombeado a um caudal de 0,3 mL/min. O gradiente de eluição inicial consistiu de água (70%) e acetonitrila (30%) com uma variação da percentagem de acetonitrila a 100% em 40 min seguido de uma condição isocrática com acetonitrila (100%) até 53 minutos e retorno a condição inicial a 54 min, seguido por condições de acetonitrila isocrático (30%) até 60 min. Este método de comprimento foi desenvolvido a fim de lavar a coluna durante a análise com 100% de acetonitrila e evitar a falta de exatidão e de precisão durante a eficiência do ensaio de retenção e para evitar a incrustação coluna e a acumulação de pressão excessiva por retenção irreversível de compostos não polares (terpenos e gutiferas presentes no extrato de própolis vermelha).

As identificações dos flavonoides foram feitas pela comparação dos espectros de ultravioleta, obtidos através do detector de arranjo de fotodiodos em diferentes comprimentos de onda (λ : 249, 281, 286, 275, 366 nm) e dos tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras.

A partir da solução estoque de 8 mg/mL de cada extrato (EEPVA, EEBPV e EAPVA), diluiu-os a fim de obter concentrações finais de 500 μ g/mL. Posteriormente, 5 μ L dessas soluções foram injetadas no UPLC-DAD, para a identificação de flavonoides nos extratos.

4.14 Atividade antimicrobiana

O ensaio de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima). As microplacas de 96 poços contendo 100 μ L/poço do caldo Mueller Hinton e 100 μ L/poço das amostras foram utilizadas de acordo com o procedimento descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Foram preparadas soluções dos extratos EEPV, EEBPV, EAPV e do OEPV na concentração de 9 mg/mL, no qual foram diluídos em água destilada, previamente esterilizada com lâmpada UV, e tween 80 a 20%. As cepas utilizadas nos testes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis*

(CCCD-S010), *Escherichia coli* (ATCC 14942) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A adição dos microrganismos às microplacas contendo o meio e as amostras foi feita de acordo com a escala McFarland de 0,5% ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Após incubação em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas, 20 µL da solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 5% foi adicionada para que a atividade antibacteriana pudesse ser visualizada após 3 horas. O crescimento bacteriano pode ser observado pela mudança de coloração sinalizando que a solução não possui efeito inibitório sobre a bactéria. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração antibacteriana que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram feitos em triplicata.

4.15 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram expressos no programa Microsoft Excel 2016 na forma de média + coeficiente de variação ($n = 3$). As curvas de linearidade foram obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde “a” corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e “b” corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada usando o coeficiente de correlação linear (R), com o critério mínimo aceitável de 0,99. Para a elaboração dos elementos gráficos, foi utilizado o Programa Excel (Pacote Office 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta, armazenamento e caracterização da PVA

A própolis apresentou aroma resinoide e balsâmico, avermelhada, sabor picante acentuado, consistência rígida à temperatura ambiente e pedaços heterogêneos.

A sua aparência pode indicar um elevado teor de resinas, o que é desejável, pois as atividades biológicas relatadas para a própolis vêm sendo atribuídas a substâncias contidas nesta fração. Ao contrário, apresentando-se maleável, pode indicar um elevado teor de cera.

A consistência à temperatura ambiente também pode dar indícios da relação resina/cera na própolis, que tem estes dois tipos de material em sua composição.

O conjunto de caracteres sensoriais observados para a própolis estudada neste trabalho possibilitou, de certa forma, presumir tratar-se de uma amostra de boa qualidade, com certo teor de cera e com grande número de compostos fenólicos.

5.2 Rendimento do óleo obtido por hidrodestilação

O óleo essencial obtido (Fig. 14) foi coletado em frasco âmbar e armazenado em freezer até o uso. O rendimento total obtido foi de aproximadamente 0,14%.

Extrações da própolis vermelha de Sergipe realizadas por Lopes et al. (2018), obtiveram um rendimento de 0,25%. Houve uma variação de 0,10 a 0,13% nos rendimentos obtidos nos estudos feitos por Cordeiro (2013) da própolis de Ipiranga. No entanto, Linares e colaboradores (2012) apresentaram um rendimento de 2% do óleo da própolis de Santa Catarina. Já Simionatto (2004), conseguiu um rendimento máximo de 3,8% do óleo de própolis coletados em três regiões do Rio Grande do Sul. Esses estudos também realizaram a hidrodestilização usando o aparelho Clevenger como técnica de extração para obtenção dos óleos de própolis, variando só a quantidade da matéria vegetal e tempo de extração.

A possível explicação para a diferença dessas variações de rendimento, além das já citadas, está na diferença da região geográfica, fauna, flora e temperatura da região, que pode ser o fator diferencial dessas variações.

Figura 14 – Óleo essencial de própolis vermelha obtido por hidrodestilação.



Fonte: Autora, 2019.

5.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis

Os constituintes dos óleos essenciais pertencem a dois grupos de metabólitos originados de rotas biossintéticas diferentes: o grupo dos terpenos, cuja rota biossintética deriva de unidades de isopreno; e o grupo dos compostos aromáticos, derivados dos fenilpropanóides e que tem como precursor o ácido chiquímico (DEWICK, 2003).

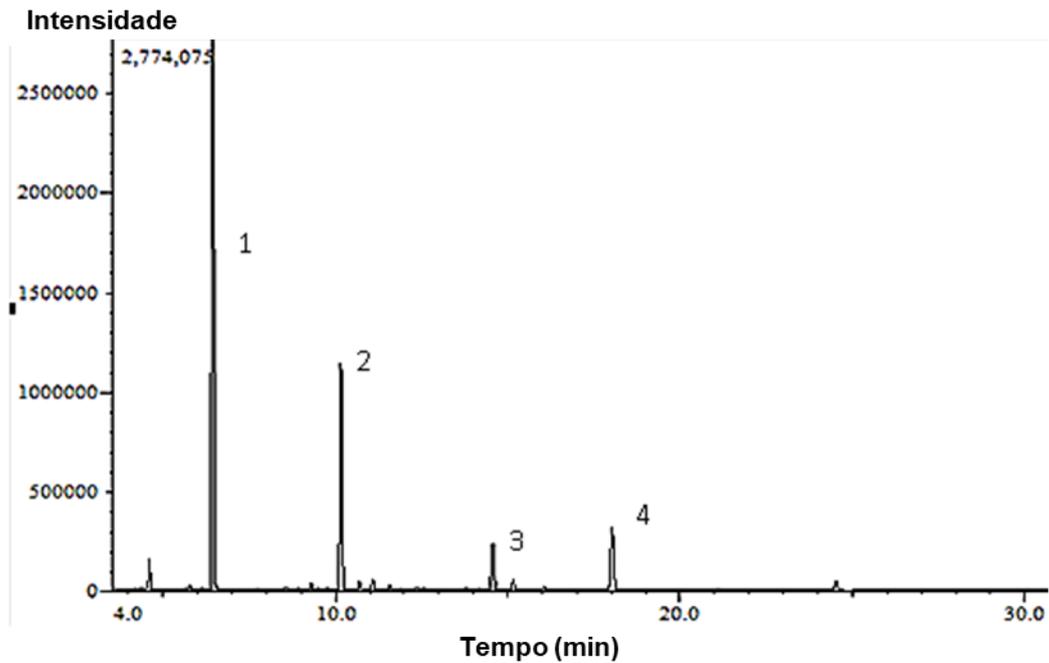
Com a finalidade de observar os perfis químicos e de obter resultados informativos sobre compostos voláteis da própolis vermelha de Alagoas, verificou-se que a mesma apresenta compostos voláteis em pequenas concentrações, salvo o composto majoritário anetol.

As figuras 15 e 16 e as tabela 2 e 3, mostram os tempos de retenção de cada pico analisado correlacionando com as respectivas áreas e os compostos identificados, no qual, o primeiro cromatograma mostra os resultados obtidos da identificação por CG-EM e o segundo os resultados da extração por HS-SPME.

A análise do óleo essencial de própolis vermelha, mostrou um perfil cromatográfico diferente quando caracterizado por técnicas diferentes, observando que o headspace conseguiu evidenciar outros compostos terpênicos e

hidrocarbonetos que não foram visualizados no CG-EM, melhorando assim a caracterização qualitativa.

Figura 15 – Cromatograma do óleo essencial de própolis vermelha obtido por CG-EM.

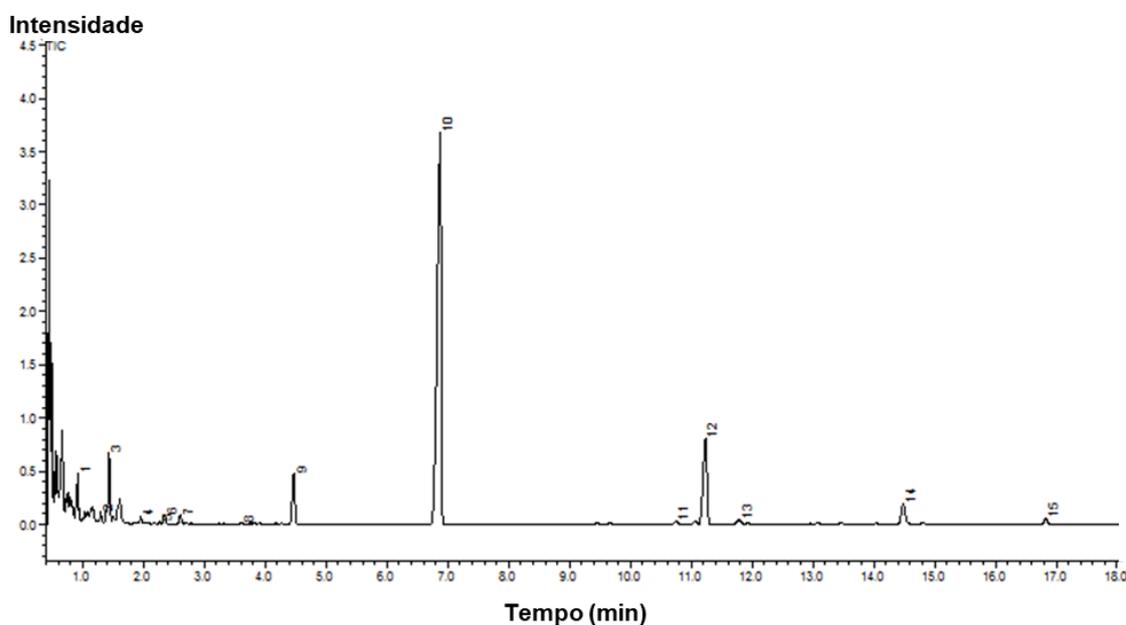


Fonte: Autora, 2019.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de própolis vermelha.

PICO	T. R.*	%AREA	NOME
1	6,440	55,60	Anetol
2	10,152	27,43	Metileugenol
3	14,572	6,60	Metiliso Eugenol
4	18,025	10,37	Elemicina

*T. R.: Tempo de retenção.

Figura 16 – Cromatograma do óleo essencial de própolis vermelha obtido por HS-SPME.

Fonte: Autora, 2019.

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial de própolis vermelha obtido por headspace

PICO	T. RET*.	%AREA	NOME
1	0.922	2.65	trans- β -Ocimene
2	1.298	0.48	1,2,3-trimetilbenzeno
3	1.435	3.39	3-Carene
4	1.956	0.35	γ -Terpineno
5	2.267	0.14	2-metilciclopropil-benzeno
6	2.341	0.70	1-metil-4-(1-metiletilideno)-ciclohexano
7	2.602	0.67	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-
8	3.604	0.11	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol
9	4.463	4.41	Estragol
10	6.874	55.65	Anetol
11	10.754	0.35	Biciclo[7.2.0]undec-4-eno, 4,11,11-trimetil-8-metileno-, [1R-(1R*,4Z,9S*)]-
12	11.229	11.25	Metileugenol

13	11.787	0.55	Biciclo[3.1.1]heptano, 6-metil-2-metileno-6-(4-metil-3-pentenil)-, [1R-(1.alpha.,5.alpha.,6.beta.)]-
14	14.484	2.71	Metilisoegenol
15	16.824	0.60	1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)- benzeno
16	53.726	4.61	2-etilhexil isohehexil ester ácido sulfúrico
17	59.984	3.31	2-metiloctacosano
18	61.601	2.52	Pentadecanal
19	61.966	1.46	1,19-Eicosadieno
20	63.799	2.21	2-etilhexil isohehexil ester ácido sulfúrico
21	66.741	1.14	1-iodo- tridecano
22	69.235	0.53	1-iodo- nonano
23	70.268	0.21	(2-indanil)(4-morfolil)-metanone

*T. Ret.: Tempo de retenção.

Pelos resultados, evidencia-se uma composição química em voláteis bem variada, destacando-se como constituintes majoritários do óleo essencial de própolis vermelha, em ambas as análises, o anetol e metileugenol. O anetol, bem como a elemicina que foi observada na análise por CG-EM, foram apresentados em estudo realizados por Marcucci e colaboradores (2006) como componentes majoritários de uma amostra de própolis vermelha de Maceió-Alagoas, corroborando com o resultado encontrado nesse estudo.

Existem vários relatos na literatura sobre estudos realizados com óleo de própolis de diversas localidades. Em especial, Nunes et al. (2009), traçaram um perfil fitoquímico e identificaram diversos compostos fenólicos no óleo de própolis vermelha oriunda do estado de Pernambuco, no qual também observou a presença de compostos monoterpênicos, sesquiterpênicos, hidrocarbonetos alifáticos e fenilpropanóides, como o anetol, tendo-o como composto majoritário.

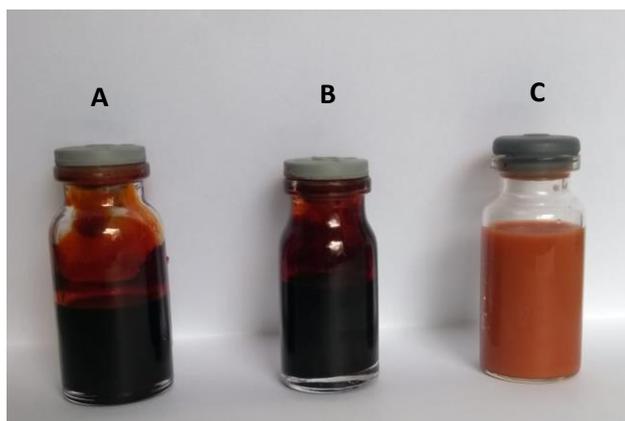
Esses compostos, juntamente com fenilpropanóides, são responsáveis por diversas atividades farmacológicas, com destaque para o anetol, o qual apresenta atividades comprovadas, tais como: analgésica, anestésica, antígenotóxica, antioxidante, dentre outras (NIRMALA et al, 2005). Este se mostrou ainda como

sendo o principal constituinte do óleo essencial de Anis (*Pimpinella anisum*), dotado de atividade inseticida e antifúngica (NUNES et al., 2009). Essas e outras atividades atribuídas aos demais constituintes indicam um bom potencial farmacológico para a própolis em estudo.

5.4 Extratos obtidos por maceração e decocção

Os extratos etanólicos da própolis bruta e da borra de própolis e o extrato aquoso (Fig. 17) foram obtidos com êxito, apresentando características organolépticas condizente com a própolis bruta, como coloração avermelhada e aroma balsâmico.

Figura 17 – EEPV (A), EEBPV (B) e EAPV (C).



Fonte: Autora, 2019.

5.5 Teor de umidade

O teor de umidade analisado pelo método gravimétrico variou de 2,13 a 5,86% para a própolis bruta e a borra da própolis, respectivamente. A borra da própolis apresentou um valor mais elevado, devido a água presente da hidrodestilação, porém, os resultados das análises de perda por dessecação a 105°C das amostras mostraram que os parâmetros estão dentro dos limites preconizados pelo Ministério da Agricultura e Farmacopeia Brasileira, onde o valor máximo é de 8% (BRASIL, 2001).

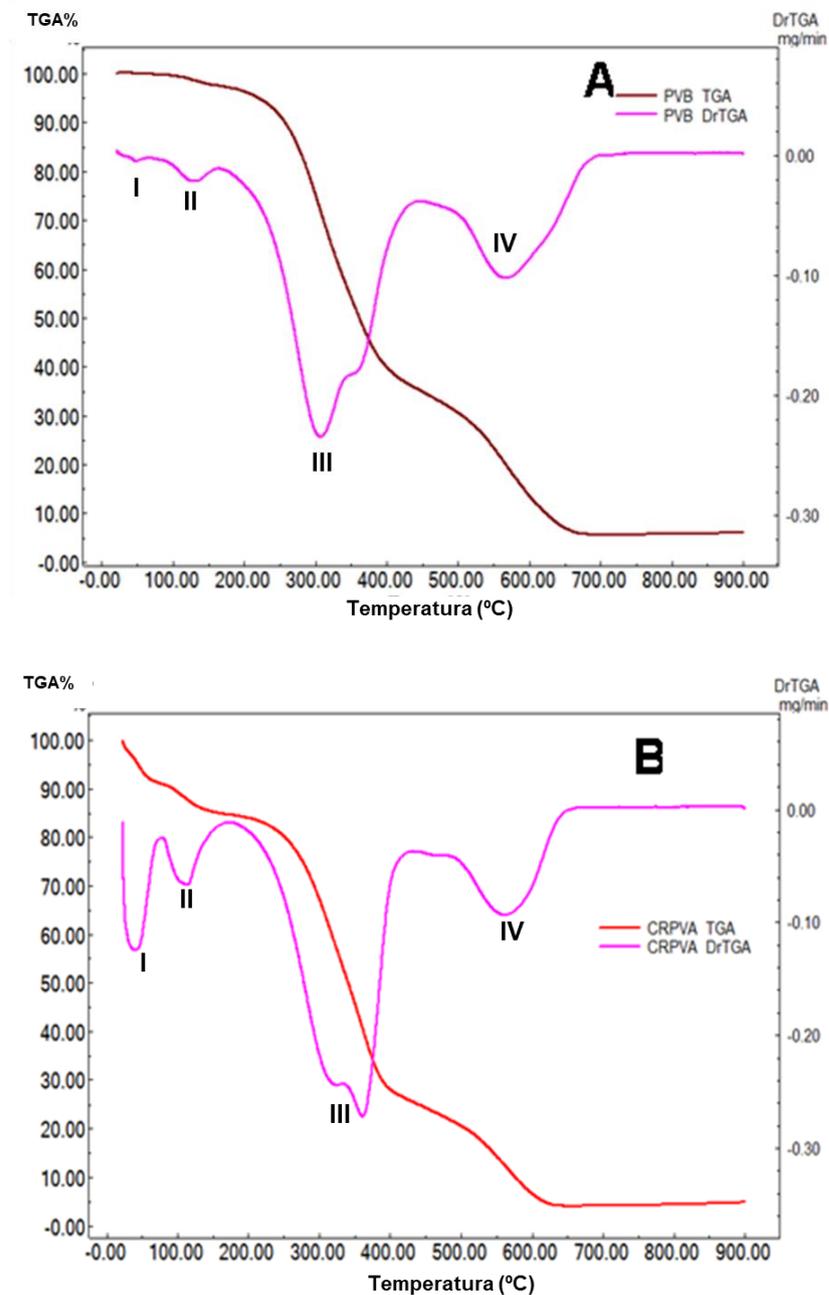
5.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A curva termogravimétrica da própolis bruta vermelha (Fig. 18 – A) mostra quatro eventos térmicos, que podem ser observados pela análise das derivadas. O evento I apresentou temperatura inicial e final de 25 e 69,85°C, respectivamente, e caracteriza a possível evaporação dos compostos voláteis (0,24 %) presentes na própolis. O segundo evento iniciou com temperatura de 69,85°C e final em 165,12°C que está relacionado com a perda de água (2,42%). O evento III se inicia na temperatura de 165,12°C e termina em 444,96°C, podendo estar relacionado com a degradação dos compostos fenólicos (62,25%). E por fim, o último evento (IV) que é marcado pela temperatura inicial de 444,96°C e final de 899,96°C indicando a total degradação da própolis vermelha e/ou o surgimento de produtos gerados durante o processo de termodegradação (29,19%).

Um perfil termogravimétrico semelhante foi observado na cera residual de própolis vermelha (Fig. 18 – B), mostrando também, quatro eventos térmicos. O evento I ocorreu na temperatura inicial de 22,69°C e final de 76,43°C, o que pode caracterizar a decomposição de produtos secundários oriundos da decocção da própolis (8,98%). O evento II aconteceu no intervalo de temperatura 76,43 – 173,66°C, que caracteriza a perda de água (6,41%). O terceiro evento iniciou na temperatura de 173,66°C e terminou em 454,70°C, que pode corresponder a degradação dos compostos fenólicos (60,74%). E o evento IV que começou na temperatura de 454,70°C e terminou em 899,96°C, com a degradação total da borra de própolis vermelha e/ou o surgimento de produtos gerados durante o processo de termodegradação (19,12%).

Ao analisar a perda de água dessas amostras e comparar os resultados com os obtidos pelo método gravimétrico (tópico anterior), pode-se ver que estes estão de acordo, pois a PVB apresentou umidade de 2,13% na perda por dessecação e de 2,42% na análise térmica e a CRPV valores de 5,86% e 6,41%, respectivamente. Essa pequena diferença pode ser explicada pelo fato da análise térmica (TGA) ser uma técnica mais precisa em relação ao método gravimétrico.

Figura 18- Curvas termogravimétricas da degradação da própolis vermelha bruta (A) e da borra de própolis vermelha (B).



Fonte: Autora, 2019.

Através dessa técnica, pode-se observar também na Figura 18 (A e B) os teores de cinzas com valor encontrado de 5,88% para própolis bruta (PB) e 4,74% para a borra de própolis vermelha (BPV). A Legislação Vigente preconiza um teor máximo de 5% (m/m) para a qualidade de própolis (BRASIL, 2001), sendo assim, esses valores se encontram dentro dos limites preconizados, já que a PB não apresentou uma variação exarcebada. Essa análise é importante para avaliar se a

própolis foi adulterada pela adição de contaminantes, como por exemplo terra ou outras impurezas, já que a ela é uma mistura complexa, contendo resinas, bálsamos, cera, além de outros.

5.7 Teor de ceras

O teor de ceras na própolis é necessário como controle de qualidade obrigatório, em função da possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas (BRUSCHI, 2006). A quantidade de cera presente na própolis bruta foi de 14,3%, enquanto que na borra de própolis foi de 10,3%. Esse menor teor para a borra da própolis, se dá pelo fato de que parte da cera pode ter sido dissolvida em água durante a hidrodestilação da própolis. Esses resultados obtidos, apresentam valores dentro da Legislação Vigente (máximo de 25%).

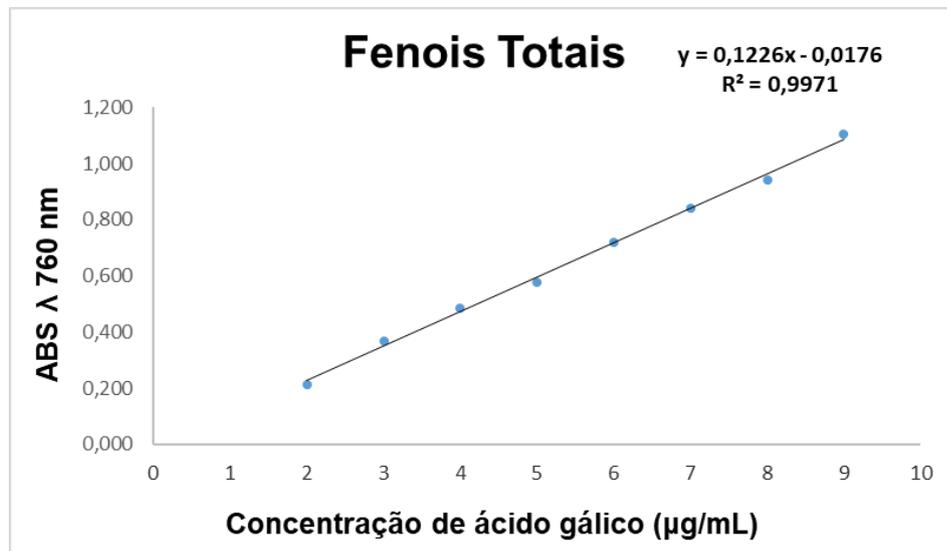
Duarte et al. (2018), encontraram teores de cera elevados analisando a própolis vermelha de Alagoas coletadas no período de fevereiro a março de 2012, com o valor correspondente de 26,36%. Já Santos e colaboradores (2015) obtiveram valores de 41,62% para própolis verde.

De acordo com Silva et al. (2006) uma maior quantidade de cera é encontrada à medida que as abelhas encontraram escassez de resina no campo, assim começaram a aumentar a proporção de cera na própolis produzida durante aquele período. Entretanto, quando encontraram novas fontes de resina, diminuíram o teor de cera na produção da própolis, fato este que acontece com colheitas final e no começo de inverno.

5.8 Curva de calibração de fenois e flavonoides totais

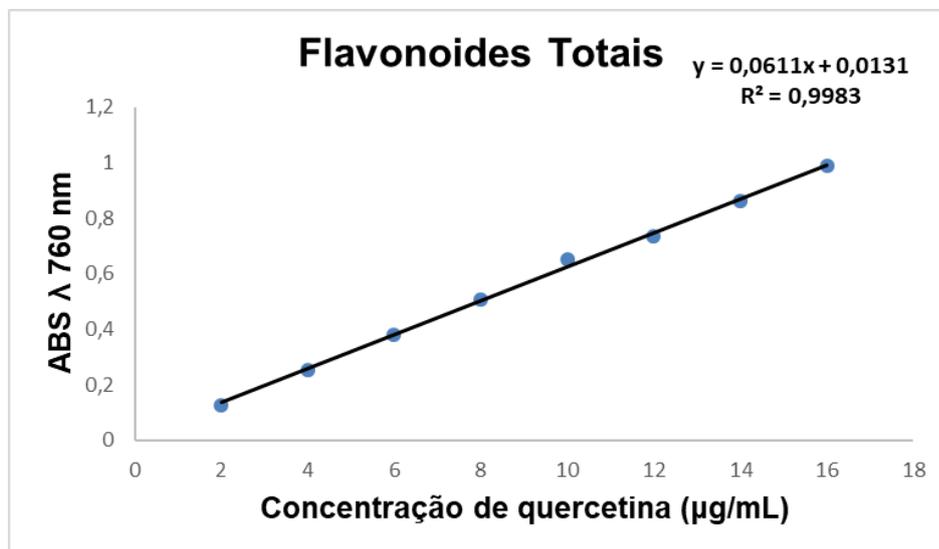
A fim de se obter os dados quantitativos do EEPV, EEBPV e do EAPV em estudo, foram construídas curvas padrões com R^2 maior que 0,99. As Figuras 19 e 20 mostradas a seguir, correspondem as curvas de calibração dos fenois e flavonoides.

Figura 19 - Curva padrão de ácido gálico para quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 20 - Curva padrão de quercetina para quantificação de flavonoides totais pelo método de $AlCl_3$.



Fonte: Autora, 2019.

5.9 Determinação de fenóis e flavonoides totais

A tabela 4 apresenta os teores de fenóis totais e flavonoides totais quantificados nas amostras do EEPV, EEBPV, EAPV e OEPV. Foram encontrados valores respectivos a 216,1, 272,93, 188,37 e 713,95 mg EAG.g⁻¹ para compostos

fenólicos e 25,3, 20,1 e 27,3 mg EQ.g⁻¹ para flavonoides totais. É interessante observar que o óleo essencial de própolis vermelha não apresentou teor de flavonoides, fato esse observado nas análises cromatográficas.

Com base nos resultados, observa-se similaridade entre os teores de fenóis totais quantificados nos extratos, bem como para os teores de flavonoides totais. Podemos inferir que, o processo de hidrodestilação, para obtenção do óleo essencial, não alterou a integridade da borra de própolis, mantendo as mesmas características químicas e físico-químicas. Essas características também foram observadas no extrato aquoso obtido pela decocção da própolis vermelha.

Os teores dos compostos fenólicos observados neste estudo, apresentou similaridade com outras análises, 416,31 mg/g (RIGHI et al., 2011), 266,8 mg/g (MOURÃO, 2013), 123,2 mg/g (SILVA, 2016), 240,32 mg/g (SILVA, 2019), corroborando com os resultados obtidos.

Já os teores de flavonoides, quando comparados aos compostos fenólicos, apresentaram um baixo percentual. Observou-se um valor de 140,2 mg/g em estudos realizados por Hatano et al. (2012). Já Dausch (2007), Righi et al., (2011), Silva (2016), obtiveram resultados de 25, 32,91, 23,8 mg/g, respectivamente, demonstrando uma variedade quantitativa de flavonoides totais.

Tabela 4 - Conteúdos totais de fenóis e flavonoides em amostras de extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV), extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV), extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e óleo essencial de própolis vermelha (OEPV).

Amostras	Métodos de ensaio	
	¹ Fenois totais	² Flavonoides totais
EEPV*	216,1 ± 4,07	25,3 ± 1,03
EEBPV*	272,93 ± 4,24	20,1 ± 4,09
EAPV*	188,37 ± 2,31	27,3 ± 4,19
OEPV*	713,95 ± 4,54	—

Média ± CV = Coeficiente de Variação

1 - mg EAG.g⁻¹ Expressos como equivalente de ácido gálico por g de própolis vermelha

2 - mg EQ.g⁻¹ Expressos como equivalente de quercetina, por g de própolis vermelha

Arruda (2019), realizou estudos de sazonalidade da própolis vermelha de Alagoas de diversos apiários localizados na cidade de Marechal Deodoro e observou que o apiário da Ilha do Porto apresentou uma concentração média de 26 mg/100mg de extrato, sendo os meses de janeiro, e fevereiro (31,8 mg/100mg), julho, agosto e setembro (34,5 mg/100mg), foram os que obtiveram uma maior concentração de flavonoides. Já os meses de março, maio e dezembro, apresentaram concentrações abaixo da média do ano (20 mg/100mg). O apiário Primavera, local em que a própolis do estudo foi coletada, demonstrou um perfil de manutenção da concentração anual (concentração média de 30 mg/100mg), variando somente os meses junho e julho, no qual apresentaram teores de flavonoides inferiores (23 mg/100mg).

Mello 2012, avaliou extratos aquosos de própolis em diferentes concentrações de pH, e observou que o extrato com pH 8,0 apresentou um aumento na concentração de flavonoides, o que corrobora com o resultado obtido do EAPV quando comparado ao EEPV e EEBPV.

Essas variações dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais da própolis brasileira, ocorre devido as mudanças climáticas, de localização geográfica e origem botânica, o que acaba influenciando na formação de um produto natural de composição química complexa. Outros fatores como sazonalidade, as diferentes metodologias podem, muitas vezes, apresentar baixa especificidade ou seletividade durante os ensaios (MATSUDA, 2006; SILVA, 2019).

O MAPA, preconiza que o produto apícola na forma de extrato deve apresentar a título de fixação de identidade e qualidade no mínimo, 0,25 % (m/m) de flavonoides e 0,50 % (m/m) de composto fenólicos (BRASIL, 2001), o que demonstra que as amostras avaliadas neste trabalho estão condizente aos padrões estabelecidos pela legislação quanto a esses parâmetros.

5.10 Atividade antioxidante pelo método DPPH

Estudos na literatura reportam que o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) tem sido amplamente utilizado como método avaliativo da atividade antioxidante de diversos compostos, devido facilidade e rapidez (OLIVEIRA, 2015; RUFATTO, et. al., 2017). Os compostos fenólicos podem capturar o DPPH• por diferentes mecanismos: (1) doação de hidrogênio aos compostos da reação em cadeia, tornando-os

produtos finais estáveis e (2) doação de elétrons do ânion fenóxido (ArOH) para o DPPH•. A escolha dos mecanismos depende do poder redução das espécies envolvidas e do número de radicais hidroxil fenólico livres e as suas biodisponibilidades de conjugação (Fennema, 2000).

Neste trabalho, a Tabela 5 mostra os resultados da avaliação da atividade antioxidante para os extratos de própolis vermelha verificando que nas concentrações mínimas e máximas (1 µg/mL e 50 µg/mL) há um aumento significativo da atividade antioxidante desses extratos. Observa-se que os extratos EEPV e EEBPV apresentaram, respectivamente, IC₅₀ de 11,88 e 13,81 µg/mL, enquanto que o EAPV apresentou IC₅₀ de 18,81 µg/mL, ambos demonstraram concentrações aproximadas, mostrando que o processo de aquecimento não alterou as propriedades do resíduo da própolis. No entanto, o OEPV apresentou um IC₅₀ mais elevado de 64,20 µg/mL, sendo os fenóis os responsáveis por essa atividade. Outra explicação para tal fato é que a atividade antioxidante da própolis vermelha se deve à maior concentração de flavonoides presente e esses compostos não foram observados no óleo essencial dessa própolis, fato esse identificado através dos cromatogramas e na quantificação de flavonoides (tópicos 5.3 e 5.9).

Na literatura existem muitos relatos da atividade antioxidante para os flavonoides, devido à sua capacidade de reduzir a formação e eliminar os radicais livres (ARRUDA, 2019). Estudos de sazonalidade da própolis vermelha de Alagoas realizados por esse mesmo autor, apresentou atividade antioxidante com valores superiores a 80,6% na concentração de extrato de 80 µg/mL, valor superior ao utilizado nesse estudo.

Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV), extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV), extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e óleo essencial de própolis vermelha (OEPV) (% inibição do radical DPPH).

Amostras	Concentração µg/mL (%IR DPPH)						
	1	5	10	15	25	50	IC ₅₀
EEPV	—	24,09 ± 0,71	41,57 ± 0,88	59,86 ± 3,11	79,37 ± 1,80	87,60 ± 0,78	11,88
EEBPV	16,14 ± 0,18	34,56 ± 0,89	44,58 ± 0,51	58,35 ± 2,25	73,51 ± 0,89	89,65 ± 1,53	13,81
EAPV	2,88 ± 0,17	20,86 ± 1,01	28,01 ± 1,97	38,74 ± 1,50	59,51 ± 2,09	77,40 ± 1,05	18,81

OEVP	—	—	2,05 ± 0,54	11,86 ± 1,57	21,66 ± 0,87	38,94 ± 1,61	64,20
-------------	---	---	----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-------

Média ±, CV = Coeficiente de variação

IC₅₀ = Capacidade de inibir o radical DPPH em 50 % - (µg/mL)

Segundo Righi et al. (2013) os flavonoides apresentam elevado poder antioxidante, assim como outras propriedades biológicas. Já Zhag et al. (2017) e Mello e Hubinger (2012), indicam que são os fenois que contribuem para a atividade antioxidante.

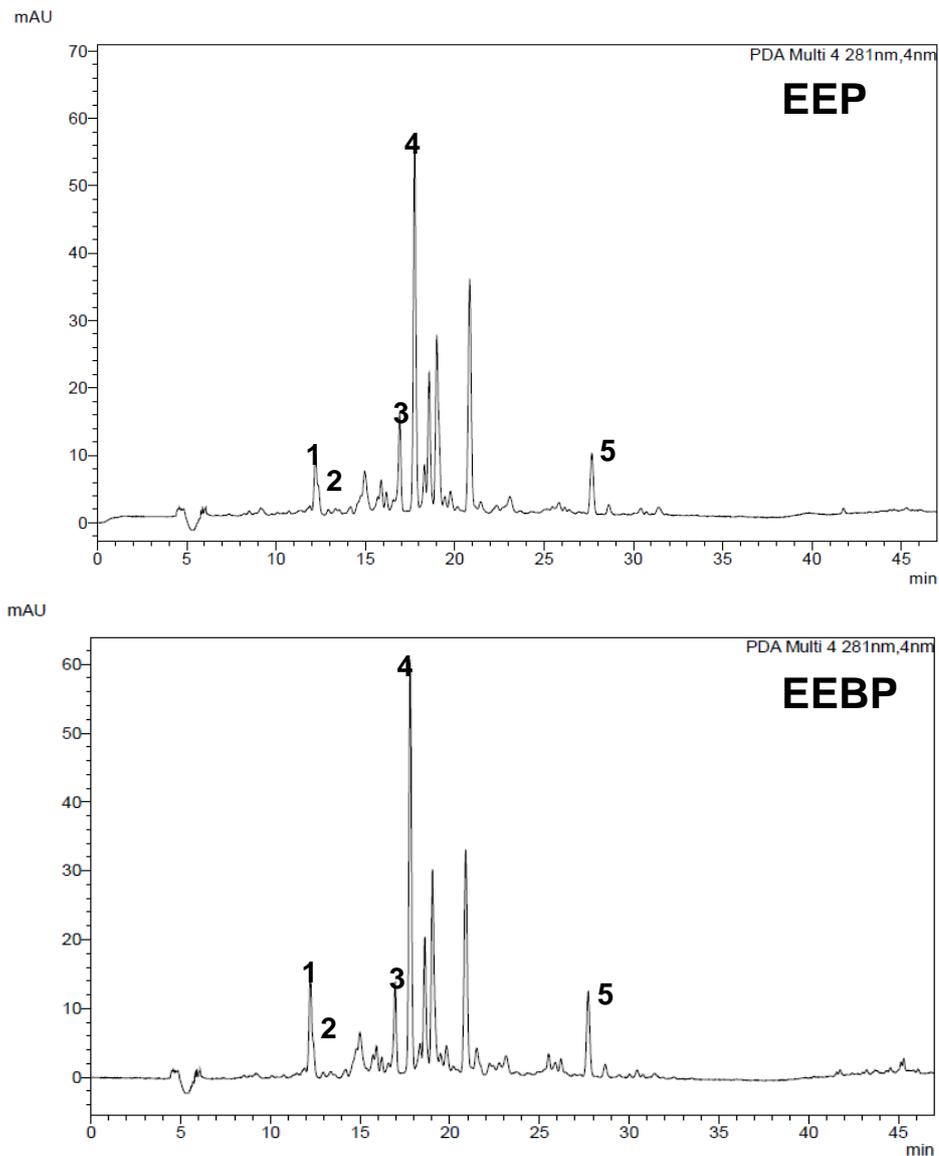
Desse modo, pode se observar na literatura uma grande variedade de constituintes da própolis, sendo este relacionado a variações nas concentrações de constituintes fenólicos e de flavonoides totais que ocorre em função de alguns fatores como: como a ecologia da flora, pelo período da coleta da resina, pela genética da abelha rainha, pela flora local e região da coleta, entre outros fatores (SILVA, 2019).

5.11 Identificação dos marcadores da própolis vermelha nos extratos por UPLC-DAD

Diferentes técnicas de espectrometria de massas para identificação da composição da própolis é importante para conseguir estabelecer uma padronização da própolis vermelha de Alagoas, pois além de ser um produto complexo, possui promissoras atividades terapêuticas e interesse na indústria alimentar e farmacêutica.

Pode-se observar na figura 21 e 22, a complexidade de compostos fenólicos com o método utilizado, presentes nos extratos etanólicos e aquoso de própolis. A Figura 20 e a Tabela 6, ilustra o perfil cromatográfico (UPLC/DAD) dos flavonoides da própolis vermelha identificado no EEPV e no EEBPV. A identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com o padrão analítico e baseada no tempo de retenção ou cromatografia, e λ máxima no espectro UV-DAD.

Figura 21 - Perfil cromatográfico dos marcadores do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) e extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) - 500 µg/mL.



Fonte: Autora, 2019.

Nos resultados obtidos, foram observados compostos majoritários da própolis vermelha, sendo estes os principais marcadores: liquiritigenina, daidzeína, isoliquiritigenina, formononetina, Biochanina A, corroborando com estudos realizados por Nascimento et al (2016) e Silva (2019). Ambos analisaram a composição do extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas, e também indentificaram estes marcadores.

Tabela 6 - Identificação dos marcadores da própolis vermelha do extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) e extrato etanólico da borra de própolis vermelha (EEBPV) por UPLC/DAD.

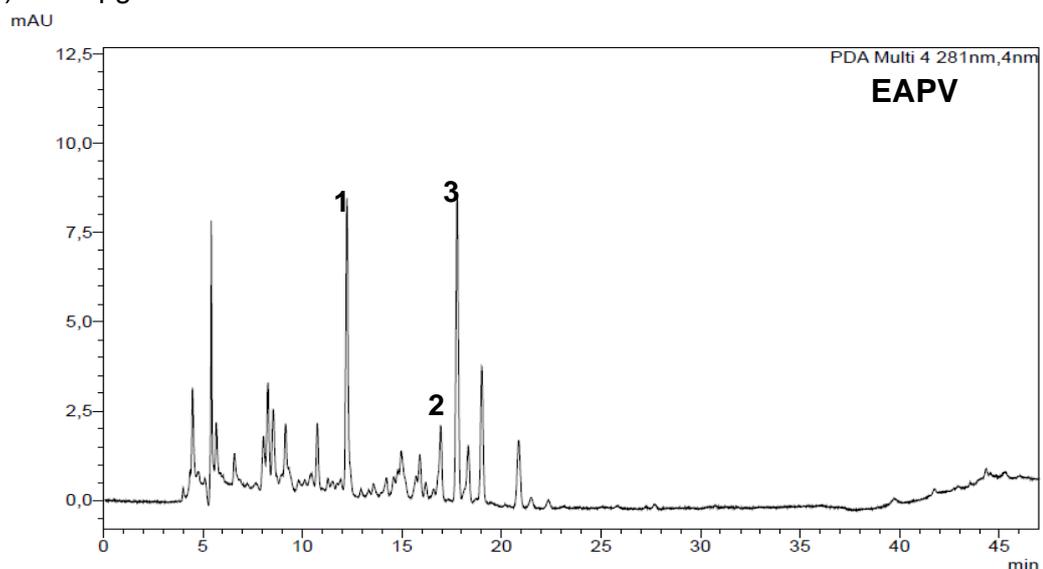
Substância	λ	Pico	EEPV 500 $\mu\text{g/mL}$			EEBPV 500 $\mu\text{g/mL}$			
			T. R. (min.)	Área	Equação da reta (P.A.)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)*	T. R. (min.)	Área	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)*
Liquiritigenina	275	1	12,22	29635	$y = 11981x - 123,45$	2,48	12,24	56977	4,76
Daidzeína	249	2	12,36	73247	$y = 14566x - 312,06$	5,05	12,39	78546	5,41
Isoliquiritigenina	366	3	16,91	88757	$y = 20466x - 539,04$	4,36	16,94	73644	3,62
Formononetina	249	4	17,80	32017	$y = 21521x - 509,24$	1,51	17,84	355233	16,53
Biochanina A	249	5	23,14	33307	$y = 39901x - 3365$	0,92	23,20	35268	0,97

λ = comprimento de onda; T. R. (min.) = Tempo de retenção; P.A. = padrão analítico; Desc. = desconhecido.

*Concentração das substâncias encontradas no EEBPV comparado com o teor encontrado no EEPV na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Para o extrato aquoso da própolis vermelha (Fig. 21 e Tabela 7), foi observado um perfil cromatográfico diferente quando comparado com os cromatogramas dos extratos etanólicos, mostrados anteriormente. Não obstante, alguns dos compostos majoritários da própolis em estudo também foram observados sem nenhuma ou pouca alteração no tempo de retenção, porém em concentrações inferiores. Esse perfil cromatográfico, também foi analisado em estudos realizados por Adelman (2005).

Figura 22 - Perfil cromatográfico dos marcadores do extrato aquoso da própolis vermelha (EAPV) - 500 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Autora, 2019.

Tabela 7 - Identificação dos marcadores da própolis vermelha do extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) por UPLC/DAD.

<i>EAPV 500 µg/mL</i>						
Substância	λ	Pico	T. Retenção	Área	Equação da reta (P.A.)	Conc. (µg/mL)*
Liquiritigenina	275	1	12,23	24364	$y = 11981x - 123,45$	2,04
Isoliquiritigenina	366	2	16,93	4961	$y = 20466x - 539,04$	0,27
Formononetina	249	3	17,79	15770	$y = 21521x - 509,24$	0,76

λ = comprimento de onda; T. R. (min.) = Tempo de retenção; P.A. = padrão analítico; Desc. = desconhecido.

*Concentração das substâncias encontradas no EAPV na concentração de 500 µg/mL.

A formononetina, a liquiritigenina, e a biochanina A foram também identificadas nas própolis da Bahia, Alagoas (DAUGSCH et al., 2008), Paraíba (MORAES, 2009) e de Sergipe (FROZZA et al., 2013). A daidzeína e a isoliquiritigenina foram relatadas por Dausch e colaboradores (2008) nesses quatro Estados. Esses compostos também foram observados nos estudos realizados por Mergulhão (2019), no qual também analisou o extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas na concentração de 400 µg. Algumas pesquisas com a própolis vermelha identificaram a formononetina como componente majoritário, esse fato só foi observado no EEBPV, que apresentou uma concentração de 16,53 µg/mL, enquanto que no EEPV e EAPV apresentaram valores de 1,51 e 0,76 µg/mL, respectivamente (RIBEIRO et al., 2015; NEVES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018).

Observa-se tanto nos extratos etanólicos com no extrato aquoso, a presença de vários compostos que não foram possíveis identificar neste trabalho, mas que foi possível observar a diversidade de compostos presentes.

Esses resultados se mostram favoráveis para o uso e reaproveitamento da própolis, em geral, por todo o processo extrativo, porém outras análises precisam ser feitas afim de determinar e comprovar quali e quantitativamente a composição desses compostos.

5.12 Atividade antibacteriana

As cepas utilizadas nos ensaios de suscetibilidade mostraram crescimento normal em meio controle contendo ágar Mueller Hinton sob as mesmas condições

dos ensaios de tratamento, sendo a ausência de crescimento das cepas bacterianas explicada pelo efeito inibitório das substâncias naturais e não devido a falhas nutricionais ou ambientais durante o cultivo. Os solventes tween 80 e água destilada, utilizados para diluição das amostras não apresentaram atividade antimicrobiana.

As concentrações inibitórias mínimas contra as bactérias estudadas podem ser observadas na tabela 8. Percebe-se que houve uma maior atividade antimicrobiana contra a cepa de *S. aureus*, no qual o EAPV apresentou uma CIM de 250 µg/mL. A atividade contra *S. epidermidis* e *E. coli* apresentaram CIM de 500 µg/mL e 1000 µg/mL para *P. aeruginosa* para esse mesmo extrato. Já os extratos EEPV, EEBPV e OEPV apresentaram valores inibitórios maiores que 1000 µg/mL para as bactérias analisadas.

Os resultados obtidos para o óleo essencial de própolis são importantes, pois demonstram seu potencial antimicrobiano mesmo que em elevada concentração quando comparado com o extrato aquoso.

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima dos extratos de própolis vermelha e do óleo essencial de própolis vermelha.

Microrganismos	EEPV	EEBPV	EAPV	OEPV
<i>Staphylococcus aureus</i>	>10 ³ µg/mL	>10 ³ µg/mL	250 µg/mL	>10 ³ µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>10 ³ µg/mL	>10 ³ µg/mL	500 µg/mL	>10 ³ µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10 ³ µg/mL	>10 ³ µg/mL	1000 µg/mL	>10 ³ µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	>10 ³ µg/mL	>10 ³ µg/mL	500 µg/mL	>10 ³ µg/mL

O potencial antimicrobiano da própolis vermelha tem sido vastamente explorado. Há relatos de CIM de 25-200 µg/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis*, 200-400 µg/mL para *P. aeruginosa* e 200-1000 µg/mL para *E. coli* (CABRAL *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; REGUEIRA NETO *et al.*, 2017; DEVEQUI-NUNES *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Mergulhão (2019) utilizando um extrato de própolis vermelha da mesma região desse estudo encontrou CIM de 500 µg/mL para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* e um valor de 1000 µg/mL para *E. coli*. É importante ressaltar que as variações de resultados podem estar relacionadas com a cepa do microrganismo utilizado, a composição química das substâncias naturais, a escolha da metodologia, etc.

Os flavonóides e compostos aromáticos supostamente atuam na estrutura das paredes celulares bacterianas Gram-positivas, mas o mecanismo dessa ação ainda é desconhecido (MARCUCCI *et al.*, 2001), esse pré-suposto explica a elevada concentração de inibição para o óleo da própolis vermelha, visto que só foi encontrado a presença de fenóis em sua composição. A estrutura da parede bacteriana Gram-negativa, que apresenta uma membrana complexa externa, atua como barreira física entre os microrganismos e o meio ambiente, impedindo interações da célula bacteriana com substâncias nocivas (KRAKER *et al.*, 2011; DEVEQUI-NUNES *et al.*, 2018).

Segundo Bueno-Silva *et al.* (2016b), o efeito sazonal altera a atividade antimicrobiana da própolis vermelha. Os autores observaram que de janeiro a maio, período caracterizado por clima tropical no Nordeste do Brasil e quando ocorrem chuvas constantes e alta umidade relativa, há maior acúmulo de compostos ativos na própolis. Em um estudo realizado por Regueira Neto *et al.* (2017), a CIM do extrato de própolis vermelha variou de acordo com o período de coleta: 64-1024 µg/mL para *S. aureus* e 128-512 µg/mL para *E. coli*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises físico-químicas obtidas seguem os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, que determinam o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis.

A composição química qualitativa e fitoquímica dos extratos de própolis mostrou-se variada quando comparada com o óleo essencial, entretanto mostrou uma composição similar entre si, sendo possível identificar os flavonoides presentes em ambos os extratos.

A extração do óleo essencial de própolis vermelha, apesar de ter apresentado um rendimento baixo, foi o suficiente para obter resultados positivos nos estudos de caracterização e de atividade farmacológica.

E a partir dos testes antibacterianos realizados verificou-se que todos os extratos e o óleo essencial apresentaram atividade contra as bactérias testadas, seguindo o mesmo comportamento observado por outros pesquisadores para os extratos de própolis.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos indicaram a viabilidade da extração do óleo de própolis vermelha por hidrodestilação, mas também a necessidade de aprimorar o processo de extração para obter rendimentos e teores maiores de extração das substâncias fenólicas bioativas em tempos menores. Também se faz necessário o estudo químico e farmacológico mais detalhado desse óleo para poder identificar substâncias responsáveis pelas atividades observadas.

Outro ponto importante para ser estudado é o extrato aquoso da própolis que foi obtido por decocção e o extrato da borra dessa própolis, que foram produtos secundários obtidos após a extração do óleo e obtiveram resultados positivos em todos os aspectos. Neste sentido, o extrato aquoso e a borra da própolis, destacam-se como subprodutos intermediários promissores capazes de serem aplicados na produção de produtos naturais como suplemento alimentar e na produção de cosméticos, uma vez que, suas propriedades foram mantidas. A borra de própolis ganha destaque especial, visto que, normalmente é descartado após os processos extrativos e sua reutilização pode favorecer a cadeia produtiva de produtos a base de própolis vermelha no estado de Alagoas.

REFERÊNCIAS

ABDALA, M. N. I. **Propriedades antioxidantes de constituintes fenólicos de macroalgas marinhas: aplicações farmacoterapêuticas**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Fernando Pessoa, 2016.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 187 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, 2005.

AGUIAR, G. R., et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas Rev. **Virtual Quim.**, v. 10, n. 1, p. 2-12, 2018.

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

ALTEC - Indicação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas: antecedentes e apropriabilidade em um sistema setorial de inovação – **ALTEC**, 2013. Disponível em <http://www.altec2013.org/programme_pdf/127.pdf>. Acesso em 16 de agosto de 2019.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

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. 94f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alagoas, 2019.

ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2014. 103f. Dissertação (Mestre em Química – Química Analítica) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal de Minas Gerais 2014.

AYRES, D. C. et al. Effects of brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.

BANKOVA, V. S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B; POPOVA, M. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chem Cent J.**, v. 2, p. 8 – 28, 2014.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**, v. 50, n. 3-4, p. 167–172, 1995.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, p. 190-193, 1999.

BANKOVA, V. et al. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands, **Phytochemistry**, v. 49, p. 1411-1415, 1998.

BANKOVA, V. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. **J Essent Oil Res.**, v. 10, p. 693-6, 1998.

BANSKOTA, A.H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1998

BEZERRA, A. M. F. et al. Red Propolis Antifungal Action on Species of *Candida* of the Oral Cavity. **International Archives of Medicine**, v. 8, n. 136, 2015.

BEZERRA, K. K. S. **Leveduras vaginais e ação antifúngica do extrato de própolis vermelha**. 2015. 57f. Dissertação (Mestre em Sistemas Agroindustriais), Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar – Universidade Federal de Campina Grande, 2015.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BRACHO, J. C. Volatile constituents of propolis. A reality concerning its enriched chemical composition. **Bol Soc Qui Peru.**, v. 66, n. 4, p. 198-209, 2000

BRAND, H. Aproveitamento do residual da própolis. **Mensagem Doce**, n. 131, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa n. 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001a. Disponível em: <<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>> Acesso em 05 de agosto de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa n. 3 – ANEXO VII– Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001b. Disponível em: <<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>> Acesso em 05 de agosto de 2019.

BRUSCHI, M. L. et al. Contribuição ao protocolo de controle de qualidade da própolis e de seus derivados. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 23, p. 289-306, 2002.

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 320 f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2006.

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

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, 2016b.

BÚFALO, M.C. et al The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1497-504, 2014.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

CARDOSO, M. N. *et al.* Avaliação de atividade mutagênica de amostras de própolis vermelha do Estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. **Scientia Plena**, v. 11, n. 1, 2015.

CARVALHO, L. G. **Avaliação do potencial biotecnológico de micro e macroalgas da flora portuguesa**. 2013. 114f. Dissertação (Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal), Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, 2013.

CHOI, S. S. *et al.* Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 925–933, 2011.

CIZMÁRIK, J.; TRUPL, J. Effects of propolis on dermatophytic fungi. **Die Pharmazie**, v.31, n.1, p.55, 1976.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.

CONTE, F. L. **Ação imunomoduladora da própolis na apresentação antigênica**. 2017. 87f. Dissertação (Mestre em Biologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2017.

CONTI, B.J. *et al.* Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF- κ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1604-1612, 2016.

CORDEIRO, A. R. **Estudo químico da própolis dos Campos Gerais do Paraná**. 2013. 81f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

COSTA, A. S. *et al.* Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, 2014.

COSTA, O. B. et al. **Rendimento do óleo essencial de duas espécies do cerrado: *Myracrodruon urundeuva* (ALLEMÃO) e *Blepharocalyx salicifolius* (KUNT) O. Berg em diferentes horários de coleta.** 2017. Disponível em: <http://www.cnf.org.pe/secretaria_conflat/memorias/DOCUMENTO%20MESAS/MESA%204/CI%E1udio%20H.%20S.%20del%20Menezzi%202.pdf>. Acessado em 07 de janeiro de 2020.

DAMASCENO, F. C. **Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas.** 2007. 143f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

DANTAS, A. P. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 187-193, 2006.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DE-MELO, A. A. M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

DEVEQUI-NUNES, D. *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **Public Library of Science Medicine**, v.13, n.12, p.1-20, 2018.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. **Chichester**: John Wiley & Sons, 2003.

DIB, A. P. **S. Boas práticas apícolas no município de Monteiro Lobato, região serrana do Vale do Paraíba, estado de São Paulo.** 2009. 56 f. Tese (Doutora em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2009.

DUARTE, I. F. B. Análises morfológicas e físico-químicas das micropartículas da própolis vermelha de Alagoas. In: SILVA, V. C.; Silva, A. M. G. S.; Basílio, J. A. D.; Basílio Júnior, I. D. (Ed.) **Atena: Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde.** Ponta Grossa, 2018. p 19 – 28.

DUARTE, I. F. B. Desenvolvimento e caracterização de microencapsulados da própolis vermelha de Alagoas. In: SILVA, V. C.; Silva, A. M. G. S.; Basílio, J. A. D.; Basílio Júnior, I. D. (Ed.) **Atena: Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde**. Ponta Grossa, 2018. p 81 – 88.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 253-71, 2003.

FARIAS, P. M. **Extração e caracterização do extrato de palma forrageira e avaliação do potencial antioxidante em modelo de lesão gástrica induzida por etanol**. 2016. 74p. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, Brasília, 5. Ed., v. 1, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em 08 de agosto de 2019.

FENNEMA OR. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza: **Acribia**, 2000.

FERNANDES, F. F. et al. The “*in vitro*” antifungal activity evaluation of própolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Rev Inst Med Trop**, v. 49, n. 2, p. 93-95, 2007.

FERREIRA, V. U. **Avaliação do efeito antileucêmico de amostras de própolis de 4 municípios do Rio Grande do Sul**. 2014. 31f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Biotecnologia) – Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2014.

FERREIRA, A. R. A. **Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos**. 2014. 87f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernanda Pessoa, 2014.

FERRO, D. Fitoterapia: Conceitos clínicos. São Paulo, SP. (Ed) **Atheneu**, 2006. Cap 19, p 319-322.

FRANCHI JR, G. C. et al. Efeitos comparativos de extratos etanólicos de própolis brasileira em células leucêmicas humanas por teste de MTT. **Mensagem Doce**, n. 105, 2010.

FRANCO, M. A. D. O uso de própolis nas doenças respiratórias e otorrinolaringológicas em crianças. 2011. 32f. Monografia (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

FRASER, S.; WISH, J. P. M. A commercial herb industry for NSW-an infant enterprise. Australia: **Rual Industries Research and Development Corporation**, 1997. 133p.

FERRONATO, et al. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

FISCHER, S.O. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FROZZA, C. O. S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, n.1, p.137-142, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V, O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GALINDO, A. B. **Caracterização do extrato de própolis vermelha, avaliação de suas propriedades biológicas e desenvolvimento de gel à base do extrato.** 2007. 131f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

GILANI, G. S. et al. Effects of source of protein and supplementary extracted isoflavones and anthocyanins on longevity of Stroke-prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP) rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 335-41, 2009.

GOLMAKANI, M. T.; Rezaei, K. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 448-454, 2008.

GOMES, F. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido**

supercrítico (SFE). 2003. 77f. Dissertação (Mestre em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

GRESSLER, V. **Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira**. 2010. 283f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HATANO, A. et al. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Sci Technol Res.**, v. 18, p. 577-84, 2012.

HATTAB, M. E. Et al. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 1-7, 2007.

HERCULANO, E. A. **Avaliação da atividade cardiovascular de extrato seco de própolis vermelha em ratos espontaneamente hipertensos**. 2017. 92f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia, 2017.

INPI - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (Brasil). **Guia Básico - Indicação Geográfica**. Disponível em: <<https://datasebrae.com.br/ig-manguezais-de-alagoas/>>. Acesso em: 16 de agosto 2019

IVANOVSKA, N. D. et al. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n. 3, p. 135-43, 1995.

JACKMAN, K. A. et al. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 26, p. 2824-30, 2007.

JIN, U.H. et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1/2, p.132-140, 2005.

JORGE, K.; TRUGO, L. C. Discriminação de diferentes variedades de lúpulo usando dados cromatográficos de gás no espaço livre. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.3, 2003.

KAŠKONIENĖ, V.; KAŠKONAS, P.; MARUŠKA, A.; KUBILIENĖ, L. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. **Cent. Eur. J. Chem.**, v. 12, n. 6, p. 736-746, 2014.

KHAYYAL, M. T. et al. El-Ghazaly MA, El-Khatib AS 1993. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Drug Exp Clin Res** 19: 197-203.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, p. 506-515, 1998.

KOLC, C. S. M. **Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom**. 2014. 138f. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2014.

KRAKER, M. E. A. et al. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. **Public Library of Science Medicine**, v.8, n.10, p.1-7, 2011.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, v. 48, p. 785-786, 1993.

KUSUMOTO, T. et al. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. **Chem Pharm Bull.**, v. 49, n. 9, p. 1207-1209, 2001.

LI, Y. X. et al. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2219-2224, 2011.

LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: **São Sebastião Editora e Gráfica**. 2006

LINARES, C. E. B. et al. **Composição química e atividade antibacteriana de óleo de própolis do Sul do Brasil**. In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves.

LOLI, L. M. **Estudo comparativo das técnicas de headspace estático e microextração em fase sólida na análise de resíduos de incêndio**. 2004. 29f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 17, n. 3, 2007.

LOPES, A. S. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.

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

LOPEZ, B. G. C. **Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2014. 117f. Dissertação (Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde) – Universidade Estadual de Campinas, 2014.

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.1, p.677-687, 2015.

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

MACHADO, B. A. S. et al. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC**, v. 2, n. 3, p.221-235, 2012.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Public Library of Science**, v.11, n.1, p.1-26, 2016.

MAGALLANES, C. et al. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Revista peruana de biología**, v. 10, n. 2, p. 125- 132, 2003.

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE PRÓPOLEOS, 2000. Argentina. Disponível em: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>. Acesso em: 10 de agosto de 2019.

MARCUCCI, M.C., et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, p. 105-112, 2001.

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

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, n. 46, 1998.

MARCUCCI, M. C. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis, Advance Access Publication. **eCAM 3**: 249-254,2006.

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

MARONGIU, B. et al. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 10022-10027, 2007.

MARTIN, D. et al. Understanding the cardiovascular actions of soy isoflavones: potential novel targets for antihypertensive drug development. **Cardiovascular Hematol Disord Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 297-312, 2008.

MARTÍNEZ, J. **Extração de Óleos Voláteis e Outros Compostos com CO₂ Supercrítico: Desenvolvimento de uma Metodologia de Aumento de Escala a partir da Modelagem Matemática do Processo e Avaliação dos Extratos Obtidos**. 2005. 190f. Tese (Doutorado – Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual. Campinas, 2005.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e controle de qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006. 139f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2006.

MATSUNO, T. et al. Antitumor benzopyran derivative of propolis. **Chemical Abstracts**, v. 127, p. 39814, 1997.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 50c, p. 93-97, 1995.

MELLO, B. C. B. S. **Extração de própolis em meio aquoso e concentração dos extratos por nanofiltração**. 2012. 183f. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 2012.

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

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq Inst Biol**, v. 72, p. 405-411, 2005.

METZNER, J.; SCHNEIDEWIND, E. M.; FRIEDERICH, E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. **Die Pharmazie**, v. 32, n. 11, p. 730-732, 1977.

MERGULHÃO, N. L. O. N. **Obtenção e Caracterização de Micropartículas de Própolis Vermelha Combinadas ao Óleo Essencial de Hortelã-pimenta**. 2019. 103f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, 2019.

MIRZOEVA, O. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res**, v. 152, p. 239-246, 1997.

MISSIMA, F.; Sforcin, J. M. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 1, p. 71-75, 2008.

MITAMURA, T. et al. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice. **Anticancer Research**, v. 16, p. 2669-2672, 1996.

MORAES, C. S. **Isolamento e Identificação de Formononetina da Própolis de João Pessoa-PB, Estudo de sua Sazonalidade e Avaliação de suas Atividades Biológicas**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2009.

MOURÃO, L. R. M. B. **Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. 93f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2013
NASCIMENTO, et al., 2009 - Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha - **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 4, p. 334-339, 2009.

NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-16, 2016.

NASCIMENTO, T. G. *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v.57, n.2, p.1-9, 2018.

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

NEVES, M. V. M. *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p.159-166, 2016.

NIKI, E. Antioxidant Activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, p. 524-525, 2002.

NIRMALA, D. T. D. et al. Herbs for Good Health. **Publications of Centre for Indian Knowledge Systems**, Kottupuram, India, 2005.

NONGONIERMA, A. et al. Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters. **Food Reviews International**, v. 22, p. 51-94, 2006.

NUNES, C. F. Padronização de uma amostra de extrato atânico de própolis verde. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, p. 67-72, 2012.

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, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLINTO, F. A. **Comportamento higiênico e identificação de patógenos em colmeias de *Apis mellifera* L. africanizadas no sertão paraibano**. 2014. 62f. Dissertação (Mestre em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal De Campina Grande, 2014.

ORSATTI, C. L. et al. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1141-1146, 2010.

ORSOLIC, N. et al. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 694- 700, 2005.

PACHECO, S. M. et al. Morcegos no Brasil: Biologia, sistemática, ecologia e conservação. 1. ed. Porto Alegre: **Armazém Digital Comunicação Ltda**, 2008.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K. et al. Botanical origin and chemical composition of Brazilian própolis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2502-2506, 2005.

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K. et al. Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Mensagem Doce**, v. 58, n. 1, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K. et al. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K. et al. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, n. 89, 2006.

PAULA NETO, F. L.; ALMEIDA NETO, R. M. Principais Mercados Apícolas Mundiais e a Apicultura Brasileira. **Revista Mensagem Doce**, n. 84, p.1-20, 2005.

PAULINO, N. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. **J Pharmacol Sci**, v. 93, p. 307-313, 2003.

PEGORARO, A. et al. **Aspectos práticos e técnicos da apicultura no sul do Brasil**. 2017. 282f. Universidade Federal Do Paraná. Curitiba, 2017. Disponível em: <<http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/45536/Aspectos%20pr%C3%A1ticos%20e%20t%C3%A9cnicos%20da%20apicultura%20no%20Sul%20do%20Brasil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em 06 de agosto de 2019.

PEREIRA, D. A. **Extração aquosa de própolis e secagem em leite de espuma para uso em alimentos**. 2008. 88f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimento) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2008.

PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.

PETER, C. M. et al. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017.

PETRI, G. et al. Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different floral environments. In: Lawrence BM, Mookherjee BD, Willis BJ, editors. **Flavours and fragrances: a world perspective**. Amsterdam: Elsevier Sci Publ; v. 18, p. 439-446, 1988.

PINO, J. A. et al. Volatile constituents of propolis from honeybees and stingless bees from Yucatán. **J Essent Oil Res.**, v. 18, n. 1, p. 53-56, 2006.

PINTEUS, S. F. G. **Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com elevado potencial biotecnológico**. 2011. 86f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) – Instituto Politécnico de Leiria – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche, 2011.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112f. Dissertação (Mestre em Biologia) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas – Estrutura e função, Universidade Estadual Paulista, 2012.

PRYTZYK, E. et al. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **J Ethnopharmacol**, v. 88, p. 189-193, 2003.

REGUEIRA NETO, M. S. *et al.* Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v.107, n.1 p.572-580, 2017.

RIBEIRO, D. R. et al. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.117, n.1, p.85-95, 2015.

RIGHI, A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci of Food Agric**, v. 91, p. 2363-2370, 2011.

RIGHI, A. A. et al. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2013, p.1-14, 2013. Hindawi Limited.

ROBBINS, C. S.; COTRAN, R. **Patologia- Bases patológicas das doenças**. 7. ed. São Paulo: (Ed) Elsevir Ltda. v. 2, p. 48-89, 2005.

ROCHA, J. S. Manual técnico 05. **Apicultura**. 1º ed. Rio de Janeiro - Niteroi: Programa Rio Rural, v. 1, p. 27, 2008.

RUFATTO, L. C. et al. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 7, p. 591–8, 2017.

RUSSO, A. et al. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 21–29, 2002.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. Plantas aromáticas e seu uso na agricultura. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000. 48p.

SALES, B.A. **Produção de Sucedâneos de Cereais de Pequeno-Almoço ricos em compostos bioativos a partir de subprodutos da indústria agro-alimentar.** (2012). 97f. Tese (Doutorado em Engenharia Alimentar). Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2012.

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

SANTOS, R. S. et al. **Avaliação da qualidade da própolis, do subproduto da extração da própolis e dos seus extratos.** In: XXIV Encontro Anual de Iniciação Científica, 2015, Maringá.

SANTOS, R. M. S. **Contribuição à elaboração de um guia das abelhas nativas do Brasil.** 2016. 222p. Dissertação (Mestre em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, 2016.

SANTOS, A. M. G. et al. Efeito neuroprotetor da própolis vermelha após lesão da via nigroestriatal em modelo experimental da doença de Parkinson. In: Anais 2016: **"A prática interdisciplinar alimentado a ciência"**. 18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes. ISSN: 1807-2518, 2016.

SARKER, S. D. et al. Natural Product Isolation. Methods in Biotechnology. 2º Edition. (Ed) **Humana Press**. New Jersey, 2006.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas. **Informações de mercado sobre mel e derivados da colmeia** - Relatório Completo. Série Mercado. Brasília. 2006. 243f. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 16 de agosto de 2019.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas. **Indicações geográficas brasileiras: mel e própolis = Brazilian geographical indications: honey and propolis = Indicaciones geográficas brasileñas: miel y propóleo.** Brasília : Sebrae, INPI, 1. ed., p. 47, 2016.

SILVA, R. A. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, **Brasil. Cienc. Rural**, v. 36, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, A. F. **Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2009. 145f. Tese (*Doctor Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SILVA, R. C. P. A. **Estudo da cadeia produtiva do mel no contexto da apicultura Paranaense – uma contribuição para a identificação de políticas públicas prioritárias**. 2008. 103f. Monografia (Especialista em Formulação e Gestão de Políticas Públicas) – Universidade Federal do Ceará, 2008.

SILVA, V. C. **Desenvolvimento de cápsulas de microencapsulados da própolis vermelha obtidas por secagem em spray-dring**. Monografia (TCC em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Curso de Farmácia. Maceió, 2016.

SILVA, K. C. M. **Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão da literatura**. 2018. 56f. Dissertação (Mestre em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, 2018.

SILVA, S. R. S.; BRAZ, H. M. F. S. Apicultura aliada à agricultura de subsistência como processo de aprendizagem no semi-árido sergipano. Eventos, **X ENFOPE – Encontro Internacional de Formação de Professores, XI – Fórum Permanente Internacional de Inovação Educacional**. v. 8, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://eventos.set.edu.br/index.php/enfope/index>>.

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

SILVA, B. B. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 207, p. 100-107, 2017.

SILVA, A. R. S. T. et al. Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. **Molecules**, v.22, n.815, p.1-10, 2017.

SILVA, V. C. **Desenvolvimento de membrana polimérica impregnada com nanopartículas de PLA (ácido láctico) carregadas com própolis vermelha: produção e caracterização**. 2019. 89f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, 2019.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação, e modificação estrutural e atividade biológica.** 2004. 232f. Tese (Doutor em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

SFORCIN, J. M. et al. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SIQUEIRA, A. L. et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da Unesp**. V. 43, n. 6, p. 359- 366, 2014.

SOARES, V. D.; COSTA, W. F. Estudo comparativo de óleos essenciais de plantas do gênero *Eupatorium* extraídos por arraste a vapor e hs-gcms. **26º Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2017. Disponível em: <<http://www.eaic.uem.br/eaic2017/anais/artigos/1816.pdf>>. Acessado em 06 de janeiro de 2020.

SOUSA, S. S. S. et al. Constituintes do óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pio IX-Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 8, n. 4, p. 1-3, 2006.

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

SOUZA, J. A. et al. A apicultura em Rondônia (Amazônia legal): estudo de caso sobre o arranjo produtivo local da apicultura no cone sul. **Revista Estudo & Debate**, v. 23, n. 2, 2016.

STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v. 158, p. 353-357, 2003.

SUN, T.; LIU, R.; CAO, Y. X. Vasorelaxant and antihypertensive effects of formononetin through endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 8, p. 1009-18, 2011.

SUN, T. et al. Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT_{2A/1B} receptors and alpha₁-adrenoceptors in

spontaneously rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 241-9, 2013.

SUZUKI, I. et al. Anti tumor effect of immunologically active fractions obtained from Brazilian propolis, given in combination with anticancer drug in Ehrlich carcinoma bearing mice. **Mitsubachi Kagaku**, v. 17, p. 1-6, 1996.

TAKAI, H. et al. The effect against antitumor and recovery of leukopenia by combined use of water soluble propolis and antitumor drug (5- FU). **Igaku to Seibutsugaku**, v. 132, p. 311-316, 1996.

TANI, H. et al. Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorg Med Chem.**, v. 18, n. 1, p. 151-157, 2010.

TAVARES, J. P. et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 350-356, 2006.

TEXEIRA, E. W. **Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais e suas atividades biológicas**. 2003. 171f. Tese (Doutor em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2003.

THOLL, D. et al. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant Journal**, v. 45, p. 540-560, 2006.

THOMAS, N. V.; KIM, S. K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 325-335, 2011.

TOMAZZOLI, M. M. **Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)**. 2015. 144f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

TORRES, R. N. S. et al. Constituintes voláteis de própolis Piauiense. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 479-485, 2008.

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, Campolin & Schmidt Ltda., Marcos Roberto da Rosa, Yohandra Reyes Torres, Julio Murilo Trevas dos Santos. **Processo para produção de extrato oleoso de própolis com alto rendimento e produtos resultantes.** Brasil patente BR n. PI 1000615-0 A2, 2010 Jan 29, 2011 Set 20.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 13, n.1, p. 1-4, 2007.

UGUR, A.; ARSLAN, T. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. **J Med Food**, v. 7, p. 90-94, 2004.

UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz - Barão Geraldo, Campinas – SP. Selma Giorgio, Maria Cristina Marcucci Ribeiro, Diana Copi Ayres. **Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipificada com atividade leishmanicida e método de tratamento.** Brasil patente BR/SP n. PI 0601863-7 A 2006 Jan 27, 2007 Out 30.

VILELA, D. et al. **Camara setorial da cadeia produtiva de mel e produtos apícolas. Contribuições das camaras setoriais e temáticas a formulação de políticas públicas e privadas para o agronegócio.** Conselho do Agronegócio Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/SE/CGAC, 2006, 496f.

VARGAS, C. M.; ARNDT, P. B. **Efeito da imersão em soluções de óleo de alecrim, óleo de rícino e extrato glicólico de própolis nas propriedades de uma resina acrílica incolor: Estudo longitudinal.** 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Cirurgião-Dentista) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2014.

VOLPERT, R.; ELSTNER, E. F. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 1, p. 47-51, 1996.

WANG, H. P. et al. Endothelium-independent vasorelaxant effect of the phyto-oestrogen biochanin a on rat thoracic aorta. **Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.**, v. 3, p. 2244-7, 2005.

WANG, H. P. et al. Mechanisms underlying biochanin A-induced relaxation of the aorta differ between normotensive and hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 9, p. 802-7, 2006.

WANG, H. P. et al. Endothelium-independent vasorelaxation of plant-derived estrogen biochanin A and its mechanism in rat aortic rings. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 22, n. 3, p. 274-277, 2006.

WENG , M. S. et al. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1815-1827, 2005.

WEYANT , M. J. et al. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 949-956, 2000.

WHO – WORL HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve, 1998. 115p.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

ZANUSSO, J. T. **Apicultura**. 2016. 54f. Disponível em: <https://docplayer.com.br/16381904-Apicultura-prof-jerri-zanusso-1-1-historico-3.html#show_full_text>. Acesso em 16 de agosto de 2019.

ZHANG, C. et al. Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. **Journal of Food Science**, v. 82, n.7, p. 1602-1607, 2017.

ZHU, X. M. et al. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 160-5, 2007.

ZWOLAN, W.; MERESTA, T. Bacteriostatic action of the volatile oils obtained from propolis extracts in relation to *Staphylococcus aureus*. **Herba Pol.**, v. 46, n. 1, p. 30-34, 2000.