



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

CATARINA BEZERRA SOARES

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS (*Apis mellifera*) COLETADA NO SERTÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Recife
2023

CATARINA BEZERRA SOARES

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS (*Apis mellifera*) COLETADA NO SERTÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Monografia apresentada à coordenação do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria
Sarmiento da Silva

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S676e Soares, Catarina Bezerra
Estudo químico e potencial antioxidante da própolis (*Apis mellifera*) coletada no Sertão do Vale do São Francisco / Catarina Bezerra Soares. - 2023.
38 f. : il.
- Orientador: Tania Maria Sarmento da Silva.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Química, Recife, 2023.
1. Própolis. 2. *Mimosa tenuiflora*. 3. *Apis mellifera*. I. Silva, Tania Maria Sarmento da, orient. II. Título

CDD 540

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS (*Apis mellifera*)
COLETADA NO SERTÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CATARINA BEZERRA SOARES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovado em: 12 de Maio de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tania Maria Sarmiento da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. José Euzebio Simões Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Ayala Nara Pereira Gomes
Strathclyde University

Dedico este trabalho a Felipe, cuja bondade e competência e me inspiram cada dia a ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustentou com seu amor do início ao fim dessa jornada.

A meus pais, João e Zilma, por me darem infinitamente mais do que podiam.

A Felipe, por ser meu maior parceiro em todas as adversidades.

A minha orientadora, Professora Tania, por tudo que tem me ensinado.

A minha avó Valdeci e minha tia Mariza, cujas orações me mantiveram viva.

A meu avô Esmeraldo, que não viu esse trabalho ficar pronto, sinto sua falta todo tempo.

Ao Professor Euzebio, por segurar minha mão mais forte que todo mudo e ser meu maior incentivador nos meus piores dias.

A Leandro, meu melhor amigo e irmão, por nunca desistir de mim, e por ter trazido Rerison pra minha vida.

A Caroline, minha irmã de outra vida, por nunca cortar nosso laço.

A Lucas, que chegou há muito tempo e ficou pra sempre.

A Mariana, que foi pra longe mas ficou no meu coração.

A toda equipe BIOFITO pelos conhecimentos partilhados.

Ao DQ/UFRPE, por me mostrar que sou mais forte do que jamais imaginei.

“Clamarei ao Deus altíssimo, ao Deus que por mim tudo executa.”

Salmos 57:2

RESUMO

A abelha *Apis mellifera* é o resultado do cruzamento das raças europeia e africana. Apesar de serem muito defensivas, as abelhas africanizadas são ativas o ano todo, altamente produtivas e resistentes a doenças, são importantes polinizadoras e produzem subprodutos como mel, pólen e própolis. A própolis é um produto resultante da mistura de cera, compostos resinosos, pólen, cera, açúcares e secreções salivares. No presente trabalho foram analisadas a própolis de *A. mellifera* e os brotos da espécie vegetal *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. coletadas no sertão nordestino. As amostras foram submetidas à extração com EtOH e partição com hexano, acetato de etila e metanol:água (1:1). O perfil químico das amostras da própolis e do broto foram comparados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de dióxido (HPLC-DAD). Foram analisados o teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antirradicalar. Os cromatogramas do perfil químico mostraram que a própolis coletada pelas abelhas tem similaridade química com o extrato do broto de *Mimosa tenuiflora*. O teor de fenólicos e flavonoides variaram 8,09-61,97 mg EAG/g e 46,41-141,094 mg EQ/g de amostra, respectivamente. As amostras também apresentaram atividade antirradicalar correlacionando com o teor de fenólicos totais.

Palavras-chave: Propópolis; *Mimosa tenuiflora*; *Apis mellifera*.

ABSTRACT

Apis mellifera is the result of crossing European and African races. Despite being very defensive, Africanized bees are active all year round, highly productive, and resistant to diseases, are also important pollinators and produce products such as honey, pollen and propolis. Propolis is a product resulting from the mixture of wax, resinous compounds, pollen, wax, sugars, and salivary secretions. In the present work, the propolis of *A. mellifera* and the shoots of the plant species *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir were analyzed. Collected in the northeastern hinterland. The samples were subjected to extraction with EtOH and partition with hexane, ethyl acetate and methanol:water (1:1). The chemical profile of propolis and sprout samples were compared by high performance liquid chromatography coupled with array detector (HPLC-DAD). The content of total phenolics, flavonoids and antiradical activity were analyzed. The chemical profile chromatograms showed that the propolis collected by the bees has chemical similarity with the *Mimosa tenuiflora* bud extract. Phenolic and flavonoid content ranged from 8,09-61,97 mg EAG/g and 46,41-141,094 mg EQ/g of sample, respectively.

Keywords: Propolis; *Mimosa tenuiflora*; *Apis mellifera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•) e um antioxidante	20
Figura 2	Atividade sequestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H ₂ O da própolis de <i>A. mellifera</i>	24
Figura 3	Cromatograma de HPLC-DAD a 320nm da fração AcOEt da própolis de <i>Apis mellifera</i>	25
Figura 4	Cromatograma de HPLC-DAD a 320nm da fração AcOEt dos brotos de Jurema Preta (<i>Mimosa Tenuiflora</i>)	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das própolis brasileiras a partir do extrato etanólico	15
Tabela 2	Atividade biológica de compostos extraídos das própolis brasileiras)	16
Tabela 3	Quantidade do extrato etanólico e frações da própolis marrom de <i>A. mellifera</i> e de <i>M. tenuiflora</i> após extração e partição líquido-líquido	22
Tabela 4	Teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antirradicalar no extrato etanólico e nas frações hexano, metanol:água e acetato da própolis marrom de <i>A. mellifera</i>	23
Tabela 5	Análise palinológica da própolis marrom de Juazeiro - BA.	27
Tabela 6	Teor de fenólicos totais, flavonoides nas frações hexano, acetato de etila e etanol de brotos de Jurema preta (<i>Mimosa Tenuiflora</i>) e dados de coleta	28
		29

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	17
3.METODOLOGIA.....	18
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
5.CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A apicultura compreende a criação racional de abelhas, sendo amplamente difundida por pequenos produtores rurais ou agricultores familiares (BARBOSA et al., 2007). Essa atividade não exige áreas extensas e pode atender a diversos objetivos, como contribuir para a sustentabilidade ambiental através da polinização de áreas nativas ou cultivadas e trazer benefícios para o produtor graças a produção de mel, própolis, cera, geleia real e pólen apícola (BARBOSA et al., 2007; WOLFF et al., 2018; WOLFF, 2017).

As abelhas pertencem à ordem *Hymenoptera*, subordem *Apocrita*, família *Apidae* superfamília *Apoidea* e a espécie mais conhecida é a *Apis mellifera*, uma abelha social chamada popularmente de abelha de mel, que é caracterizada pela presença de ferrão (RAMOS; CARVALHO, 2007). Essa espécie possui ampla distribuição mundial e no Brasil foi introduzida no século XIV para fins de produção comercial de mel. Além do mel, essa espécie é conhecida pela produção da própolis, com o Brasil ocupando o terceiro lugar da produção mundial, que está associada à região centro-oeste, responsável por cerca de 70% da produção de própolis nacional (SEBRAE-BA, 2017).

Denomina-se própolis a substância resinosa produzida por abelhas a partir da extração de uma resina proveniente de diferentes origens vegetais e alteradas a partir da ação de enzimas contidas em sua saliva. A diversificada composição química da própolis varia de acordo com condições relacionadas a sazonalidade regional, fonte vegetal (ALENCAR, et al., 2005) e isso influencia diretamente em seu potencial de ação e aplicabilidade (CASTRO et al., 2007) e propriedades organolépticas como cor, sabor e aroma.

A etimologia da palavra tem origem no grego pro-, em defesa, e polis-, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (PEREIRA et al., 2002). A própolis foi um dos primeiros produtos naturais usados pela humanidade (VARGAS et al., 2004) com relatos de sua utilização remontam ao Egito antigo (1700 A.C.; conhecida por “cera negra”) usado como auxiliar no processo de embalsamar mortos (CASTALDO & CAPASSO, 2002; PEREIRA et al, 2002) e à Mesopotâmia (CASTALDO; CAPASSO, 2002; MATSUNO, 1997; PEREIRA et al., 2002). Os gregos e romanos utilizavam como cicatrizante interno e externo (CAPASSO & CASTALDO,

2002) e como redutor de inchaços e alívio de dores (IOIRISH, 1982). Primeiros relatos escritos dos efeitos da própolis foram encontrados ainda no século XVI na França (MARCUCCI, 1996). No ano de 1908 registrou-se o primeiro trabalho científico sobre relação entre atividade biológica e composição química da própolis (HELFENBERG, 1908). Em 1968 o resumo da primeira patente utilizando a própolis Romena para a produção de loções para banho (IULIU, 1965), ambos indexados no Chemical Abstracts. Relatos de diferentes usos medicinais da própolis foram registrados em diferentes partes do mundo, como na África do Sul, utilizado como cicatrizante (MARCUCCI, 1996) e na Rússia com aplicações em medicina humana e veterinária, tratamento da tuberculose e problemas pulmonares em geral.

À despeito de seu longo histórico de usos e aplicações na medicina ao redor do mundo, desde a segunda metade dos anos 80, a própolis está relegada a um uso quase restrito à medicina complementar (LUSTOSA, 2007) ou medicina alternativa (LOTTI et al., 2010) sempre adicionada a bebidas e alimentos associada a objetivos amplos, como: melhorar a saúde e prevenir diferentes enfermidades que vão desde inflamações a doenças mais complexas como diabetes, doenças cardíacas e câncer (DAUGSCH et al, 2008; BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al, 1999).

1.1 Propriedades Gerais

As aplicações da própolis em medicina e saúde são conhecidas desde a antiguidade como descrito anteriormente. Recentemente, o crescimento do número de infecções e a resistência de bactérias a agentes antimicrobianos despertou o interesse de se investigar agentes naturais que possam ter propriedades contra infecções causadas por esses patógenos. Nesse contexto, a química dos produtos naturais novamente voltou a pesquisar a própolis para investigá-lo como fonte para novas aplicações contra doenças.

Os resultados indicam atividade de amplo espectro contra diferentes microrganismos (fungos, bactérias, vírus, protozoários etc.) de distintos graus de patogenicidade para o homem e outros animais. Ainda, importantes propriedades biológicas foram comprovadas, como antibióticas (DE CASTRO 2001), antimicrobianas (PARK et al 1998), antifúngica (SILICI et al 2005).

1.2 Composição da Própolis

A composição da própolis e sua atividade farmacológica é bastante variável e reflete bastante a diversidade ambiental do ambiente onde é extraído, pois fatores como clima, época do ano de coleta, espécie da abelha e flora local interferem no resultado. Estima-se que a composição química da própolis é formada de resinas vegetais (55%), cera de abelhas (30%), óleos essenciais (8 a 10%) e pólen (5%).

A composição da própolis está fortemente associada à sua origem botânica e geográfica, que é responsável pelos efeitos terapêuticos, pela cor e por sua textura (AFROUZAN et al., 2017; BUENO-SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2017). Por esse fato, a análise do perfil químico das amostras é responsável não somente pela identificação e posterior isolamento das substâncias presentes, mas também pelo mapeamento do processo de origem da própolis, pois através da comparação dos seus componentes com dados da literatura, é possível deduzir, por exemplo, a vegetação polinizada pela abelha no caminho de preparo da própolis (PARK, 2002).

Por conta da complexidade em sua composição, a própolis tem despertado o interesse de pesquisadores nas últimas décadas, pois a ela é atribuída as diversas propriedades funcionais, biológicas e farmacológicas (ANJUM et al., 2019), como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória antitumoral, antiprotozoárias, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antiviral, anticâncer (ALVAREDA et al., 2015; MACHADO et al., 2016; QUINTINO et al., 2020; WAGH, 2013) e antioxidante (ANDRADE et al., 2017; GALEOTTI et al., 2018; ZHENG et al., 2017). Dessa forma, é de grande interesse das indústrias cosmética e farmacêutica o investimento em pesquisas sobre as propriedades citadas, principalmente no que diz respeito à ocorrência de doenças relacionadas ao aumento dos níveis de radicais livres do organismo.

Uma das maneiras mais eficientes de avaliar a potencialidade do uso de um produto (alimentos, plantas medicinais, suplementos alimentares, etc) é a análise do teor de fenólico e flavonoides. Os compostos fenólicos e flavonoides são bem conhecidos compostos bioativos e que possuem reconhecidas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e protetores contra doenças cardíacas. Ao avaliar o teor de fenólicos e flavonoides em amostras, pode-se

concluir sobre sua utilidade para a indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

A partir da determinação da constituição química, teor de fenólicos e flavonoides totais e teste antirradicalares é possível comparar o potencial antioxidante da própolis de *Apis mellifera* com os dados já disponíveis na literatura e colocar em prática seu uso adequado para beneficiar não somente a comunidade acadêmica, mas o consumidor, que se interessa e necessita de informações sobre esses produtos. Em vista disso, surge o interesse em realizar pesquisas sobre a própolis, sua composição e que tipo de usos farmacológicos, cosméticos e/ou alimentícios podem vir a ser feitos. Diferentes compostos químicos já foram identificados na própolis, como flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ésteres, açúcares, etc. Regiões tropicais apresentam uma maior versatilidade e complexidade em comparação com regiões temperadas (BANKOVA, 2005; HAYACIBARA et al., 2005). A própolis também apresenta em sua composição microconcentrações de metais (Al, Ca Sr, Fe, Cu, Mn, Mg, Si, Ti, Br e Zn), além de vitaminas (B1, B2, B6, C e E) (GHISALBERTI, 1979).

Alguns dos compostos mais comuns encontrados na própolis incluem:

- Flavonoides: como a quercetina e a luteolina que têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.
- Ácidos fenólicos: como o ácido cafeico e o ácido ferúlico, que também têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.
- Terpenoides: como o ácido oleanólico e o ácido ursólico, que têm propriedades anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas.
- Ácidos graxos: como o ácido linoleico e o ácido palmítico, que ajudam a manter a saúde da pele e a regular o colesterol.
- Compostos aromáticos: como o ácido vanílico e o ácido cinâmico, que têm propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

Essa diversidade na composição química, que enriquece e torna atrativo a pesquisa sobre uso e aplicações da própolis, é também um dos grandes obstáculos para sistematização e uso racional da própolis em países como o Brasil, onde a composição da resina varia de acordo com o seu local de obtenção (BANKOVA, 2005).

1.3 Própolis no Brasil

O Brasil detém o posto de segundo maior produtor mundial de própolis, superado apenas pela China (LIMA, 2006). No entanto, a enorme diversidade de espécies de abelha e de plantas conferem ao Brasil uma grande riqueza e diversidade no que se refere à complexidade da composição da própolis produzida aqui e, por consequência, suas diferentes propriedades farmacológicas e medicinais.

Entre os tipos de própolis encontrados em países europeus de clima moderado existe os denominados de Aspen, Mediterrânea, e a Pacífico, diferenciadas entre si pela origem botânica e pela espécie de abelha que a produziu. No Brasil, predominam as do tipo verde, vermelha e marrom. Uma distinção interessante pode ser feita em relação a fonte vegetal para a obtenção de própolis. Enquanto na Europa, América do Norte e Ásia fonte vegetal predominante é o botão de álamo (*Pupulus sp.*) (MARKHAM et al 1996), na América do Sul a diversidade predomina sendo a fonte vegetal da resina a principal responsável pela possibilidade de classificar as resinas em 12 grupos (PARK et al 2000).

Essa classificação foi resultado de um longo e exaustivo trabalho onde 500 amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil foram coletadas, analisadas a partir de características e coloração dos extratos, além de análises químicas de UV/Visível e cromatografia líquida (PARK et al 2000).

Tabela 1: Classificação das própolis brasileiras a partir do seu extrato etanólico.

Grupo	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Região de Origem da Própolis
1	Amarelo	63,0	Sul
2	Castanho Claro	57,5	Sul
3	Castanho Escuro	65,0	Sul
4	Castanho Claro	54,5	Sul
5	Marrom Esverdeado	58,7	Sul
6	Marrom Avermelhado	45,9	Nordeste

7	Marrom Esverdeado	43,8	Nordeste
8	Castanho Escuro	41,3	Nordeste
9	Amarelo	46,7	Nordeste
10	Amarelo Escuro	24,1	Nordeste
11	Amarelo	23,1	Nordeste
12	Verde ou Marrom Esverdeado	61,0	Sudeste

No Brasil distingue-se três tipos de própolis a verde, a vermelha e a marrom. A própolis verde do Brasil está associada a planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida também como alecrim-do-campo, onde é nativo. A própolis vermelha do Brasil está associada as folhas e flores do cajueiro que serve de alimento para as abelhas africanas. Possui propriedades antioxidante, antibiótica e anti-inflamatória. Por fim, no Brasil ainda encontramos a própolis marrom que é encontrada predominantemente nas regiões Sul e Sudeste. Essa espécie de própolis é originária de uma grande diversidade de plantas. Em sua composição encontramos compostos fenólicos, vitaminas e minerais. A sua composição é similar à da própolis verde, mas de maneira geral apresentar uma atividade inferior.

Tabela 2: Atividade biológica de compostos extraídos das Própolis brasileiras (HOSSAIN et al, 2022).

Classe	Atividade Biológica
Triterpenoides, Flavonoides, Flavonas, Polifenóis, benzofenonas, dímeros derivados de flavonoides, Isoflavonóides,	Antioxidante
Flavonoides, Terpenoídes	Antibacteriana
Benzofenonas, Propolonas, Flavonas, Fenóis, Terpenos, ácidos fenólicos, flavonoides	Anticâncer
Ácidos fenólicos, Terpenoídes	Anti-inflamatório e analgésico
Ácidos fenólicos	Antiviral

A *Mimosa tenuiflora*, uma angiosperma da família Fabaceae, comumente conhecida como Jurema e Jurema Preta, tem sua ocorrência natural na vegetação da Caatinga (PEREIRA et al. 2003) sendo assim uma das principais fontes de coleta para o preparo da própolis produzida no Nordeste brasileiro (CUNHA et al, 2018).

A Jurema Preta é considerada sagrada por diversas comunidades tradicionais, como os índios Pankararu e quilombolas. O seu uso como medicamento popular para o tratamento de diversas condições de saúde, como feridas, inflamações e problemas gastrointestinais é também conhecido. Além disso, seus extratos são amplamente utilizados na indústria cosmética e farmacêutica (BERNARDO et al, 1990; PERUCHI et al, 2001; AZEVEDO et al, 1986; SFORCIN et al, 2001).

Devido o potencial para o desenvolvimento de fármacos, faz-se necessário, no entanto, estudos mais aprofundados sobre a relação da Jurema Preta com a própolis do Nordeste para que essa possibilidade se consolide.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico e o potencial antioxidante da própolis de *Apis mellifera* do sertão nordestino.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer extração em fase líquida da própolis marrom de *Apis mellifera* e dos brotos de *M. tenuiflora*;
- Analisar o perfil químico da própolis marrom e dos brotos de *M. tenuiflora* por HPLC-DAD;
- Determinar o teor de flavonoides e fenólicos totais da amostra de própolis marrom e analisar potencial antirradicalar.

3 METODOLOGIA

3.1. Obtenção extratos etanólicos brutos e frações

A amostra da própolis marrom foi coletada na cidade de Juazeiro, na Bahia, Nordeste do Brasil, em Agosto de 2020 contendo 55,0188 g, obtidas de apiários da região. A amostra dos brotos foi coletada na cidade de Petrolina, em Pernambuco, em Maio de 2021 contendo 18,03 g, e foi identificada como sendo de *Mimosa tenuiflora*. Para obtenção dos extratos as amostras foram previamente pulverizadas e submetidas à extração com aproximadamente 100,0 mL de etanol (EtOH) sob agitação em aparelho ultrassom por 30 minutos. Em seguida ficaram em repouso para decantar. Após filtração, as soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40°C para remoção do solvente orgânico. Esse processo foi repetido diversas vezes para obtenção de uma maior quantidade de extrato etanólico. Posteriormente, 20g do extrato de própolis marrom e 1g do extrato dos brotos foram submetidos à extração líquido-líquido e separados, de acordo com as diferenças de polaridade dos solventes, nas frações hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol:água (MeOH:H₂O).

3.2 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais do extrato da própolis foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, usando o ácido gálico como composto fenólico padrão (SINGLETON e ROSSI, 1965). Inicialmente o extrato foi solubilizado em EtOH (5mg/mL). Uma alíquota de 20µL da solução do extrato foi transferida para um eppendorf, adicionando-se 10µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 440µL de água destilada. Em seguida, 30µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Após duas horas, a absorbância de cada amostra foi medida por espectrofotométrico de Elisa UV-Vis em 760 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico em várias concentrações (1 a 20 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama

de extrato (mg EAG/g). A equação da curva de calibração da quercetina foi: $y = 0,1649x - 0,0295$, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,99965$, onde x é a concentração de ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm.

3.3 Determinação do teor de flavonoides

A determinação de flavonoides seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) com modificações, empregando-se a quercetina como padrão. Na reação, o íon alumínio (Al^{3+}) complexa-se com as moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonoide- Al^{3+} de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoide presente na amostra. Esta complexação promove, em espectroscopia, deslocamento batocrômico e intensificação das absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra.

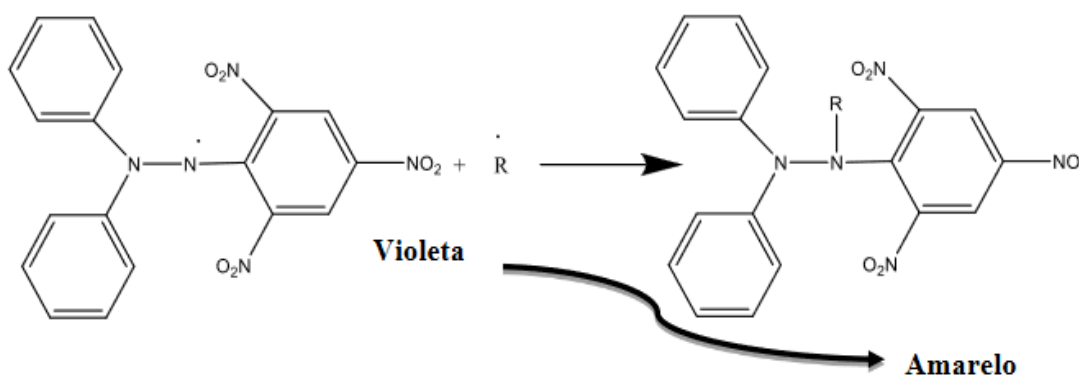
Inicialmente foram pipetados 100 μ L de cada amostra testada, na concentração de 5,0 mg/mL cada, em eppendorf de 1,0 mL, individualmente. Após a adição do extrato, adicionou-se 150 μ L de MeOH e 250 μ L cloreto de alumínio 5% m/v em metanol, resultando na concentração final de 100 μ g/mL para as amostras. Aguardou-se 30 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ELISA UV-Vis em 425 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de quercetina em várias concentrações (2,5 a 20,0 μ g/mL) e expressos como miligrama equivalente a quercetina por grama de extrato (mg EQ/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração da quercetina foi: $y = 0,0576x + 0,0955$, com o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9965$, onde x é a concentração de quercetina e Y é a absorbância a 425 nm.

3.4 Atividade radicalar do radical DPPH

A atividade antirradicalar foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH•

(1,1-difenil-2-picrilidrazil). Baseia-se no princípio de que o radical DPPH, originalmente de cor violeta, aceita um elétron (ou um radical hidrogênio) de um componente antioxidante para se tornar uma molécula reduzida, DPPH-H (hidrazina) momento este no qual adquire coloração amarela (Figura 1). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido por um elétron doado pelo composto antioxidante (BRAND-WILLIAMS, 1995. Seguindo a metodologia descrita por Silva et al., (2006) com pequenas modificações, as amostras dos extratos e frações foram preparadas a 5,0 mg/mL em etanol. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas das amostras foram transferidas para eppendorfs de 500 µL, em seguida foi adicionado 450,0 µL da solução de DPPH• (23,6 µg/mL em EtOH) e o volume foi completado para 500,0 µL com EtOH, a fim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 5,0 µg/mL. A mistura ficou sob agitação em aparelho ultrassônico por 30 minutos, ausente de luz. Uma alíquota da mistura (300 µL) foi transferida para placa de 96 poços, usando como branco EtOH e a absorbância foi detectada em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico.

Figura 1. Reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•) e um antioxidante



Fonte: (Coelho, 2013)

3.5 Análise por HPLC-DAD

5mg das amostras foram solubilizados em 1mL de MeOH, filtradas e depois diluídas no seguinte sistema: 500uL de amostra + 100uL de água acidificada a 0,1%

de ácido fórmico + 400 uL de MeOH acidificado a 0,1% de ácido fórmico, cujo fluxo de foi 1mL/minuto

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A amostra de própolis e dos brotos foram submetidas a extração com etanol e posteriormente passaram pelo método de partição conforme as Tabelas 1 e 2. Subsequentemente, as amostras de própolis seguiram para análises de fenólicos totais, flavonoides e atividade antirradicalar. As frações AcOEt de ambas as amostras foram analisadas por HPLC-DAD. Em relação a extração com etanol, a amostra apresentou um rendimento satisfatório e conforme relatado na literatura onde a própolis pode apresentar uma variação. As diferenças em relação a quantidade do extrato obtido, pode ser explicado pela variação da localidade de coleta da própolis afetando sua composição

Tabela 3. Rendimento obtido com desvio padrão do extrato etanólico e frações da própolis marrom de *A. mellifera* e de *M. tenuiflora* após extração e partição líquido-líquido

Amostra	Quantidade (g)	Extrato EtOH (g)	% do Extrato EtOH
Próp. Marrom	55,01	29,06	53,8
Fr Hex	7,57		
Fr MeOH: H ₂ O	1,46		
Fr AcOEt	0,37		
Brotos de Jur.	18,03	8,06	44,7
Fr Hex	0,18		
Fr MeOH: H ₂ O	0,68		
Fr AcOEt	0,13		

Para teor de fenólicos totais (Tabela 4), o resultado variou de $8,09 \pm 0,56$ a $43,00 \pm 0,82$ mgEQ entre as amostras analisadas, com o extrato etanólico apresentando o maior teor. Esses resultados diferem um pouco do que foi apresentado anteriormente, onde a extrato da própolis apresentou um teor de fenólicos de $61,15 \pm 11,60$ mgEQ. Já nas frações, quem se mostrou mais reativa à presença dos polifenóis foi a fração AcOEt, indicando que estas espécies químicas se agruparam em sua maioria na fração de polaridade mediana da amostra (CHEN et al., 2019). O resultado de teor de fenólicos totais corresponde à média da triplicata

das determinações quando comparado com o teor de substâncias fenólicas estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

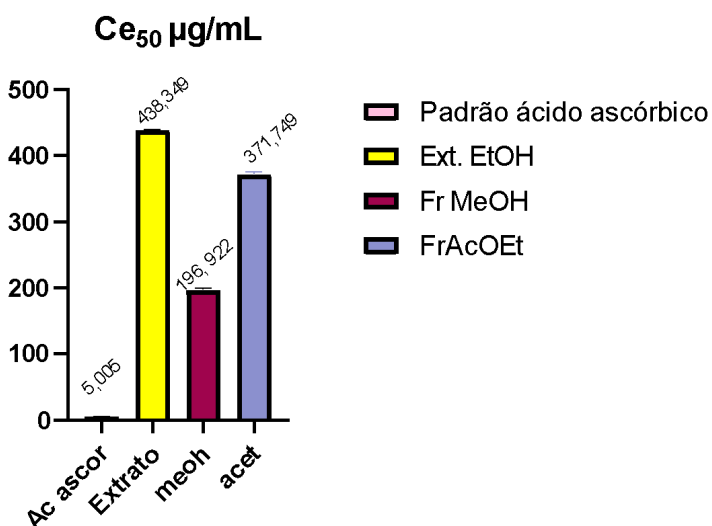
Tabela 4. Teor e desvio padrão de fenólicos totais, flavonoides e atividade antirradicalar no extrato etanólico e nas frações hexano, metanol: água e acetato de etila da própolis marrom de *A. mellifera*.

Amostra	Teor de fenólicos mgEQ ácido gálico/g de extrato	Teor de flavonoides mgEQ/g de extrato	C_E50 (µg/mL)
Ext EtOH	61,978 ± 5,32	46,41 ± 1,96	438,34 ± 1,63
Fr Hexânica	8,09 ± 0,56	20,66 ± 1,00	>500
Fr MeOH: H₂O	16,00 ± 1,16	27,43 ± 0,53	196,92 ± 2,62
Fr AcOEt	25,11 ± 0,70	141,09 ± 1,84	371,74 ± 3,32
Ácido Ascórbico			5,00 ± 0,04

O comportamento das amostras referente ao teor de flavonoides está dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (Tabela 4). O extrato etanólico e as frações MeOH:H₂O e hexânica apresentaram um valor dentro do esperado, variando de 27,433± 0,53 a 46,415± 1,96 mgEQ/g. A fração AcOEt teve 141,094 ± 1,84 mgEQ/gde extrato. Amostras de própolis obtidas de outras abelhas, com e sem ferrão, mostraram atividades antioxidantes importantes, ligadas diretamente à quantidade de fenólicos e flavonoides encontradas nas análises (BUENO-SILVA et al., 2017; DUTRA et al., 2014; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Na Figura 2 estão apresentados os resultados da capacidade antioxidante das amostra de própolis marrom, obtidos pelo método DPPH, que é amplamente utilizado devido à simplicidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade. O extrato EtOH e as frações AcOEt e MeOH:H₂O da própolis de *A. mellifera* apresentaram atividade sequestradora de radical livre DPPH·, com CE50 variando de 196,922 ± 2,62 a 438,349 ± 1,63 µg/mL (Gráfico 1). Sabendo que as amostras são consideradas ativas quando apresentam valores de CE50 < 500 µg/mL (CAMPOS et al., 2003), podemos afirmar que todas as amostras analisadas, com exceção da fração hexânica, apresentaram indícios de potencial antioxidante. Diferentemente do que foi apresentado por Oldoni (2007), onde a fração hexânica apresentou uma melhor atividade sequestrante do radical. A diferença na atividade antirradicalar das amostras testadas depende principalmente das diferenças na composição química

delas. Entre as amostras, observa-se que apesar do Ext. EtOH apresentar o maior valor de fenólicos totais, foi a fração MeOH:H₂O que demonstrou maior capacidade de sequestro do radical DPPH. Existe uma correlação conflitante entre a quantidade de teor de flavonoides e o potencial antioxidante (DPPH), como no caso do extrato EtOH, que apresentou teor mais elevado de polifenóis e um valor pouco satisfatório de CE₅₀. Um fator que pode ter contribuído para uma atividade antirradicalar pouco surpreendente das outras amostras foi o fato de elas apresentarem menos substâncias polares. Além disso, há também a possibilidade de outras substâncias, ainda não discutidas na literatura, estarem ligadas ao sequestro dos radicais em adição às fenólicas, principalmente em se tratando de amostras vindas do Nordeste brasileiro, cujas própolis parecem ter composições que diferem das própolis produzidas no resto do Brasil, sugerindo assim a possibilidade da própolis da Caatinga ser um tipo separado, assim como a própolis verde de Minas Gerais (Fernandes Neto, 2019).

Figura 2 . Atividade sequestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O da própolis de *A. mellifera*.



A natureza química das substâncias fenólicas e, possivelmente, a presença de outros derivados contribuem ou não para a capacidade antioxidante total dos extratos, uma vez que dados da literatura afirmam que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais (ANDRADE et al., 2017; XU et al., 2017). Parte da atividade apresentada pela fração AcOEt pode

ser atribuída ao valor de flavonoides apresentados nesta fração. Da mesma forma, a atividade mais acentuada da fração MeOH:H₂O pode ser causada pela maior concentração de fenólicos encontrados, como foi verificado no teste de Folin-Ciocalteu. As composições químicas da própolis diversificam entre si dependendo da localização geográfica, da região de coleta, da variação genética das abelhas e da flora (ANJUM et al., 2019; KRÓL et al., 2013), sendo este último um fator que pode ser comprovado através da análise do perfil químico das amostras, que a partir da comparação dos seus cromatogramas torna possível inferir que as substâncias que neles aparecem têm grande possibilidade de serem as mesmas, assim como pode ser notado por Santisteban et al 2019, cujo trabalho também incluiu a análise da *M. tenuiflora*, e permitiu ver como o perfil químico das flores da planta se assemelhou com o do mel de abelha branca, estudado pelo grupo, que identificou cerca de 21 flavonas/flavonóis e 8 flavonas/flavanóis na amostra, sendo todos eles constituintes principais das flores de Jurema Preta.

Figura 3. Cromatograma de HPLC-DAD a 320nm da fração AcOEt da própolis de *Apis melífera*.

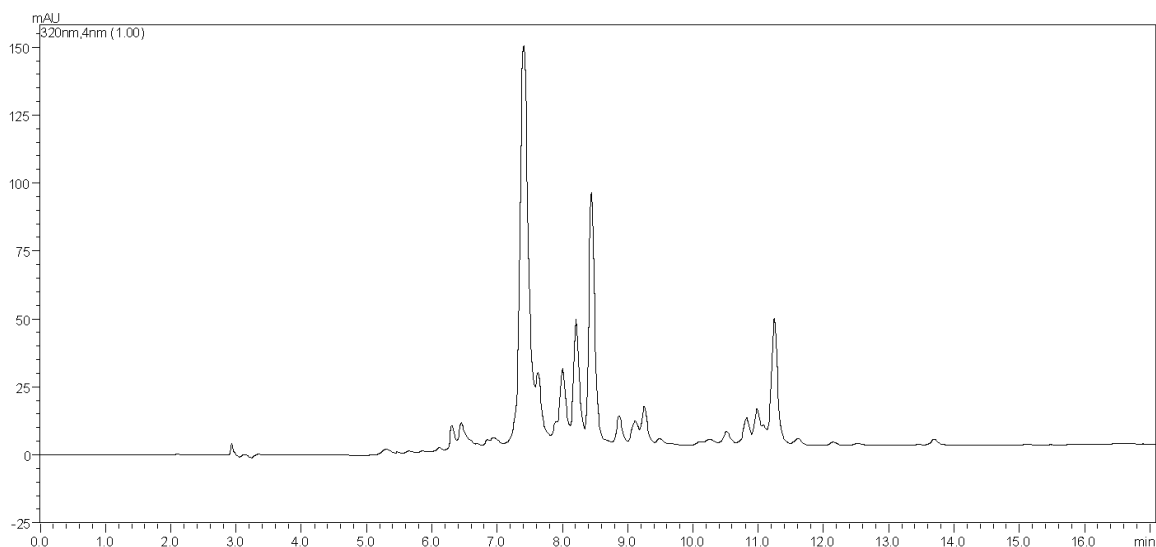
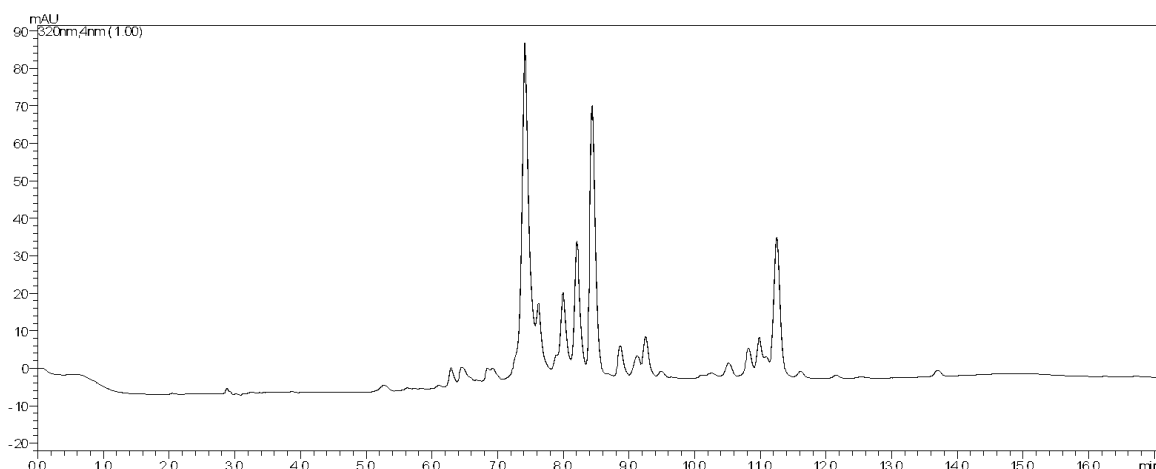


Figura 4. Cromatograma de HPLC-DAD a 320nm da fração AcOEt dos brotos de Jurema Preta.



As própolis em geral possuem uma variedade imensa de compostos, mas predominam os flavonóides. Dessa forma, analisando os resultados, se faz necessária a continuidade dos estudos sobre a correlação do perfil químico da própolis marrom de *Apis mellifera* e dos brotos de *Mimosa tenuiflora*.

Na análise palinológica da amostra de própolis marrom colhida em Juazeiro - BA, nota-se que há uma grande predominância do tipo polínico **Fabaceae Mimosa** (Jurema Preta), cuja composição é de 24%, sendo o segundo maior componente na amostra. Na própolis marrom, o tipo polínico predominante é a **Poaceae**, que são gramíneas, aparecendo com 29% do total.

Esses resultados contrastam com estudos anteriores (SANTISTEBAN et al 2019) onde no perfil palinológico heterofloral com predomínio de plantas do gênero Anacardeaceae e Fabaceae. O nosso perfil é mais diversificado e concentrado em três famílias de plantas: Fabaceae, Lamiaceae e Poaceae.

Tabela 5. Análise palinológica da própolis marrom de Juazeiro - BA.

Tipos Polínicos	Amostras (%) Juazeiro – BA
Amaranthaceae – <i>Alternanthera</i>	0
Anacardiaceae - <i>Spondias</i>	4
Arecaceae – <i>Syagrus</i>	3
Asteraceae	3
Chenopodiaceae	0
Convolvulaceae - <i>Merremia</i>	0
Cucurbitaceae	1

Euphorbiaceae	0
Fabaceae - <i>Cenostigma</i>	0
Fabaceae - <i>Desmanthus</i>	0
Fabaceae - <i>Mimosa</i>	24
Fabaceae - <i>Vigna</i>	0
Fabaceae – <i>Caesalpinia</i>	0
Fabaceae – indeterminado	0
Fabaceae – <i>Parapiptadenia</i>	0
Lamiaceae - <i>Hyptis</i> (hortelã do mato)	1
Malpighiaceae	0
Malvaceae - <i>Herissantia</i>	2
Malvaceae – <i>Waltheria</i>	2
Melastomataceae	15
Myrtaceae - <i>Eucalyptus</i>	0
Myrtaceae - indeterminado	1
Passifloraceae – <i>Passiflora</i>	1
Poaceae (gramíneas)	29
Polygonaceae	2
Rubiaceae – indeterminado	4
Sapindaceae – <i>Serjania</i>	0
Solanaceae	0
Indeterminados	8

O próximo passo foi investigar os teores de resíduos fenólicos e flavonoides em brotos de Jurema Preta cultivados no Campus de Ciências Agrárias – Universidade do Vale do São Francisco (CCA/UNIVASF). Não há indicação de data de quando as coletas foram realizadas. No entanto, em quase todos os casos os teores de flavonoides e fenólicos são superiores aos obtidos para a própolis marrom de *A. mellifera*.

Um ponto importante é que a determinação do teor de flavonoides e fenólicos foi inicialmente determinada em momentos distintos da Jurema Preta: nos seus brotos, brotos do ápice (extremo superior) e própolis de Jurema (Tabela 6).

Nota-se que a proporção entre os teores das duas substâncias não é similar aos obtidos das análises com as amostras provenientes da *A. mellifera*. O teor de flavonoides é algumas vezes superior ao de fenólicos. O teor de flavonoides é especialmente alto para a extração realizada no ápice, indicando uma distribuição não-homogênea das substâncias na extensão dos brotos. O teor de flavonoides e fenólicos na própolis analisada é bastante baixo em relação às quantidades extraídas do broto.

Os brotos de Jurema foram submetidos a extrações de flavonoides e fenólicos utilizando solventes de diferentes polaridades, como indicado na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de fenólicos totais, flavonoides nas frações hexano, acetato e etanol de brotos de Jurema e dados de coleta.

Amostras	Coleta	Teor de Flavonoides (mg/mL)	Teor de Fenólicos (mg/mL)
Brotos jurema	CCA/UNIVASF	121,712 ± 0,41	143,159 ± 1,05
Brotos do ápice de jurema 1º extração	CCA/UNIVASF	240,707 ± 0,98	111,815 ± 1,22
Fr. AcOEt Brotos Ext. EtOH	CCA/UNIVASF	218,514 ± 1,03	97,259 ± 1,46
Fr. MeOH H₂O-brotos jurema	CCA/UNIVASF	122,482 ± 0,55	107,885 ± 0,75
Ext. EtOH (2) - brotos jurema	CCA/UNIVASF	42,855 ± 1,22	206,583 ± 6,17
Fr. Hexano - brotos jurema	CCA/UNIVASF	42,201 ± 0,28	25,364 ± 0,44

A extração usando acetato de etila (AcOEt), solvente de polaridade mediana, conseguiu arrastar consigo uma grande proporção de compostos flavonoides e fenólicos indicando assim a natureza de grande parte dos compostos presentes no extrato.

Quanto maior a polaridade do solvente (MeOH:H₂O > AcOEt > Hexano) maior a facilidade de extrair compostos flavonoides da mistura, enquanto etanol consegue obter uma fração maior de compostos fenólicos.

A extração usando hexano como solvente é a que conseguiu obter a menor extração de teores fenólicos e flavonoides indicando a presença minoritária de compostos apolares na composição da própolis.

5. CONCLUSÕES

As concentrações de fenólicos e flavonoides nas amostras dos brotos de Jurema são bastante elevados em comparação com os extraídos da própolis analisada e de extratos de mel de abelhas (Santisteban et al 2019). As análises da amostra evidenciam que nela existe atividade biológica em potencial, apesar dos resultados diferirem dos perfis de outras amostras de própolis de *A. mellifera* apresentadas na literatura, que, como discutido anteriormente, reforça que fatores como vegetação visitada pela abelha, incidência de voo, estação do ano, método de coleta, entre outros, afetam as características da própolis produzida. Os resultados sobre a atividade antirradicalar da própolis de *A. mellifera* produzida no sertão brasileiro mostram que existe uma variação no conteúdo fenólico total em comparação com outras amostras de própolis da mesma abelha. A própolis desta abelha é uma fonte rica de compostos bioativos com potencial antioxidante por causa da presença de compostos fenólicos. A comparação dos cromatogramas das frações AcOEt da própolis marrom e dos brotos de Jurema demonstra que existe uma correlação entre as duas amostras, o que possivelmente indica que as substâncias encontradas nas duas apresentarão um alto nível de semelhança.

A análise palinológica da amostra de própolis marrom coletada em Juazeiro, na Bahia, indica um perfil heterofloral com grande predomínio da Jurema Preta, reforçando a possibilidade dos compostos futuramente isolados terem perfil químico semelhante.

Os teores de flavonoides e fenólicos extraídos dos brotos de Jurema Preta são comparativamente mais elevados que os obtidos na amostra de própolis marrom. As extrações utilizando diferentes solventes indicam uma maior proporção de compostos polares e medianos na composição da própolis.

Como perspectiva futura, pretende-se realizar o estudo químico em todas as frações das amostras para identificação e isolamento dos compostos que apresentarem potencial para futuras investigações, bem como explorar outras possíveis atividades biológicas das amostras.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHANI, A.; HOSSEINZADEH, J.; ASHORI, A.; ESMAEELI, H. **Evaluation of the Antibacterial Activity of Cellulose Nanofibers/Polylactic Acid Composites Coated With Ethanolic Extract of Propolis Ali**. *Polymers and Polymer Composites*, vol. 16, no. 2, p. 13–19, 2017.
- ABDULRHMAN, M.; SAMIR EL BARBARY, N.; AHMED AMIN, D.; SAEID EBRAHIM, R. **Honey and a mixture of honey, beeswax, and olive oil propolis extract in treatment of chemotherapy-induced oral mucositis: A randomized controlled pilot study**. *Pediatric Hematology and Oncology*, vol. 29, no. 3, p. 285–292, 2012.
- AFROUZAN, H.; ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; MOLASALEHI, S.; TAHGHIGHI, A.; SHOKRGOZAR, M. A.; ES-HAGHI, A.; DJADID, N. D. **Anti-plasmodial assessment of four different Iranian propolis extracts**. *Archives of Iranian Medicine*, vol. 20, no. 5, p. 270–281, 2017.
- AHMED, R.; TANVIR, E. M.; HOSSEN, M. S.; AFROZ, R.; AHMMED, I.; RUMPA, N. E. N.; PAUL, S.; GAN, S. H.; SULAIMAN, S. A.; KHALIL, M. I. **Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats**. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 1, no. 1, p. 1–12, 2017.
- ALVAREDA, E.; MIRANDA, P.; ESPINOSA, V.; PARDO, H.; AGUILERA, S.; PAULINO ZUNINI, M. **Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape**. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 33, no. sup1, p. 129–129, 2015.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. **Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region**. *Food Research International*, vol. 101, no. September, p. 129–138, 2017.
- ANJUM, S. I.; ULLAH, A.; KHAN, K. A.; ATTAULLAH, M.; KHAN, H.; ALI, H.; BASHIR, M. A.; TAHIR, M.; ANSARI, M. J.; GHRAMH, H. A.; ADGABA, N.; DASH, C. K. **Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review**. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 7, p. 1695–1703, 2019. DOI 10.1016/j.sjbs.2018.08.013.
- AZEVEDO, IBS; SAMPAIO, RF; MONTES, JC; CONTRERAS, RLL. **Tratamento de escaras de decúbito com própolis**. *Rev Bras Enferm*. 1986;39(2/3):33-7.
- BANKOVA, V. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, n.1/2, p.114-117, 2005.
- BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J. K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I. E. KADOTA, S. **Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities**. *Journal of Natural Products*, v. 29, p. 896-900, 1998.

BARBOSA, A. de L.; PEREIRA, F. de M.; NETO, J. M. V.; REGO, J. G. de S.; LOPES, M. T. do R.; CAMARGO, R. C. R. **Criação de abelhas: Apicultura**. Embrapa In. Brasília-DF: [s. n.], 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT - Food Science and Technology, vol. 28, no. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, conforme consta dos anexos desta instrução normativa**. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 24

BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. **The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity**. Natural Product Research, vol. 31, no. 11, p. 1318–1324, 2017.

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

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; DA CUNHA, A. P. **Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 51, no. 3, p. 742–745, 2003.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F.. **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. Fitoterapia, 73(1), S1–S6. 2002.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.. **Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica**. Quim. Nova, Vol. 30, No. 7, 1512-1516, 2007.

CHEN, W.; TU, X.; WU, D.; GAO, Z.; WU, S.; HUANG, S. **Comparison of the partition efficiencies of multiple phenolic compounds contained in propolis in different modes of acetonitrile–water-based homogenous liquid–liquid extraction**. Molecules, vol. 24, no. 3, p. 1–11, 2019.

COELHO, J.P.M. **Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil**. Dissertação (Farmácia e Química de Produtos Naturais) - Universidade de Salamanca. Bragança, 2013.

CUNHA, M. H. da. **Composição química e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de própolis preta**. 2018. 49f. Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

DA SILVA FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D. O.;

SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. **Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis**. Food and Chemical Toxicology, vol. 52, p. 137–142, 2013.

DAUGSCH A, MORAES C, FORT P, PARK Y. **Brazilian Red Propolis Chemical composition and botanical origin**. Evid Based Complement Alternat Med. 2008;5(4):435-41.

DE CASTRO, S. L. Propolis: **Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product**. ARBS annu. rev. biomed. sci, v. 3, p. 49-83, 2001. 32

DUTRA, R. P.; DE BARROS ABREU, B. V.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. **Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee melipona fasciculata smith**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 62, no. 12, p. 2549–2557, 2014.

FERNANDES NETO, José. **Estudo de viabilidade da própolis produzida pelas abelhas Apis mellifera em comunidades rurais do município de Remanso-BA**. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, Bahia, 2019.

GALEOTTI, F.; MACCARI, F.; FACHINI, A.; VOLPI, N. **Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products**. Foods, vol. 7, no. 3, 2018.

GHISALBERTI, E.L. **Própolis: a review**. Bee World, v.60, p.59-84. 1979.

HARFOUCH, R. M.; MOHAMMAD, R.; SULIMAN, H. Antibacterial Activity of **Syrian Propolis Extract Against Several Strains of Bacteria in Vitro**. www.wjpps.com. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 6, no. February, p. 2013–2018, 2017.

HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BROWEN WH, IKEGAKI M, CURY JA. **In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development**. J Ethnopharmacol, 2005, 101: 110-115.

HELFENBERG, K.D.; **The analysis of beeswax and propolis** Chem. Ztg. 31, 987. 1908.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, no. 6, p. 1841–1856, 2005.

IOIRISH, N.; As Abelhas: **Farmacêuticas com Asas**, Editora Mir: Moscou, p. 228. 1982.

IULIU, P.; Patente No. RO 48101 1965. 33

KRÓL, W.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M.; SZLISZKA, E.; CZUBA, Z.; KUROPATNICKI, A. K. **Propolis : Properties , Application , and Its Potential**. vol. 2013, p. 2–4, 2013. .

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

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. **Chemical constituents of red Mexican**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58, 2209-2213. 2010.

LUSTOSA, S.R. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife/PE. 2007.

MACHADO, B.; PULCINO, T.; SILVA, A.; MELO, D.; SILVA, R.; MENDONÇA, I. **Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity**. Journal of Apitherapy, vol. 1, no. 2, p. 47, 2016.

MARCUCCI, M. C. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis**. Química Nova, v. 19 (5), p. 529-535, 1996.

MARKHAM, R. K.; MITCHEL, K.A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. **HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in new Zealand propolis**. Phytochemistry, Oxford, v.42, n.1, p. 205-211, 1996.

MATSUNO, T. **O efeito terapêutico da própolis**. 1ª ed., São Paulo, Nair Tazue Itice, 1997. 34

MAZZUCO, H.; DE ME SILVA, R.D.; BERCHIERI, A.; DE MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I.T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. **Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and vespaee nidus**. Journal of Traditional Medicines, v.53, p.1-5, 1996.

MENEZES, H., JR, M. B., OLIOVEIRA, S. D. E PAGNOCCA, F. C. **Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil**. Apidologie, v. 28 (2), p. 71-76, 1997.

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

NOTHENBERG, M. **Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas**. Química e Derivados, v. 348, p. 24-28, 1997.

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

PANDEY, R.C. **Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources**. Med. Res. Rev., 18: 333-346, 1998.

PARK, Y. K. et al. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** Ciênc Rural, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M. E CONTADO, J. L. **Comparison of the flavonoid aglycone contents of Apis mellifera propolis from various regions of Brazil.** Arquivos de biologia e tecnologia, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. P., IKEGAKI, M., ABREU, J. A. D. S. E ALCICI, N. M. F. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18 (3), p. 1998.

PARK, Y.K. et al. **Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, p. 1.100-1.103, 2004.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** Journal Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 2.502-2.506, 2002.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. **Antimicrobial activity of propolis on oral micro organisms.** CurrentMicrobiology, v.36, p.24-28, 1998.

PARK, Yong Kun et al. **Comparação das características físico-químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: evidência fitoquímica de sua origem botânica.** Análise, v. 13, p. 8, 2001. 35

PARK, Yong Kun; IKEGAKI, Masaharu; ALENCAR, SM de. **Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas.** Mensagem doce, v. 58, n. 9, p. 3-7, 2000.

PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. **Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Quimica Nova, v. 25, p. 321-326, 2002.

PERUCHI, CMS; SILVA, EB; ANDRADE, RA; FRANCO, SL; RAMATHO, LTO. **Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico.** Rev Fac Odontol Univ Chile. 2001;19(2):23-34.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; NAYDENSKY, CH.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. **Comparative study of the biological activity of própolis from different geographic origem: a statistical approach.** Macedonian Pharmaceutical Bulletin, v.50, p.9-14, 2004.

RAMOS, M.F.S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1995.

REAÇÃO de polimerização em cadeia. Disponível em:
<<http://www.biologianaweb.com/Livro2/C11/pcr.html>> Acesso em: 16 ago. 2019.

ACKERMANN, T. **Fast Chromatographic study of propolis crudes**. Food Chemistry, v. 42, p. 135-138, 1991.

ROCHA L, DOS SANTOS LR, ARCENIO F, CARVALHO ES, LÚCIO EMRA, ARAÚJO GL, TEIXEIRA LA, SHARAPIN N. **Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana**. Rev Bras Farmacogn 2003. 13: 71-74.

RUSSO, A., LONGO, R. E VANELLA, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and gaiangin**. Fitoterapia, v. 73, p. S21-S29, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGREI, G.; MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evidencebased Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SERRA, J. & ESCOLA, R. **A study on the bacteriostatic activity of propolis**. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, v.91, p.242-246, 1995.

SFORCIN, J.M.; JR. A. FERNANDES; C.A.M. LOPES; V. BANKOVA; S.R.C.FUNARI: **“Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity”**. Journal of Ethnopharmacology, 73, 243-249, 2000. 36

SFORCIN, JM FERNANDES JÚNIOR, A; LOPES, CAM; FUNARI, SRC; BANKOVA, V. **Seasonal effect of brazilian propolis on Candida albicans and Candida tropicalis**. J Venom Anim Toxins. 2001;7(1):139-44.

SHU, Y.Z. **Recent natural products based drug development:A pharmaceutical industry perspective**. Journal of Natural Products, 61: 1053-1071, 1998.

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

SILVA, Rosilene Agra da; et al. **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil**. Ciência Rural, [s.l.], v. 36, n. 6, p.1842-1848, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

SOARES AKA, CARMO GC, QUENTAL DP, NASCIMENTO DF, BEZERRA FAF, MORAES MO, MORAES MEA 2006. **Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo Mikania glomerata, Grindelia robusta, Copaifera officinalis, Myroxylon toluifera, Nasturtium officinale, própolis e mel em voluntários saudáveis**. Rev Bras Farmacogn 16: 447-454.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M.; et al. **In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs**. Microbiol Res, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. **Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v.2, n.1, p.85- 92, 2005.

TEIXEIRA, E.; MESSAGE, D.; MEIRA, R.; SALATINO, A.;. **Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas.** Boletim de Indústria Animal, v. 60, n. 1, p. 83-106, 2003.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. **Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela.** Phytochemistry, Oxford, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I. **Bioactive constituents of Brazilian red propolis.** CAM 2006. 3: 249- 254.

UZEL A, SORKUN K, ÖNÇAG Ö, ÇOGULO D, GENÇAY Ö, SALIH B. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** Microbiol Res, 2005, 160: 189-195.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; **Propolis I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique.** J. Pharm. Belg. 1979, 34, 253-259.

VARGAS, AC; LOGUERCIO, AP; WITT, NM; COSTA, MM; SILVA, MS; VIANA, LR. **Atividade antimicrobiana .in vitro. de extrato alcoólico de própolis.** Ciênc Rural. 2004;34(1):159-63.

VERPOORTE, R. **Exploration of nature´s chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development.** Drug Discovery Today, 3:232-238, 1998. 37.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control.** Journal of Apicultural Research, vol. 37, no. 2, p. 99–105, 1998.