

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

MICHELLINE VIVIANE MARQUES DAS NEVES

FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
IGARASSU, PERNAMBUCO, BRASIL

JOÃO PESSOA - PB

2014

MICHELLINE VIVIANE MARQUES DAS NEVES

**FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
IGARASSU, PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

1º ORIENTADOR: Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

2º ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

JOÃO PESSOA - PB

2014

N518f Neves, Michelline Viviane Marques das.
Fracionamento biomonitorado da própolis vermelha de Igarassu, Pernambuco, Brasil / Michelline Viviane Marques das Neves.- João Pessoa, 2014.
184f. : il.
Orientadores: Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha, Eduardo de Jesus Oliveira
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica. 3. Própolis vermelha. 4. Fracionamento biomonitorado. 5. Perfil palinológico.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

MICHELLINE VIVIANE MARQUES DAS NEVES

**FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
IGARASSU, PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese defendida e aprovada em 25/08/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Strathclyde
Departamento de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba
(1º Orientador)

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Strathclyde
Departamento de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba
(2º Orientador)

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba
Departamento de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba
(Membro I - Interno)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Doutora em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Departamento de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba
(Membro II - Interno)

Profa. Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Departamento de de Ciências Moleculares - Universidade Federal Rural de Pernambuco
(Membro III - Externo)

Prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo
Departamento de Ciências Biológicas- Universidade Estadual de Feira de Santana
(Membro IV - Externo)

DEDICATÓRIA

A minha mãe Ivone Marques por ser o pilar da minha família, uma mulher forte, sábia, guerreira, corajosa e de muita fé, que em todos os momentos esteve comigo. Ao meu sobrinho Luquinhas por ser o melhor presente que recebi durante essa jornada. Ao meu namorado Lucas por ser um amigo fiel e um companheiro pra todas as horas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, nunca me desamparando e principalmente por todo o seu cuidado comigo.

A minha família, minha mãe Ivone Marques, que sempre abdicou de suas prioridades por amor a mim e a meus irmãos. Ao meu pai Rivaldo Barbosa, que me ajudou a conquistar a aprovação no doutorado. Aos meus irmãos Alexsandra Marques e Rivaldo Júnior. Ao meu sobrinho Luquinhas, o amor da minha vida. Ao meu namorado Lucas, que esteve comigo durante essa caminhada.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, através da bolsa cedida.

Ao Laboratório de Análises Farmacêuticas (LAFAM) onde eu convivi durante o doutorado.

Ao professor Eduardo de Jesus Oliveira, que exerceu um papel fundamental no desempenho deste trabalho e que em todo tempo foi um orientador presente e a quem eu considero ser um homem de grande caráter e um ser humano exemplar.

Aos respectivos colaboradores, na palinologia: prof. Francisco dos Santos e sua aluna Vanessa Matos; na farmacoquímica: prof. Tânia Sarmento e seus alunos Telma Guedes, Girliane Regina e Paulo da Silva, prof. Ticiano Gomes; na farmacologia: prof. Edeltrudes de Oliveira, prof. Rosane Castro e seus alunos, prof. Márcia Rosa e suas alunas Cinthia Nóbrega e Juliana Câmara, prof. Magna Suzana, prof. Demétrius de Araújo e sua aluna Bruna Braga.

Aos técnicos, Raimundo Nonato, pela ajuda nos ensaios de screening fitoquímico e Sócrates Golzio, pela ajuda nas análises cromatográficas.

Aos apicultores Janduhi e Arnaldo que cederam as amostras de própolis vermelha.

A minha orientadora de mestrado professora Vera Arroxelas que teve uma grande contribuição para o meu ingresso no doutorado.

RESUMO

A própolis é uma mistura heterogênea de compostos e é produzida por abelhas a partir de vegetais encontrados próximos às colmeias. É classificada de acordo com a origem botânica e a composição química que pode variar entre as regiões. Estudos têm demonstrado que a própolis vermelha possui características físico-químicas e biológicas diferenciadas. No estado de Pernambuco, até o momento são poucos os trabalhos realizados com a própolis vermelha, e não há na literatura estudos com a própolis vermelha de Igarassu – PE, com isso sua origem botânica, caracterização química e suas atividades farmacológicas, ainda não estão definidas. O objetivo deste estudo foi realizar um fracionamento biomonitorado de duas amostras de própolis vermelha, coletadas em Igarassu – PE, a fim de determinar os compostos responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante, antileucêmica e antileishmania, além de traçar um perfil palinológico. As amostras de própolis vermelha foram coletadas em Igarassu-PE, na forma *in natura*, em maio de 2012, em dois apiários. Foram submetidas à análise palinológica, para identificação dos grãos de pólen e dos tipos polínicos presentes. Em seguida, as amostras *in natura* foram trituradas, extraídas em etanol 96% e concentradas obtendo-se o extrato etanólico bruto seco. Esse extrato foi suspenso em uma mistura de metanol-água (1:1) e fracionado por separação líquido-líquido com hexano e acetato de etila, obtendo-se as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica. A fração acetato foi refracionada em coluna de Sephadex LH-20 para isolamento dos compostos. A própolis *in natura* foi submetida ao screening fitoquímico preliminar. O extrato etanólico foi avaliado para identificação dos compostos por CLAE-EM. A própolis *in natura*, extrato etanólico, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica foram submetidas a análise do perfil cromatográfico por CLAE, análise do perfil fenólico, identificação e quantificação de compostos fenólicos e avaliação das atividades farmacológicas. Nas amostras *in natura*, foram encontrados 28 tipos polínicos, pertencentes a 16 famílias e 30 gêneros botânicos. Os tipos polínicos que apareceram em maior frequência foram: *Serjania* e *Dalbergia* (amostra 1-abril de 2011), Fabaceae 1 e *Dalbergia* (amostra 2-abril de 2011), *Stigmaphyllon* (amostra 1 e 2-maio de 2012). Verificou-se a presença de flavonoides e esteroides na própolis *in natura*. Foram identificados 25 compostos no extrato etanólico bruto das amostras 1 e 2 de própolis vermelha, onde as principais substâncias identificadas pertencem à classe dos flavonols, flavanas, isoflavonas, pterocarpanos e benzofenonas preniladas, demonstrando a utilidade da técnica de LC - Orbitrap - FTMS. O perfil químico das amostras 1 e 2 de própolis vermelha são caracterizados pela presença de benzofenonas. Na própolis *in natura*, extrato etanólico, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica, foram identificadas e quantificadas 8 substâncias, sendo 1 ácido fenólico e 7 flavonoides. Na fração acetato de etila da amostra 1, foi isolada a isoflavona formononetina. Observa-se que ao longo do fracionamento, partindo da própolis *in natura* triturada até a substância isolada formononetina, houve um aumento no poder fungistático. Em relação a atividade antioxidante, medida pelo método de DPPH, observou-se que todas as amostras apresentaram poder antioxidante, com exceção da substância isolada. Em ordem decrescente, em relação ao poder antioxidante, as amostras mais apolares tiveram maior atividade que as amostras polares. Tanto a própolis *in natura* triturada assim como o extrato etanólico bruto apresentaram forte atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. A atividade antileucêmica também aumentou ao longo do fracionamento, sobre a linhagem celular HL-60.

Palavras-chave: fracionamento biomonitorado, própolis vermelha, perfil palinológico.

ABSTRACT

Propolis is an heterogeneous mixture of substances, produced by melliferous bees from plants in close proximity with the bee's hives. It is usually classified according to its botanical origin and chemical composition that vary according to geographical origin. Studies have shown that red propolis have physicochemical and biological properties that are diverse from other propolis types. There is a scarcity of studies with Brazilian red propolis, and no study with the red propolis from Igarassu (PE, Brazil), and thus its botanical origin, chemical characterization, and pharmacological activities have not been determined. The aim of this study was to perform a bioassay-guided fractionation of two propolis samples, collected from Igarassu, in order to determine the substances responsible for its antimicrobial, antioxidant, antileukemic and leishmanicidal activities, as well as its palynological profile. The samples of propolis were collected in Igarassu-PE, *in natura*, in May 2012 in two apiaries. They were submitted to palynological analyses to identify the pollen types and their frequency in the samples. Then, samples *in natura* were powdered, extracted with 96% ethanol and concentrated to obtain the crude ethanol extract. This extract was dissolved in a mixture of methanol:water (1:1, v/v) and partitioned with hexane and ethyl acetate, obtaining the hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. The acetate fraction was submitted to column chromatography with Sephadex LH20 for isolation of the compounds. The propolis *in natura* was subjected to preliminary phytochemical screening. The ethanol extract was evaluated for identification of compounds by HPLC-MS. The propolis *in natura*, ethanol extract, hexane fraction, ethyl acetate and hydroalcoholic were submitted to HPLC analysis for identification and quantification of phenolic compounds. A total of 28 different pollen types belonging to 16 families and 30 genera were found in the samples. The most frequent were: *Serjania* and *Dalbergia* (sample 1 – April 2011), Fabaceae 1 and *Dalbergia* (sample 2 – April 2011), *Stigmaphyllon* (sample 1 and 2 – May 2012). It was found the presence of flavonoids and steroids in propolis *in natura*. Twenty five compounds were identified in the crude ethanol extract of the samples 1 and 2. The major compounds belong to the class of flavonols, flavanas, isoflavones and prenylated benzophenones pterocarpanes, demonstrating the usefulness of the technique of LC - Orbitrap - FTMS. The chemical profile of samples 1 and 2 of propolis are characterized by the presence of benzophenone. In propolis *in natura*, ethanol extract, hexane fraction, ethyl acetate and hydroalcoholic, we were able to identify and quantify 8 substances, 1 phenolic acid and 7 flavonoids. In the ethyl acetate fraction of sample 1 the isoflavone formononetin was isolated. It is observed that during the fractionation, starting from propolis *in natura* crushed to formononetin isolated substance, there was an increase in fungistatic power. It is observed that with fractionation, starting from propolis *in natura* to formononetin isolated substance, there was an increase in fungistatic power. Regarding antioxidant activity against DPPH radical, it was observed that all samples showed antioxidant power, with the exception of isolated formononetin. In descending order, in relation to antioxidant power, the most nonpolar samples had higher activity than polar samples. Both propolis *in natura* as crude ethanol extract showed strong activity against *Leishmania promastigotes* of *L. amazonensis*. The antileukemic activity on the cell line HL-60 also increased with fractionation.

Keywords: bioassay-guided fractionation, red propolis, palynological profile, formononetin.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 - A. Visualização de um dos apiários fornecedor da própolis vermelha. B. Apicultores coletando. C. Aspecto da própolis vermelha <i>in natura</i> nos coletores instalados nas colmeias. D. Detalhe das abelhas <i>Apis mellifera</i> dentro dos coletores. E-F. Detalhe das amostras de própolis vermelha. Foto: ©Michelline Marques.....	38
Figura 2 - A. Amostra de própolis na forma <i>in natura</i> . B. Detalhe de favos de mel na amostra. Foto: ©Michelline Marques.....	39
Figura 3a - A. Amostra 1 de própolis vermelha <i>in natura</i> . A.1. Trituração com nitrogênio líquido. A.2. Amostra 1 de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada. Foto: ©Michelline Marques.....	40
Figura 3b - B. Amostra 2 de própolis vermelha <i>in natura</i> . B.1. Trituração com nitrogênio líquido. B.2. Amostra 1 de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada. Foto: ©Michelline Marques.....	40
Figura 4 – A - C. Etapas da trituração mecânica em liquidificador. Foto: ©Michelline Marques.....	40
Figura 5 - Etapas da preparação do extrato etanólico bruto. Foto: ©Michelline Marques.....	42
Figura 6 – Etapas do fracionamento e pré-purificação do extrato etanólico bruto. Foto: ©Michelline Marques.....	42
Figura 7 - Fluxograma do fracionamento e isolamento biomonitorado de compostos químicos com atividades farmacológicas da própolis vermelha.....	43
Figura 8 - Estrutura química dos padrões identificados e quantificados nas amostras por CLAE.....	49
Figura 9 - Soluções estoques (2 mg/mL, DMSO) de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada e do extrato etanólico bruto das amostras 1 e 2. 1E – extrato etanólico bruto da amostra 1. 1I – <i>in natura</i> triturada da amostra 1. 2E – extrato etanólico bruto da amostra 2. 2I – <i>in natura</i> triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques.....	52
Figura 10 - Soluções estoques das frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica (2 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2. 1H – fração hexânica da amostra 1. 1A - fração acetato de etila da amostra 1. 1M – fração hidroalcoólica da amostra 1. 2H – fração hexânica da amostra 2. 2A - fração acetato de etila da amostra 2. 2M – fração	52

hidroalcoólica da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques.....	
Figura 11 - Ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA..	57
Figura 12 - A. Soluções estoques (20 mg/mL, DMSO) e B. Soluções trabalho (2 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2 de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada e do extrato etanólico bruto seco. 1E – extrato etanólico bruto da amostra 1. 1I – <i>in natura</i> triturada da amostra 1. 2E – extrato etanólico bruto da amostra 2. 2I – <i>in natura</i> triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques.....	60
Figura 13 - Soluções estoques (20 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2 de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada e extrato etanólico bruto. 1E – extrato etanólico bruto da amostra 1. 1I – <i>in natura</i> triturada da amostra 1. 2E – extrato etanólico bruto da amostra 2. 2I – <i>in natura</i> triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques.....	63
Figura 14 - Microfotografia de contraste de fase em microscópio óptico invertido. Aumento: 400 x. A. Linhagem celular HL-60. B. Linhagem celular K562.....	65
Figura 15 - Tipos polínicos encontrados nas amostras de própolis vermelha estudadas de Igarassu, estado de Pernambuco, Brasil. A. <i>Borreria</i> . B. <i>Dalbergia</i> . C. Fabaceae 1. D. Fabaceae 2. E. Fabaceae 3. F. <i>Ficus</i> . G. Poaceae. H. <i>Psychotria</i> . I. <i>Richardia</i> . J. <i>Schinus</i> . K. <i>Serjania</i> . L. <i>Stigmaphyllon</i> . M. <i>Syagrus</i> . N. <i>Venonanthura</i>	69
Figura 16 – Esquema demonstrativo dos rendimentos das amostras 1 e 2 de própolis vermelha.....	74
Figura 17 - Estrutura da isoflavona formononetina.....	75
Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H (DMSO - D6 - 300 MHz) de formononetina.....	78
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ¹ H (DMSO - D6 - 300 MHz) de formononetina na região de 6,9 – 8,4 ppm.....	79
Figura 20 – Espectro de RMN ¹³ C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina.....	80
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ¹³ C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina na região de 60 – 180 ppm.....	81
Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ¹³ C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina na região de 105 – 165 ppm.....	82
Figura 23 – Cromatograma de íons totais (m/z 100-1200, traço superior) e de ultravioleta (traço inferior) do extrato etanólico bruto da amostra 1 de própolis vermelha.....	88
Figura 24 – Cromatograma de íons totais (m/z 100-1200, traço superior) e de	89

ultravioleta (traço inferior) do extrato etanólico bruto da amostra 1 de própolis vermelha.....	
Figura 25 – Espectro do pico 4 (3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano), $[M-H]^{-T} = 285.0763$ e $[M-H]^{-E} = 285.0756$	90
Figura 26 – Espectro do pico 6 (Liquiritigenina) e 10 (Pinocembrina), $[M-H]^{-T} = 255.0657$ e $[M-H]^{-E} = 255.0651$	90
Figura 27 – Espectro do pico 7 (Formononetina), $[M-H]^{-T} = 267.0657$ e $[M-H]^{-E} = 267.0652$	91
Figura 28 – Espectro do pico 11 (Biochanina A), $[M-H]^{-T} = 283.0606$ e $[M-H]^{-E} = 283.0601$	91
Figura 29 – Espectro do pico 20 (Gutiferona E) e pico 21 (Cicloxantochimol), $[M-H]^{-T} = 601.3529$ e $[M-H]^{-E} = 601.3517$	92
Figura 30 – Espectro do pico 23 (Gutiferona N), $[M-H]^{-T} = 585.3580$ e $[M-H]^{-E} = 585.3576$	92
Figura 31 – Espectro do pico 25 (Gutiferona B), $[M-H]^{-T} = 669.4155$ e $[M-H]^{-E} = 669.4147$	93
Figura 32 – Estrutura química das substâncias tentativamente identificadas nas amostras de 1 e 2 de própolis vermelha através de análise por espectrometria de massas de alta resolução usando ionização por electrospray em modo negativo e Orbitrap-FT (LC/MS, ESI ⁻ , Orbitrap-FT). O número entre parenteses refere-se ao número do pico nos cromatogramas das Figuras 24 e 25.....	94
Figura 33 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada da amostra 1 obtido por CLAE.....	98
Figura 34 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 1 obtido por CLAE.....	99
Figura 35 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 1 obtido por CLAE.....	100
Figura 36 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 1 obtido por CLAE.....	101
Figura 37 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 1 obtido por CLAE.....	102
Figura 38 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada da amostra 2 obtido por CLAE.....	103

Figura 39 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 2 obtido por CLAE.....	104
Figura 40 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 2 obtido por CLAE.....	105
Figura 41 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 2 obtido por CLAE.....	106
Figura 42 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 2 obtido por CLAE.....	107
Figura 43 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.....	109
Figura 44 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.....	110
Figura 45 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.....	111
Figura 46 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.....	112
Figura 47 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.....	113
Figura 48 – Perfil cromatográfico do ácido ferúlico na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	116
Figura 49 – Perfil cromatográfico da rutina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	117
Figura 50 – Perfil cromatográfico da daidzeína na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	118
Figura 51 – Perfil cromatográfico da quercetina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	119
Figura 52 – Perfil cromatográfico da luteolina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	120
Figura 53 – Perfil cromatográfico da formononetina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	121
Figura 54 – Perfil cromatográfico da pinocembrina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.....	122
Figura 55 – Perfil cromatográfico da biochanina A na concentração de 100 µg/mL	123

obtido por CLAE.....	
Figura 56 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 0,5 µg/mL	124
obtido por CLAE.....	
Figura 57 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 4 µg/mL	125
obtido por CLAE.....	
Figura 58 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 20 µg/mL	126
obtido por CLAE.....	
Figura 59 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 40 µg/mL	127
obtido por CLAE.....	
Figura 60 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 80 µg/mL	128
obtido por CLAE.....	
Figura 61 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 100 µg/mL	129
obtido por CLAE.....	
Figura 62 - Curva de calibração do ácido ferúlico criada a partir das concentrações	130
0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões	
juntos.....	
Figura 63 – Curva de calibração da biochanina A criada a partir das concentrações	130
0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões	
juntos.....	
Figura 64 – Curva de calibração da daidzeína criada a partir das concentrações 0,5,	131
4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos..	
Figura 65 – Curva de calibração da formononetina criada a partir das concentrações	131
0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões	
juntos.....	
Figura 66 – Curva de calibração da luteolina criada a partir das concentrações 0,5, 4,	132
20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.....	
Figura 67 – Curva de calibração da pinocembrina criada a partir das concentrações	132
0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões	
juntos.....	
Figura 68 – Curva de calibração da quercetina criada a partir das concentrações 0,5,	133
4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos..	
Figura 69 – Curva de calibração da rutina criada a partir das concentrações 0,5, 4,	133
20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.....	

Figura 70 - Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da própolis vermelha <i>in natura</i> triturada e do extrato etanólico bruto da amostra 1.....	148
Figura 71 - Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da própolis vermelha <i>in natura</i> triturada e do extrato etanólico bruto da amostra 2.....	150

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1 - Determinação da presença / ausência dos grupos químicos nas duas amostras de própolis vermelha coletadas em maio de 2012.....	45
Tabela 2 – Amostras utilizadas na avaliação das atividades farmacológicas.....	51
Tabela 3 – Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos.....	53
Tabela 4 – Tipos polínicos (%) presentes nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha coletadas em maio de 2012 em Igarassu – PE.....	71
Tabela 5 - Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C da formononetina isolada da amostra 1 de própolis vermelha.....	76
Tabela 6 - Triagem fitoquímica realizada com duas amostras de própolis vermelha coletadas em maio de 2012.....	84
Tabela 7 – Dados de espectrometria de massas de alta resolução das substâncias identificadas nas amostras 1 e 2 de própolis (para o número do pico, referir-se aos cromatogramas das Figuras 24 e 25).....	87
Tabela 8 – Tempo de retenção (min.) e área dos padrões de compostos fenólicos injetados separadamente em triplicata na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	134
Tabela 9 – Tempo de retenção (min.) e área dos padrões de compostos fenólicos injetados juntos em triplicata na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	134
Tabela 10 – Conteúdo dos compostos fenólicos nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha ($\mu\text{g/mg}$ de amostra).....	135
Tabela 11 - Fenólicos totais e flavonoides totais nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha.....	137
Tabela 12 - Concentração inibitória mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha.....	140
Tabela 13 - Concentração fungicida mínima – CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha.....	143
Tabela 14 - Avaliação da atividade antioxidante de própolis vermelha.....	146
Tabela 15 - Taxa de inibição (%) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha sobre promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	150
Tabela 16 - Concentração inibitória ($\mu\text{g/mL}$) de 50% do crescimento (CI_{50}) das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença da amostra 1, 2 e da	151

formononetina de própolis vermelha.....

Tabela 17 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação 152
das células HL-60 e K562 com a amostra 1, 2 e da formononetina de própolis
vermelha por um período de 24 h e 72 h.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazil

HL-60: leucemia promielocítica aguda

CCDA: cromatografia de camada delgada analítica

UV-visível: espectroscopia no ultravioleta visível

ABTS: [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio]

FRAP: poder antioxidante de redução do íon férrico

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

Fr. Hex: fração hexânica

Fr. AcOEt: fração acetato de etila

Fr. HA: fração hidroalcoólica

RMN de ^1H e ^{13}C : ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono

NP: reagente ácido difenilbórico etanolamina em MeOH

GAE mg/g: miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra

QE mg/g: miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra

UFC/mL: unidade formadora de colônia por mililitros

CIM: concentração inibitória mínima

TTC: cloreto de trifenil tetrazelium

CFM: concentração fungicida mínima

CBM: concentração bactericida mínima

AA: atividade antiradicalar

CE₅₀: concentração capaz de eliminar 50% do radical antioxidante

UV: ultravioleta

CI₅₀: concentração capaz de inibir 50% do crescimento

SBF: soro bovino fetal

K562: leucemia mielógena crônica humana

ANOVA: análise de variância

SUMÁRIO

	pág.
1 – INTRODUÇÃO.....	21
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 – Própolis.....	25
2.2 - Origem botânica.....	26
2.3 – Composição química.....	27
2.4 – Atividades biológicas.....	29
2.4.1 – Atividade antimicrobiana.....	30
2.4.2 – Atividade antioxidante.....	30
2.4.3 – Atividade antileishmania.....	31
2.4.4 – Atividade antileucêmica.....	32
3 – OBJETIVOS.....	34
3.1 – Objetivo Geral.....	35
3.2 – Objetivos Específicos.....	35
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 - Coleta das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i>	38
4.2 – Limpeza das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i>	38
4.3 – Análise palinológica das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i>	39
4.4 – Preparo das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i> triturada.....	39
4.5 - Preparo do extrato etanólico bruto.....	41
4.6 - Fracionamento e pré-purificação do extrato etanólico bruto.....	41
4.7 - Fracionamento e purificação da fração acetato de etila.....	44
4.8 – Isolamento e identificação do composto químico.....	44
4.9 - Análise físico-química da própolis <i>in natura</i> triturada.....	44
4.9.1 - <i>Screening</i> fitoquímico preliminar.....	44
4.10 – Análise físico-química do extrato etanólico bruto.....	45
4.10.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM).....	45
4.11 - Análise físico-química da própolis <i>in natura</i> triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica.....	46
4.11.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	46

4.11.2 – Identificação e quantificação dos padrões.....	47
4.12 - Análise do perfil fenólico da própolis <i>in natura</i> triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica.....	49
4.12.1 - Determinação do teor de fenólicos totais com reagente de Folin-Ciocalteu.....	50
4.12.2 - Determinação do teor de flavonas e flavonóis totais com cloreto de alumínio.....	50
4.13 – Atividades farmacológicas.....	51
4.13.1 – Amostras testadas.....	51
4.13.2 – Atividade Antimicrobiana.....	51
4.13.3 – Atividade Antioxidante.....	56
4.13.4 – Atividade Antileishmania.....	59
4.13.5 – Atividade Antileucêmica.....	63
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 - Análise palinológica das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i>	67
5.2 – Preparo e fracionamento do extrato etanólico bruto.....	73
5.3 - Fracionamento e purificação da fração acetato de etila da amostra 1.....	74
5.4 – Identificação estrutural da formononetina.....	75
5.5 - Substância isolada da fração acetato de etila da amostra 1 de própolis vermelha.....	76
5.6 - Análise físico-química da própolis <i>in natura</i> triturada.....	83
5.6.1 - <i>Screening</i> fitoquímico preliminar.....	83
5.7 – Análise físico-química do extrato etanólico bruto.....	85
5.7.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM).....	85
5.8 - Análise físico-química da própolis <i>in natura</i> triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica.....	97
5.8.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	97
5.8.2 – Identificação e quantificação dos padrões.....	114
5.9 - Análise do perfil fenólico da própolis <i>in natura</i> triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica.....	136
5.9.1 - Determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides totais.....	136

5.10 – Atividades farmacológicas.....	139
5.10.1 – Atividade Antimicrobiana.....	139
5.10.2 – Atividade Antioxidante.....	144
5.10.3 – Atividade Antileishmania.....	146
5.10.4 – Atividade Antileucêmica.....	151
6 – CONCLUSÕES GERAIS.....	154
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156
8 – ANEXOS.....	172

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

A própolis é uma composição resinosa colhida pelas abelhas melíferas de diferentes exudatos de plantas, tais como secreções de árvores, folhas e flores. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (SILVA et al., 2006). A composição química da própolis é bastante complexa e variada, destacando-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, pois é atribuída a eles grande parte das atividades biológicas constatadas para as amostras de própolis (FUNARI, FERRO, 2006).

A própolis brasileira foi classificada em 12 tipos, de acordo com o seu perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante (PARK, IKEGAZI, ALENCAR, 2000). Posteriormente, foi encontrada própolis avermelhada em colmeias localizadas ao longo do nordeste do Brasil (DAUGSCH et al., 2007). Este novo tipo de própolis foi classificada em um grupo à parte, como o 13º tipo de própolis brasileira, separado dos 12 tipos de própolis já caracterizados anteriormente (DAUGSCH et al., 2007; ALENCAR et al., 2007). E foi denominada de “própolis vermelha” por causa da sua coloração vermelha intensa e tem sido uma importante fonte de investigação desde 2007 por grupos de pesquisa nacionais e internacionais (FROZZA et al., 2013).

Existe atualmente uma demanda muito grande pela própolis Brasileira, que é comercializada pelas suas alegadas propriedades terapêuticas, incluindo a sua atividade antimicrobiana (CABRAL et al., 2009; JUNIOR et al., 2012; ANDRADE et al., 2012; FINGER et al., 2013), anti-inflamatória (ABREU, 2008), imunomoduladora (FISCHER et al., 2008), antitumoral (FRANCHI JR et al., 2012; FROZZA et al., 2013) e antiparasitária (AYRES, MARCUCCI, GIORGIO, 2007; MACHADO, LEON, CASTRO, 2007; AYRES et al., 2011; ODA et al., 2011).

O Brasil se destaca na produção mundial de própolis, sendo Minas Gerais o estado com maior produção, totalizando 29 toneladas anuais de própolis verde, comercializadas em sua maioria com vistas ao mercado externo (Boletim Agronegócio SEBRAE, acessado em 27/08/2014). Para ter-se uma ideia da importância do Brasil como produtor e exportador, 92% da própolis consumida no Japão (um dos maiores mercados do produto) é de origem brasileira. Apesar da concentração da produção de própolis em Minas Gerais, recentemente tem ganhado destaque um novo tipo de própolis, endêmica das regiões costeiras e de mangue do Nordeste Brasileiro, conhecida como própolis vermelha.

A própolis vermelha, se caracteriza por ter como origem botânica a resina da espécie *Dalbergia ecastaphylum* (conhecida popularmente como “rabo de bugio”), espécie da família Fabaceae, o que confere a este tipo de própolis a sua cor característica e a ocorrência de substâncias marcadoras como os isoflavonóides que não ocorrem em nenhum dos outros 12 tipos de própolis já descritos. A própolis vermelha tem sido alvo de inúmeros estudos químicos e farmacológicos que despertaram grande interesse da comunidade científica mundial, não apenas pelas atividades biológicas relatadas para a própolis e suas frações, como pela presença de substâncias com conhecida atividade citotóxica e antitumoral, como é o caso das benzofenonas preniladas (LÓPEZ et al., 2014).

A própolis vermelha alcança um valor até 5 vezes maior no mercado do que a própolis verde, constituindo-se assim em um produto potencialmente de alto valor agregado e em alta demanda. O grau de interesse neste material único com propriedades medicinais tão importantes, levou pesquisadores do Estado de Alagoas a buscarem em 2012 a certificação de indicação geográfica (IG) da própolis daquele Estado, num importante passo para proteção deste material e para agregar valor ao produto (Boletim Agronegócio SEBRAE, acessado em 27/08/2014).

Nunes et al. (2009) estudaram a variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha de Goiana – PE e testaram a sua bioatividade em *Artemia salina*. Galindo (2007) caracterizou o extrato de própolis vermelha de Goiana – PE, avaliou suas propriedades biológicas e desenvolveu um gel à base do extrato. Alencar et al. (2007) estudaram a composição química e a atividade biológica de própolis vermelha de Alagoas. Dausch et al. (2007) estudaram a composição química e a origem botânica da própolis vermelha brasileira coletada em cinco estados do nordeste. Truscheva et al. (2006) testaram a bioatividade dos constituintes de própolis vermelha de Maceió – AL.

Porém, no estado de Pernambuco, até o momento são poucos os trabalhos realizados com a própolis vermelha e especificamente não há na literatura estudos com a própolis vermelha de Igarassu – PE, com isso sua origem botânica, caracterização química e suas atividades farmacológicas, ainda não estão definidas. Neste contexto e considerando que o fracionamento é o passo inicial na identificação de compostos bioativos de produtos naturais (HAYACIBARA et al., 2005), o presente trabalho teve como objetivo realizar um fracionamento biomonitorado de duas amostras de própolis vermelha, coletadas em Igarassu – PE, a fim de determinar os compostos responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante, antileucêmica e antileishmania, relatadas para amostras de própolis vermelha, além de traçar um perfil palinológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Própolis

Própolis é o nome genérico para a composição resinosa de composição complexa coletada pelas abelhas a partir dos mais heterogêneos tipos de plantas (ADELMANN, 2005). A palavra própolis é derivada do grego, onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, ou seja, em defesa da cidade ou da colmeia (PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002). As abelhas (*Apis mellifera*) usam a própolis para protegê-las contra insetos e microrganismos, empregando-a em finas camadas nas paredes internas da colmeia para vedar orifícios e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colmeia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (BANKOVA, CASTRO, MARCUCCI, 2000).

Dentre outras espécies de abelhas, as do gênero *Apis* são muito eficiente na polinização de plantas e na elaboração de mel, geleia real, cera e própolis. De cada colmeia pode-se coletar entre 100 a 300 gramas de própolis por ano (PEREIRA et al., 2003). A própolis é uma composição rígida, quebradiça quando fria e que se torna dútil e maleável quando aquecida (MARCUCCI, 1996). Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra e coloração que varia do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo do tipo e idade (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998).

A própolis brasileira foi classificada em 12 tipos, segundo seu perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, CCDAE e CLAE, além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante, sendo 5 grupos encontrados na região Sul do país, 6 grupos encontrados na região Nordeste e 1 grupo encontrado na região Sudeste (PARK, IKEGAZI, ALENCAR; 2000). Recentes estudos realizados mostraram a existência de um tipo diferente de própolis, classificada como própolis do grupo 13, que foi diretamente relacionada com a planta *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) utilizada pelas abelhas para coleta de resinas e exsudatos (DAUGSCH et al., 2007; ALENCAR et al., 2007).

Um exsudato resinoso vermelho que é utilizado na fabricação da própolis vermelha do grupo 13 foi localizado no caule de arbustos ao longo das praias e costas dos rios na região nordeste do Brasil. Esse exsudato é secretado devido a ataques feitos por insetos no caule de *Dalbergia ecastaphyllum* (DAUGSCH et al., 2007).

2.2 - Origem botânica

A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta proutora de resina, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002).

A associação da origem botânica aos fatores climáticos da região implica diferenças marcantes no aspecto quantitativo e qualitativo da composição química do produto final, dificultando a obtenção de regularidade na eficácia farmacológica do produto. A determinação da origem geográfica e botânica aliada a sua composição química são de extrema importância garantindo assim uma maior qualidade da própolis produzida no Brasil (ALENCAR, 2002; TEIXEIRA et al., 2003). A própolis produzida no Brasil é muito diversificada e esse fato pode ser explicado pelos diferentes biomas existentes nas regiões de coleta os quais têm flora diferenciada e particular (MATOS, 2012).

As amostras de própolis brasileiras têm mostrado diferenças significantes na sua composição química em relação à própolis produzida nas zonas temperadas. Por essa razão, a própolis brasileira tem se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (LUSTOSA et al., 2008; RIGHI, 2008).

A análise palinológica é uma técnica valiosa na identificação das espécies vegetais que deram origem a produtos apícolas, além de contribuir assim na determinação de sua origem geográfica, o que permite fazer a distinção entre as diferentes regiões produtoras desses produtos. Cerca de 5% do peso da própolis é oriundo dos grãos de pólen. O espectro polínico presente na própolis contém os grãos de pólen trazidos pelas abelhas, e também os depositados pelo vento (os anemófilos) que aderiram à resina. Sendo assim, a análise palinológica é um instrumento precioso para a verificação e rotulagem das amostras desse produto apícola, uma vez que permite determinar sua origem geográfica, fazendo a distinção entre as diferentes regiões produtoras e a estação do ano em que foram elaboradas (GHISALBERTI, 1979; BARTH, 1998; BARTH et al., 1999; FREITAS et al., 2010).

Como a presença dos grãos de pólen é decorrente em grande parte da ação do vento, que adiciona esses elementos botânicos à resina das exsudações das plantas, a simples presença de grãos de pólen de uma determinada espécie não se constitui em critério suficiente para a definição da origem botânica de um determinado tipo de própolis. No Brasil, há uma grande variedade de tipos de própolis, sendo o país o terceiro maior produtor mundial. Devido à grande diversidade da flora brasileira, é necessário expandir os conhecimentos científicos acerca da origem botânica e geográfica do produto (TEIXEIRA et al., 2003; BARTH, 2004).

A enorme disponibilidade dos derivados apícolas brasileiros no mercado e o crescente interesse internacional é um incentivo para que ocorra o aumento das pesquisas de caracterização palinológica da própolis produzida no país, de forma a ampliar o controle da qualidade deste produto (LUZ et al., 2007).

O interesse na determinação da origem botânica dos produtos apícolas e suas vantagens comerciais em relação à qualidade dos mesmos têm na palinologia uma ferramenta importante (OLIVEIRA, 2009). O conhecimento sobre a flora apícola é necessário para a conservação dessas plantas de forma a promover uma apicultura sustentável (SODRÉ et al., 2008).

Daugusch et al. (2007) analisaram as estruturas anatômicas de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), tais como os parênquimas lignificados e as células parenquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado. As amostras de própolis vermelha do grupo 13 apresentaram na análise microscópica diversos elementos que caracterizam a presença de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae). Foi encontrada na própolis, a presença de tricomas que são os mesmos encontrados na planta *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae). A análise comparativa entre os elementos microscópicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13 e observados no estudo realizado para *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), como os ápices vegetativos, demonstrou que os elementos botânicos encontrados são idênticos.

2.3 – Composição química

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores, além desses, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (FRANCO et al., 2000; PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002). Sua composição química depende da flora, de sua origem geográfica e da época do ano (BURDOCK, 1998; BOGDANOV, 2012).

De modo geral, a própolis contém 50 – 60% de resinas e bálsamos vegetais, 30 – 40% de ceras, 5 – 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, ferro, cobre, estrôncio, manganês e pequenas quantidades de vitamina B₁, B₂, B₆, C e E (GHISALBERTI, 1979; ALENCAR, 2002; MENEZES, 2005; FUNARI; FERRO, 2006).

A composição química da própolis inclui flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kamferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos,

polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (MATSUDA, MACHADO, MASTRO, 2002; DOS SANTOS, 2003; OZKUL, SILICI, ERÖGLÜ, 2004; HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005). Dentre os compostos já identificados em diferentes amostras de própolis, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, pois é atribuída a eles grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (FUNARI, FERRO, 2006).

A maioria das amostras de própolis da região tropical contém flavonoides, di e triterpenos, lignina e outras substâncias fenólicas, ácido 3-prenil-*p*-cumárico, acetofenonas, açúcares, açúcares-álcoois, ceras, vitaminas e minerais. Também são encontrados vários compostos voláteis como monoterpenos e sesquiterpenos (BANKOVA et al., 1994). Os flavonóides agliconas contido nas própolis do Brasil variam conforme a região (PARK et al., 1997) e a composição química em geral depende também da espécie de abelhas (KOO, PARK, 1997). A composição química da própolis da mesma região, mas coletada de três diferentes espécies de abelhas melíferas foi comparada e diferenças significativas na composição química foram encontradas (SILICI, KUTLUCA, 2005).

Alencar et al. (2007) identificaram 20 compostos na própolis vermelha de Alagoas, sendo que sete deles (metil-*o*-arselinato, metil abietato, 2,4,6-trimetilfenol, homopterocarpina, medicaina, 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol e 7,4'-diidroxiflavona) foram identificados pela primeira vez em amostras de própolis brasileiras. Pelo menos 3 isoflavonoides, tais como a homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol apresentaram-se como os compostos majoritários. Li et al. (2008) isolaram 42 compostos da própolis vermelha brasileira com o objetivo de avaliar a atividade citotóxica, sendo identificados 38 flavonoides e 3 lignanas.

A própolis vermelha do nordeste do Brasil (grupo 13) tem uma composição química similar a um tipo específico de própolis vermelha cubana, produzida na província de Pinar Del Rio (CABRAL, 2008). Ambas, não contem benzofenonas, mas, possuem em comum dois isoflavonoides, a medicarpina e a homopterocarpina (PICCINELLI, et al. 2005; ALENCAR, et al., 2007) e duas isoflavonas, a formononetina e a biochanina (PICCINELLI et al., 2005). Os compostos químicos encontrados na própolis de Cuba são: ácido gálico, isoliquiritigenina, (-)-liquiritigenina, formononetina, biochanina A, (3*S*)-vestitol, (3*S*)-7-*O*-metilvestitol, (3*S*)-7,4'-diidroxio-2'-metoxiisoflavona, (6*aS*,11*aS*)-medicarpina, (6*aS*,11*aS*)-homopterocarpina, (6*aR*,11*aR*)-vesticarpana, (6*aR*,11*aR*)-3,8-diidroxio-9-metoxipterocarpana, (6*aR*,11*aR*)-3-hidroxi-8,9 dimetoxipterocarpana, (6*aR*,11*aR*)-3,4-diidroxio-9-metoxipterocarpana (PICCINELLI et al., 2005; DAUGSCH et al., 2007).

Foi demonstrado que as amostras de extrato de *Dalbergia ecastaphyllum* (Leguminosae) da América do Sul, contém os flavonoides rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksina-3-acetato e biochanina A (DAUGSCH et al., 2007).

2.4 – Atividades biológicas

A própolis é conhecida e utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No primeiro texto médico conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito a cerca de 1.700 a.C., se faz menção à própolis como produto medicinal (PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química e este possivelmente é o maior problema para o uso da própolis na terapia, tendo em vista que sua composição química varia com a flora da região, locais e épocas de coleta, com a técnica empregada para a produção (tipo de coletores) e com as características genéticas (gênero e espécie de abelhas). Este conjunto de fatores exerce, portanto, uma enorme importância nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas (PARK et al., 1998; PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002; DUTRA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008; SIMÕES et al., 2008).

Nos últimos anos a literatura científica vem relatando as propriedades farmacológicas da própolis de interesse médico-farmacêutico, tais como atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, reparadora tissular, anestésica, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias (FONTANA et al., 2004; ALENCAR et al., 2005; BANKOVA, 2005).

No Brasil, são descritas propriedades biológicas e composição química distinta para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira (PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002; LONGHINI et al., 2002). A própolis vermelha é reportada como sendo típica de Cuba e da Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia memorosa* e *Clusia scrobiculata* (Clusiaceae), respectivamente (TRUSCHEVA et al., 2006).

Em uma revisão, Sforcin e Bankova (2011) discutiram o potencial da própolis para o desenvolvimento de novas drogas. Eles concluíram que, apesar dos abundantes dados recolhidos sobre as propriedades farmacológicas da própolis, há substancial falta de pesquisa clínica. Além disso, é essencial estabelecer a natureza química dos extratos de própolis em

estudo farmacológico.

2.4.1 – Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis (antibacteriana e antifúngica) foi extensivamente estudada (KUJUNGIEV et al., 1999). Vários autores atribuem essa atividade aos flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, principalmente a flavonona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster feniletil do ácido caféico (UZEL et al., 2005). O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente se baseia na inibição da RNA-polimerase bacteriana (BOSIO, 2000), podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonoides, hidroxiaácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

Não somente o extrato bruto da própolis brasileira possui atividade antibacteriana, mas também as frações obtidas destes extratos (CABRAL et al., 2008). Vários autores tem estudado a atividade antibacteriana de compostos isolados encontrados em própolis (CABRAL et al., 2008). Koo et al. (2002) avaliaram a habilidade de 30 compostos puros inibirem a atividade de glucosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans*. Os flavonoides pinocembrina, pinostrobin, galangina e pinobanksina são conhecidos por terem uma alta atividade antibacteriana (DASTIDAR et al., 2004). Também os ácidos prenil *p*-cumárico, ferúlico, caféico, diterpênico e ligninas furofurano isolados da própolis brasileira foram estudadas por terem uma boa atividade antibacteriana (CASTALDO, CAPASSO, 2002).

Três novas flavanonas derivadas: 7-prenilpinocembrina, totarol e 7-prenilstrobopina, isoladas de amostras de própolis grega, mostraram alta atividade antibacteriana (MELLIU, CHINOU, 2004). Na própolis derivada de *Baccharis dracunculifolia* brasileira, ácido prenil *p*-cumárico, labdanos e diterpenos foram identificados como compostos responsáveis pela atividade antibacteriana (BANKOVA, 2005).

A atividade antifúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por Ota et al. (2001) e Uzel et al. (2005). Diferentes métodos *in vitro* são usados para análise de extratos de própolis contra espécies de *Candida* (SAWAYA et al., 2002). A atividade antifúngica de extratos de própolis foram testadas *in vitro* usando-se *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (CHEE, 2002). A pinocembrina é conhecida por ter alta atividade antifúngica. Outros compostos ativos são ésteres de ácido cumárico e ácido caféico (DOBROWOLSKI et al., 1991).

2.4.2 – Atividade antioxidante

Os flavonoides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis. Existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonoides totais e a atividade anti-radicaais livres em extratos de própolis da Argentina (AHN et al., 2007).

Da Silva et al. (2006) sugerem que os flavonoides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas outros fatores podem estar envolvidos (CHOI et al., 2006). Embora estudos com extratos etanólicos de própolis sejam mais comuns, é relatado que o extrato aquoso da própolis possui uma boa atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos (MANI et al., 2006).

Trusheva et al. (2006) isolaram compostos da própolis vermelha e verificaram que as benzofenas isopreniladas, substâncias de menor polaridade em relação aos isoflavonóides, apresentaram maior potencial antioxidante. Alencar et al. (2007) identificaram quatro isoflavonas presentes na própolis vermelha: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2-isoflavona. Estes compostos possuem propriedade antioxidante, sendo demonstrado que a própolis vermelha apresentou alta atividade antioxidante.

Cabral et al. (2009) demonstraram que a própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e que o fracionamento produziu sub frações biologicamente mais ativas que as frações e o extrato etanólico de própolis. A fração hexânica apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres (74,4%) em relação ao extrato etanólico de própolis e a fração clorofórmica, o que pode ser explicado pelo alto potencial das substâncias antioxidantes presentes. Foi demonstrada que a atividade antioxidante da própolis vermelha não é função de um efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto.

2.4.3 – Atividade antileishmania

Em relação à leishmaniose, recentemente alguns pesquisadores têm demonstrado o efeito leishmanicida de diferentes extratos da própolis tanto *in vitro* como *in vivo*. Machado, Leon e De Castro (2007) testaram diferentes extratos etanólicos de própolis, um brasileiro (Et-Bra) e um búlgaro (Et-Bgl) e um extrato acetônico de própolis oriunda da Bulgária (Ket-Bgl). Essas amostras foram testadas em experimentos *in vitro*, nas concentrações de 0,5 µg/mL a 500 µg/mL, contra formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania*, sendo três do Novo Mundo (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*) e uma do Velho Mundo (*L. major*). Os extratos búlgaros Et-Bgl apresentaram atividade decrescente contra os parasitas: *L. major* > *L. amazonensis* > *L. chagasi* > *L. braziliensis*. O extrato brasileiro apresentou

atividade similar frente às espécies *L. major*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, enquanto que *L. amazonensis* foi a espécie menos suscetível.

Ayres, Marcucci e Giorgio (2007) investigaram o efeito do extrato de própolis coletado no Estado de Alagoas (própolis vermelha) sobre formas promastigotas e formas amastigotas *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesão da espécie. As formas promastigotas e amastigotas, foram incubadas com 25 µg/mL de própolis e o número de parasitas e a morfologia foram avaliados. Até o período de 96 horas, os autores não observaram alteração na proliferação tanto das formas promastigotas como das formas amastigotas, portanto este extrato não se mostrou eficiente diretamente contra tais formas. Contudo, quando os autores utilizaram este extrato em culturas de macrófagos murinos (camundongos BALB-c) infectados com *L. amazonensis*, houve diminuição tanto na porcentagem de macrófagos infectados como no número de amastigotas no interior dos macrófagos.

2.4.4 – Atividade antileucêmica

A citotoxicidade da própolis foi comprovada tanto em animais quanto em estudos *in vitro*. Foi observado que a atividade antitumoral da própolis de *Baccharis dracunculifolia* está intimamente relacionada com a substância Artepillin C, e a atividade citotóxica resultou em apoptose de células cancerosas por fragmentação de DNA (KIMOTO et al., 1998). Outras hipóteses do mecanismo antitumoral da própolis sugerem que essa atividade podem ser associada com a ativação na produção de linfócitos e a subsequente estimulação do sistema imune associado com a inibição da peroxidação lipídica (KIMOTO et al., 2001b).

O CAPE, éster do ácido fenil caféico, isolado de própolis do álamo, tem mostrado um efeito inibitório em leucemia celular humana HL-60 por indução de apoptose (CHEN et al., 2001) e preferencialmente na citotoxicidade de células tumorais (ORSOLIC et al., 2005). CAPE e muitos de seus análogos estruturais mostraram um efeito inibidor em células leucêmicas humanas HL-60 por indução de apoptose (ORSOLIC et al., 2005). CAPE e muitos análogos estruturais da própolis que ocorreram nas amostras de álamo holandês foram implicados na atividade antiproliferativa em linhagens celulares cancerígenas (BANSKOTA et al., 2002).

As própolis de *Baccharis dracunculifolia* e de *Dalbergia ecastaphyllum* apresentam atividade antiproliferativa em tumor maligno primário (RC-58T/h/SA#4) derivados de células de câncer prostático humano e células epiteliais prostáticas humanas. A inibição mais forte de células RC-58T/h/SA#4 foi observada no extrato de própolis de *Dalbergia ecastaphyllum*, enquanto que foi observada inibição de crescimento moderado em células epiteliais

prostáticas humanas utilizando-se a própolis de *Baccharis dracunculifolia* (MORAES et al., 2010).

Franchi Junior et al. (2012) em seu estudo sobre efeitos comparativos de extratos etanólicos de própolis brasileira em células leucêmicas humanas por teste de MTT, concluíram que: a própolis do quimiotipo G13 (própolis vermelha) é mais citotóxica que a própolis G12, mas, que o estudo não tem a pretensão de indicar a própolis G13 para tratamento de Leucemias em humanos. E que a própolis G13 é capaz de induzir a apoptose em modelos de leucemias humana após incubação *in vitro*, mostrando nos resultados importantes indicações para futuros ensaios pré-clínicos em animais com leucemia e reforçando a necessidade de estudos químicos para localizar uma possível substância citotóxica útil presente em própolis G13.

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

- Realizar um fracionamento biomonitorado de duas amostras de própolis vermelha, coletadas em Igarassu – PE, a fim de determinar os compostos responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante, antileucêmica e antileishmania, relatadas para amostras de própolis vermelha, além de traçar um perfil palinológico.

3.2 - Objetivos específicos

- Realizar uma análise palinológica das amostras de própolis vermelha *in natura*;
- Realizar um fracionamento das amostras de própolis vermelha para obtenção da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada;
- Isolar os compostos químicos nas amostras de própolis vermelha *in natura*;
- Realizar uma triagem fitoquímica da própolis vermelha *in natura* triturada;
- Analisar o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;
- Analisar o perfil cromatográfico da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica através da cromatografia líquida de alta eficiência;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos na própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica através da cromatografia líquida de alta eficiência;
- Analisar o perfil fenólico da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica através da determinação do

teor de fenólicos e flavonoides totais;

- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada, através da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM);
- Determinar a atividade antioxidante da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada, através do método de DPPH, ABTS e FRAP;
- Determinar a atividade antileucêmica *in vitro* da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada, através do ensaio de MTT;
- Determinar a atividade antileishmania *in vitro* da própolis vermelha *in natura* triturada e extrato etanólico bruto sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta das amostras de própolis vermelha *in natura*

As amostras da própolis vermelha foram obtidas de coletores colocados nas caixas de abelhas *Apis mellifera*, em maio de 2012, em dois apiários (7°50'37.05"S e 34°53'00.66"O elev. 7m / 7°49'57.90"S e 34°56'02.38"O elev. 64m), localizados no Município de Igarassu, Estado de Pernambuco, Brasil (Figura 1). As duas amostras foram coletadas na forma *in natura* e denominadas para o experimento como descrito abaixo:

Amostra 1 - própolis vermelha coletada no apiário 1.

Amostra 2 - própolis vermelha coletada no apiário 2.



Figura 1 - **A.** Visualização de um dos apiários fornecedor da própolis vermelha. **B.** Apicultores coletando. **C.** Aspecto da própolis vermelha *in natura* nos coletores instalados nas colmeias. **D.** Detalhe das abelhas *Apis mellifera* dentro dos coletores. **E-F.** Detalhe da amostra de própolis vermelha. Foto: ©Michelline Marques

4.2 – Limpeza das amostras de própolis vermelha *in natura*

As amostras de própolis vermelha *in natura*, foram submetidas à limpeza, retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas e qualquer outro tipo de material estranho (Figura 2). Em seguida, as amostras foram pesadas, embaladas em sacos plásticos transparentes envoltos em papel alumínio e armazenadas em freezer a - 18°C. A própolis vermelha *in natura* limpa das amostras 1 e 2 foram submetidas à análise palinológica e utilizadas para a trituração.

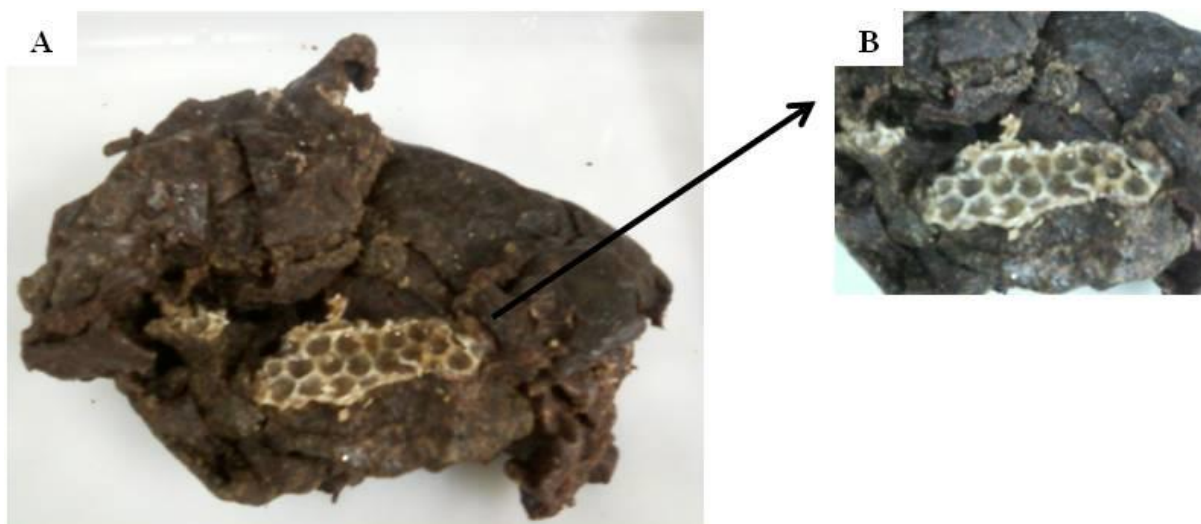


Figura 2 - A. Amostra de própolis na forma *in natura*. **B.** Detalhe de favos de mel na amostra. Foto: ©Michelline Marques

4.3 – Análise palinológica das amostras de própolis vermelha *in natura*

Com o objetivo de identificar os tipos polínicos nas amostras de própolis vermelha foi realizada com a colaboração do professor Francisco de Assis Ribeiro dos Santos, Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. As amostras de própolis foram dissolvidas em álcool etílico 95% e o sedimento obtido, passado em hidróxido de potássio (10%) a quente; o resíduo foi desidratado com ácido acético glacial e finalmente submetido à acetólise de Erdtman (1960). Após sucessivas centrifugações, os grãos de pólen residuais foram montados entre lâmina e lamínula em gelatina glicerinada.

As preparações foram analisadas em microscópio óptico, sendo os grãos de pólen de cada tipo polínico contados. Contou-se sempre um mínimo de 500 grãos de pólen por amostra de própolis. O estabelecimento e identificação da afinidade botânica dos tipos polínicos foram feitas de acordo com as indicações de Santos (2011).

Os grãos de pólen foram identificados a partir das lâminas depositadas na palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal (UEFS), na qual também foram depositadas todas as lâminas preparadas. Também foram utilizados Atlas e outros trabalhos para auxílio na identificação da origem botânica dos tipos polínicos. Todos os tipos polínicos foram fotografados em microscópio óptico.

4.4 - Preparo das amostras de própolis vermelha *in natura* triturada

Uma amostra contendo 1 Kg de própolis vermelha *in natura*, foi triturada com nitrogênio líquido (Figuras 3a e 3b) ou em liquidificador (Figura 4) até obtenção de um pó vermelho fino e em seguida, foi pesada, embaladas em sacos plásticos transparentes envoltos em papel alumínio e armazenadas em freezer a - 18°C e denominada como própolis vermelha *in natura* triturada. A própolis vermelha *in natura* triturada das amostras 1 e 2 foram utilizadas para o fracionamento e submetidas ao *screening* fitoquímico, análise do perfil cromatográfico, análise do perfil fenólico, identificação e quantificação dos padrões e avaliação das atividades farmacológicas.



Figura 3a - A. Amostra 1 de própolis vermelha *in natura*. **A.1.** Trituração com nitrogênio líquido. **A.2.** Amostra 1 de própolis vermelha *in natura* triturada. Foto: ©Michelline Marques

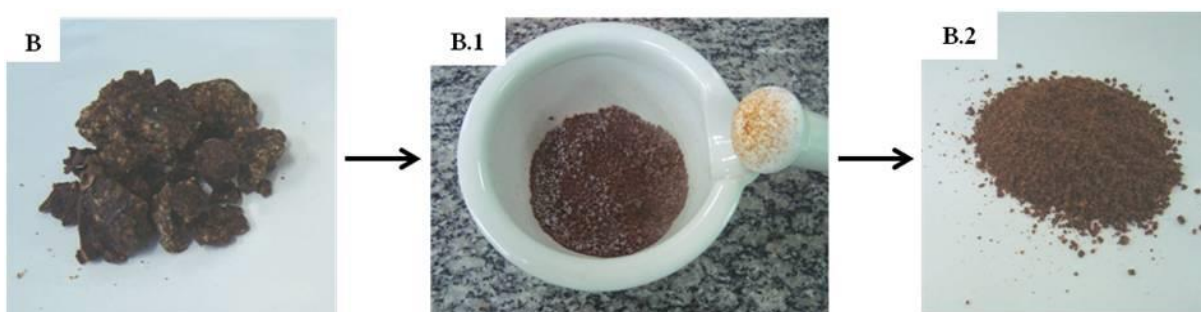


Figura 3b - B. Amostra 2 de própolis vermelha *in natura*. **B.1.** Trituração com nitrogênio líquido. **B.2.** Amostra 1 de própolis vermelha *in natura* triturada. Foto: ©Michelline Marques

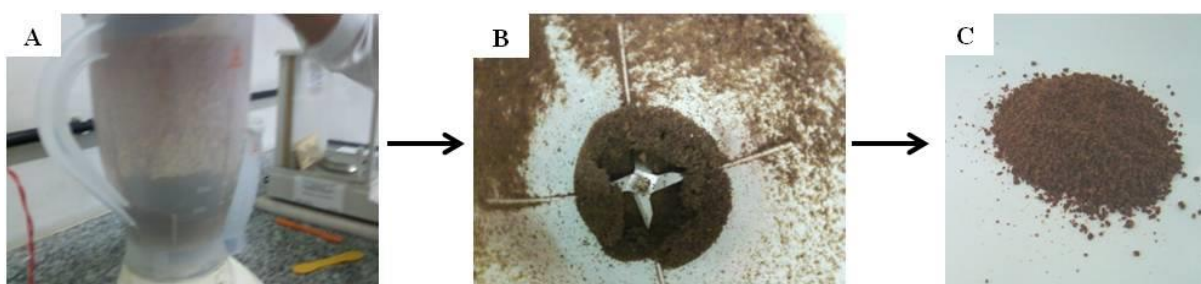


Figura 4 – A-C. Etapas da trituração mecânica em liquidificador. Foto: ©Michelline Marques

4.5 - Preparo do extrato etanólico bruto

Uma amostra contendo 500 gramas de própolis *in natura* triturada (obtida conforme item 4.4) foi extraída com 5000 mL de etanol 96%, onde para cada 100 gramas de amostra utilizou-se 1000 mL de solvente. Cada extração foi feita durante 30 minutos em banho de ultrassom e a temperatura ambiente (24°C). Ao final das cinco extrações, os extratos foram combinados e em seguida realizou-se a filtração em plug de algodão. O filtrado foi guardado em um frasco de vidro âmbar. Posteriormente, foi deixado em repouso durante uma noite no freezer a - 18°C para precipitação e separação das ceras. No dia seguinte, o extrato foi colocado em funil de separação para que houvesse maior separação das ceras, e apenas o sobrenadante foi seco em evaporador rotativo (40°C – 120 rpm) e pesado, obtendo-se assim a massa do extrato etanólico bruto (Figura 5). O extrato etanólico bruto das amostras 1 e 2 foram utilizados para o fracionamento (Figura 7) e submetidos à análise do perfil cromatográfico, análise do perfil fenólico, identificação e quantificação dos padrões e avaliação das atividades farmacológicas.

4.6 - Fracionamento e pré-purificação do extrato etanólico bruto

Um amostra contendo 50 gramas do extrato etanólico bruto foi suspenso em uma mistura de 100 mL de metanol grau HPLC e 100 mL de água destilada (1:1) e fracionado utilizando a técnica de extração líquido-líquido, em funil de separação, com os solventes: hexano e acetato de etila. Após a evaporação dos solventes, foram obtidas a fração hexânica (Fr. Hex), fração acetato de etila (Fr. AcOEt) e fração hidroalcoólica (Fr. HA). As frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica das amostras 1 e 2 (Figura 6) foram submetidas à análise do perfil cromatográfico, análise do perfil fenólico, quantificação e identificação dos padrões e avaliação das atividades farmacológicas.

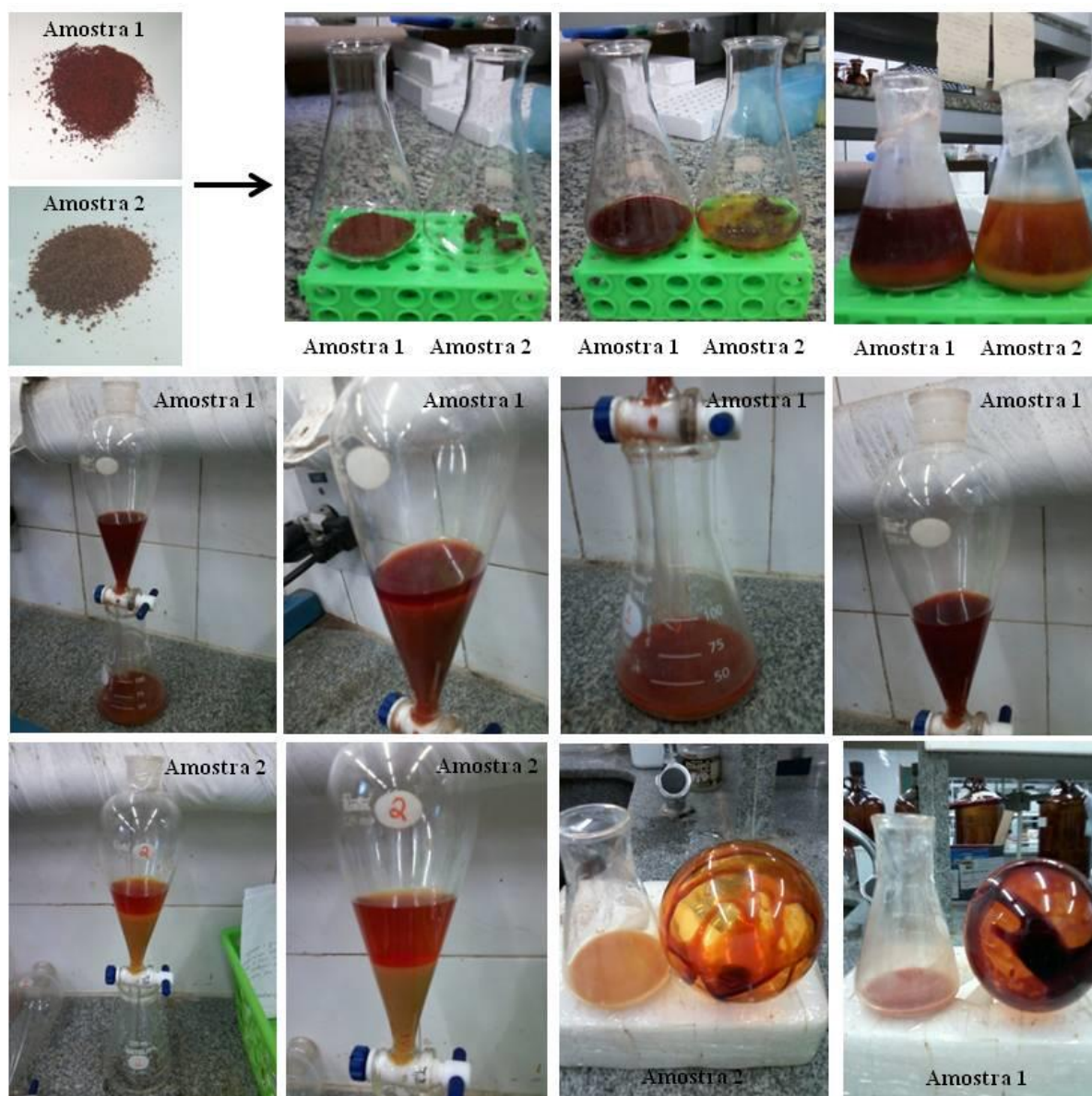


Figura 5 - Etapas da preparação do extrato etanólico bruto. Foto: ©Michelline Marques

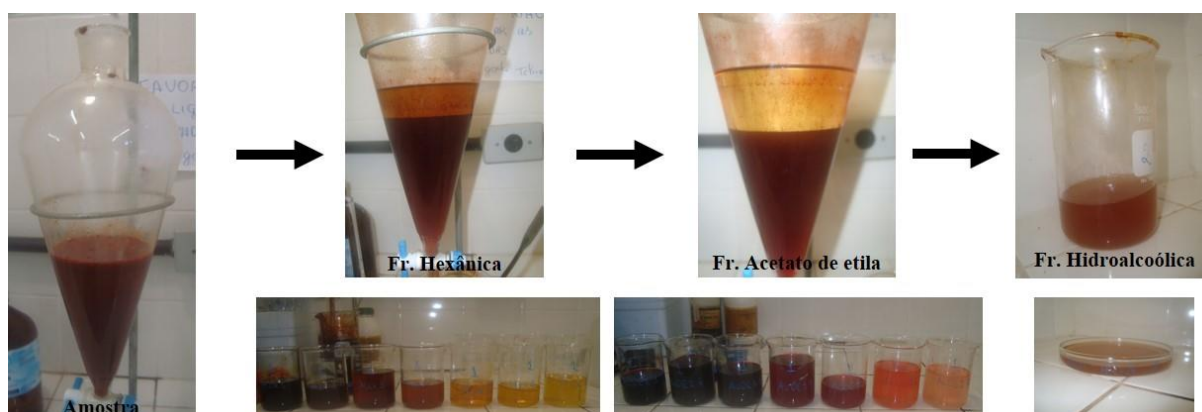


Figura 6 – Etapas do fracionamento e pré-purificação do extrato etanólico bruto. Foto: ©Michelline Marques

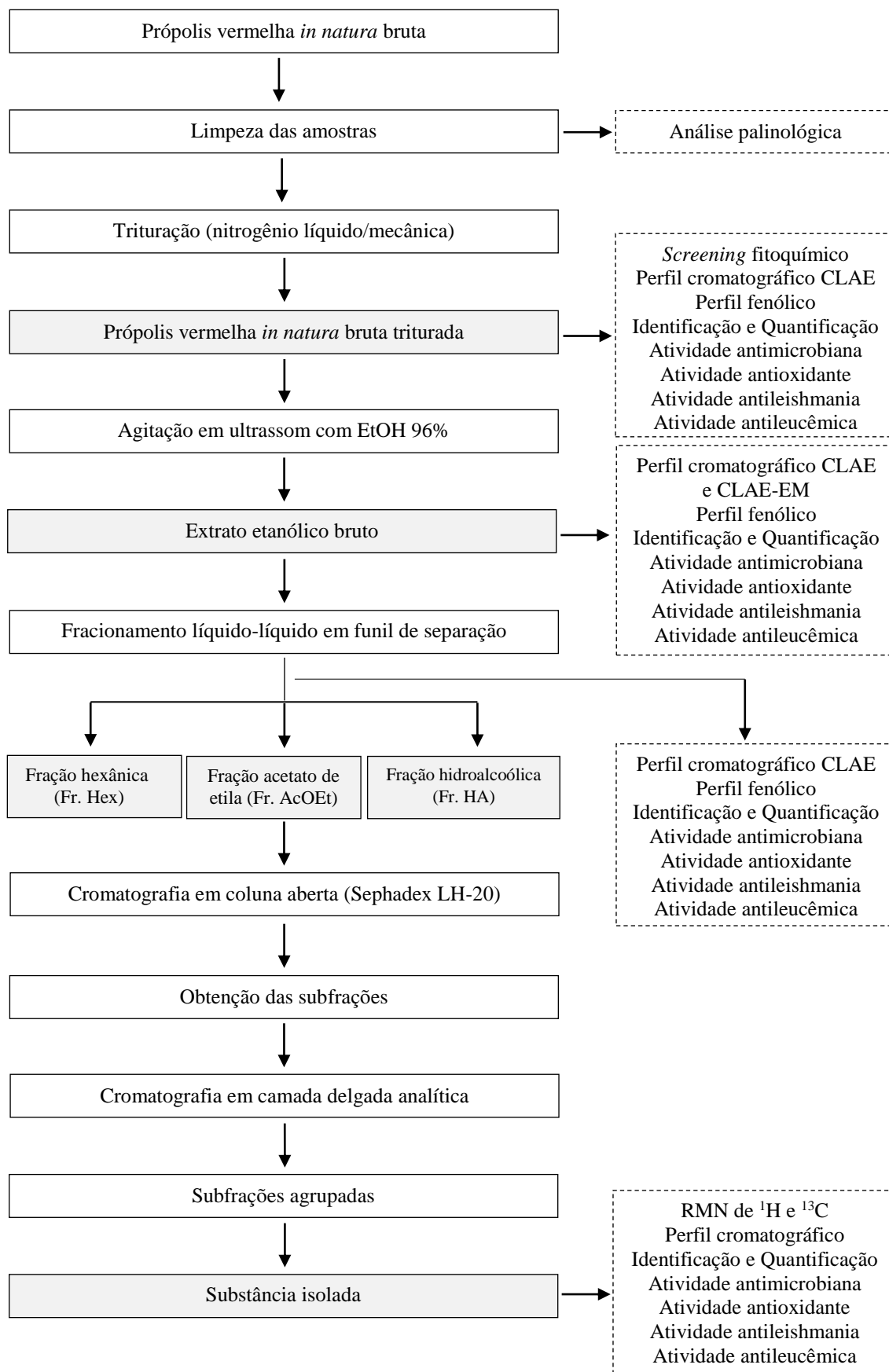


Figura 7 - Fluxograma do fracionamento e isolamento biomonitorado de compostos químicos com atividades farmacológicas da própolis vermelha.

4.7 - Fracionamento e purificação da fração acetato de etila

Pelo fato da fração acetato de etila possuir uma composição química complexa em relação às frações hexânica e hidroalcoólica, somente a fração acetato das amostras 1 e 2, foram utilizadas para serem refractionadas. Após serem solubilizadas em um sistema de eluição de $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (1:1), foram submetidas a Cromatografia de Coluna Sephadex LH-20 utilizando a mesma mistura de solventes. Os perfis fitoquímicos das subfrações foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA - placas de gel de sílica Merck) com um sistema de eluição com a mistura de solventes $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (9:1). A visualização do perfil de flavonoides foi realizada através da revelação com reativo NP (reagente ácido difenilbórico etanolamina em MeOH). As subfrações foram agrupadas de acordo com seus perfis de CCDA.

4.8 – Isolamento e identificação do composto químico

As subfrações que produziram um precipitado, foram filtradas, secas e submetidas à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para identificação química do composto isolado e elucidação estrutural. A análise foi realizada na Central analítica da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Bruker DPX 300, operando em 300 MHz para o ^1H e 75 MHz para o ^{13}C . Os espectros foram obtidos em DMSO – D_6 e como referência interna o sinal residual do solvente. Os deslocamentos químicos foram obtidos em δ (PPM) e as constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hz.

As demais substâncias identificadas nas amostras de própolis tiveram sua identidade confirmada através da comparação com padrões em análises por cromatografia líquida de alta eficiência, com base nos seus respectivos tempos de retenção obtidos em pelo menos dois sistemas de eluição diferentes.

4.9 – Análise físico-química da própolis *in natura* triturada

4.9.1 - *Screening* fitoquímico preliminar

a) Preparo das amostras: Cinquenta gramas da própolis vermelha na forma *in natura* triturada da amostra 1 e 2 foram extraídas com 100 mL de etanol:água (80:20 v/v) através de maceração por 24 horas. O extrato foi filtrado e este evaporado até a secura sob pressão

reduzida a 40°C em rotaevaporador. Em seguida, foi submetido aos ensaios para identificação dos metabólicos específicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Determinação da presença / ausência dos grupos químicos nas duas amostras de própolis vermelha coletadas em maio de 2012.

Grupos químicos		Referência
Alcaloides	Ácido Tungístico	Raaman, 2006
	Bouchardat	Raaman, 2006
	Dragendorff	Waldi, 1965
	Mayer	Evans, 1989
Esteroides	0,12	Raaman, 2006
	0,25	Raaman, 2006
	0,50	Raaman, 2006
Flavonoides	Fita-magnésio	Harborne, 2005
	Fluorescência	Harborne, 2005
Saponinas	Espuma	Kokate, 1999
Taninos	0,5	Evans, 1989
	Gelatina 0,5%	Evans, 1989
	1,0	Evans, 1989
	2,0	Evans, 1989
	0,5	Mace, Howell, 1974
	FeCl ₃ 2%	Mace, Howell, 1974
	2,0	Mace, Howell, 1974

4.10 – Análise físico-química do extrato etanólico bruto

4.10.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM)

O extrato etanólico bruto (100 mg) da amostra 1 e 2 foram pesados e dissolvidos em 2 mL de etanol e diluído para a concentração de 1 mg/mL. Um volume de 10 µL foi injetado no LC – Orbitrap - FTMS com as seguintes condições: a separação foi conseguida com uma coluna C₁₈ ACE (100 x 4,6 mm, 5 µm) e fluxo de 300 µL/min. A fase móvel consistiu de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), (v:v) em modo gradiente. O FTMS foi programado para adquirir os íons em modo negativo no

intervalo de 100 a 1200 m/z. Os extratos brutos foram analisados usando LC – Orbitrap – FTMS e os dados de massas foram extraídos utilizando o software MZmine e os seguintes parâmetros de filtragem: detecção de massa com os picos centróides, elementos de C (60), H (120) e O (20) para gerar fórmulas, nível de ruído 5×10^5 , tolerância de espaço dos picos de 0,001 m/z, altura mínima do pico de 500.000, intervalo de 100 – 1200 m/z. As massas exatas dos componentes nos extratos foram comparados com um banco de dados do Laboratório de Metabolômica da Universidade de Strathclyde.

4.11 - Análise físico-química da própolis *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica

4.11.1 - Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

a) Amostras analisadas: própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada.

b) Preparo das amostras: Cada amostra foi pesada, diluída com 80% de metanol grau HPLC e 20% de água mili-Q e preparada na concentração de 5 mg/mL (própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) ou 100 µg/mL (formononetina). As filtrações das amostras foram realizadas em membranas filtrantes com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore®).

c) Preparo das soluções: O metanol grau HPLC foi utilizado como fase orgânica. A fase aquosa foi água mili-Q obtida pelo aparelho modelo PURELAB Option-Q (ELGA®). Para retirar bolhas de ar dissolvidas nos eluentes foi utilizado um aparelho de ultrassom (Unique®). Os eluentes foram submetidos ao processo de degaseificação durante 30 minutos em aparelho de ultrassom. Para retirar impurezas foi utilizado um sistema de filtração a vácuo (Sartorius®). As filtrações dos eluentes foram realizadas em membranas filtrantes com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore®).

d) Procedimento experimental: As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu composto por uma bomba LC – 10 AD vp, misturador solvente FCV – 10 AL vp, unidade desgaseificador DGU - 14A, forno de coluna CTO – 10 AS,

amostrador automático SIL – 10 AD vp, detector SP - 10AV vp UV / Vis, e um controlador de sistema SCL - 10A vp. Vinte microlitros da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica, na concentração de 5 mg/mL e a substância isolada na concentração de 100 µg/mL, foram injetadas no cromatógrafo. A separação foi conseguida utilizando uma coluna e pré-coluna C18 (250 x 4,6 mm) da Phenomenex (Phenomenex, Torrance, EUA) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água mili-Q (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B), com fluxo constante de 0,8 mL/min. Utilizando um gradiente de 45% - 65% do solvente B de 0 - 90 minutos, 65% - 75% do solvente B de 90 - 120 minutos, 75% - 95% do solvente B de 120 - 170 minutos e 45% - 45% do solvente B de 170 - 185 minutos. A detecção foi feita utilizando um comprimento de onda de 254 nm. Todas as amostras foram injetadas em triplicata (Método 1).

Para confirmação dos resultados, as amostras foram injetadas em outra metodologia modificando: tempo de corrida, fluxo da fase móvel e sistema de gradiente. Vinte microlitros da própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica, na concentração de 5 mg/mL e a substância isolada na concentração de 100 µg/mL, foram injetadas no cromatógrafo. A separação foi conseguida utilizando uma coluna e pré-coluna C18 (250 x 4,6 mm) da Phenomenex (Phenomenex, Torrance, EUA) com tamanho de partícula de 5 µm.

A fase móvel utilizada foi água mili-Q (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B), com fluxo constante de 1 mL/min. Utilizando um gradiente de 45% - 65% do solvente B de 0 - 55 minutos, 65% - 75% do solvente B de 55 - 85 minutos, 75% - 95% do solvente B de 85 - 135 minutos e 45% - 45% do solvente B de 135 - 150 minutos. Todas as amostras foram injetadas em triplicata 3 (Método 2). Os critérios de avaliação utilizados para a escolha do melhor método cromatográfico desenvolvido foram: fluxo da fase móvel e resolução entre os analitos.

4.11.2 – Identificação e quantificação dos padrões

a) Padrões analisados: Os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides foram utilizados (Sigma-Aldrich®): ácido ferúlico, biochanina A, daidzeína, formononetina, luteolina, pinocembrina, quercetina e rutina (Figura 8 – Página 55).

b) Preparo dos padrões: Cada padrão foi pesado, diluído com 100% de metanol grau HPLC

e preparado na concentração de 1 mg/mL (solução estoque). As soluções testes foram preparadas a partir da diluição da solução estoque.

c) Preparo das soluções: O metanol grau HPLC foi utilizado como fase orgânica. A fase aquosa foi água mili-Q obtida pelo aparelho modelo PURELAB Option-Q (ELGA®). Para retirar bolhas de ar dissolvidas nos eluentes foi utilizado um aparelho de ultrassom (Unique®). Os eluentes foram submetidos ao processo de degaseificação durante 30 minutos em aparelho de ultrassom. Para retirar impurezas foi utilizado um sistema de filtração a vácuo (Sartoriu®). As filtrações dos eluentes foram realizadas em membranas filtrantes com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore®).

d) Procedimento experimental: Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados utilizando-se o método 1 e 2 descrito anteriormente no item 4.2.8.1 d, exatamente nas mesmas condições cromatográficas. A identificação e quantificação dos padrões foram obtidas baseando-se nos tempos de retenção e nas áreas de cada pico. Foram identificados e quantificados nas seguintes amostras: própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica. Todos os padrões foram injetados na separadamente (100 µg/mL) em triplicata com a finalidade de visualizar o perfil cromatográfico de cada padrão. Posteriormente, a concentração de cada padrão de interesse foi calculada com base na equação da reta fornecida pela curva de calibração criada a partir das concentrações 0,5; 4; 20; 40; 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos e foram injetados em sextuplicata. Os dados de concentração para os compostos fenólicos em questão foram expressos em µg/mg de amostra. Os dados estatísticos para comparação dos teores dos analitos foram obtidos pelo programa estatístico GraphPad Prism® 4.0.

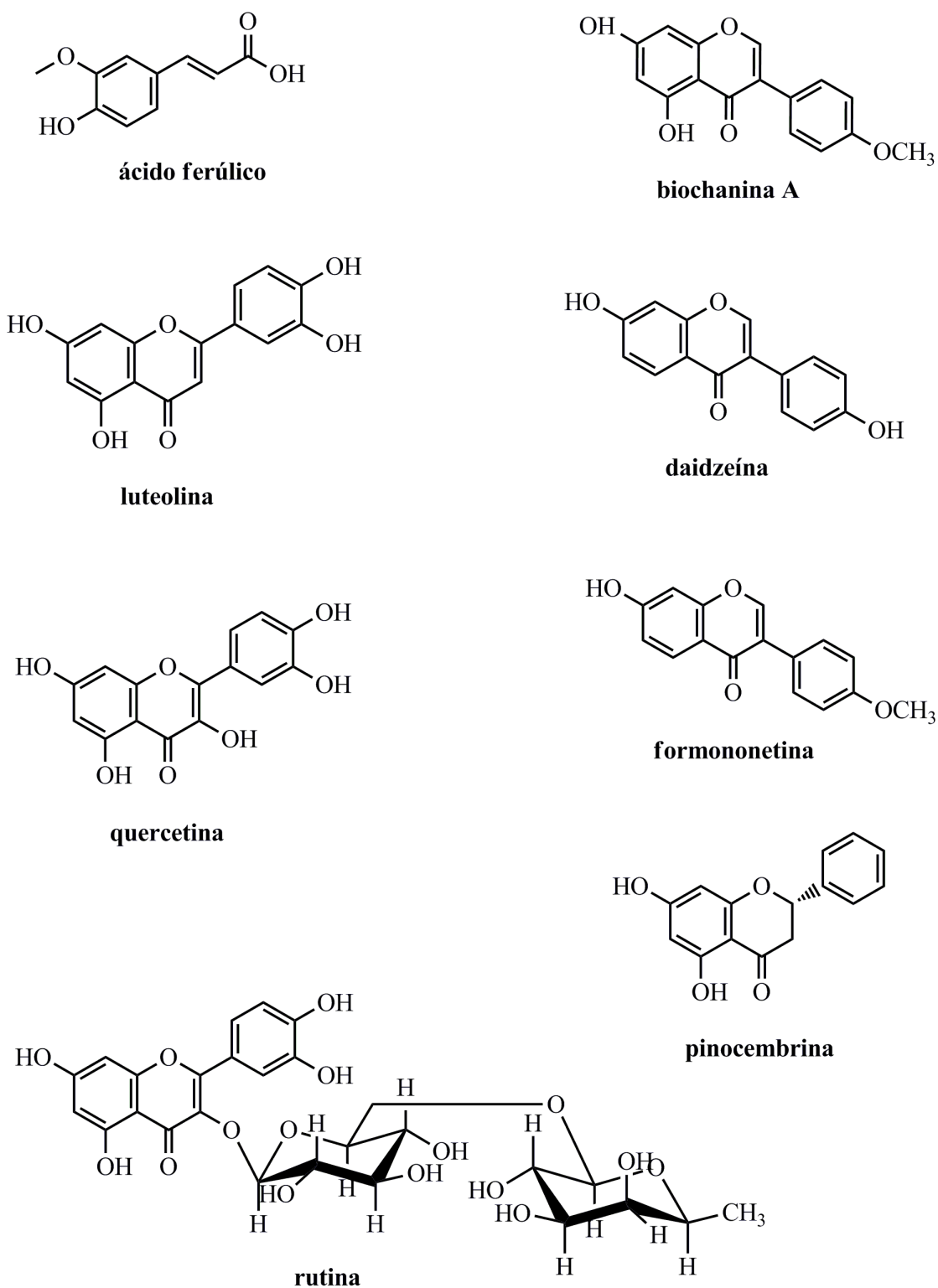


Figura 8 - Estrutura química dos padrões identificados e quantificados nas amostras por CLAE.

4.12 - Análise do perfil fenólico da própolis *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica

4.12.1 - Determinação do teor de fenólicos totais com reagente de Folin-Ciocalteu

A uma alíquota de 50 µL de cada amostra (2,0 mg/mL) adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin- Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 4%, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 5 minutos em aquecimento de 50°C, e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico (PAPOTTI et al., 2010). O teor de fenólicos totais nas amostras (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) de própolis vermelha foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (GAE mg/g).

Preparação da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico. Alíquotas de concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µL/mL foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de solução aquosa 4% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,12497 + 0,00142 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 760 nm, X é a concentração de ácido gálico. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de própolis. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.12.2 - Determinação do teor de flavonas e flavonóis totais com cloreto de alumínio

O teor de flavonas e flavonóis totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura utilizando como reagente o cloreto de alumínio. Uma alíquota de 400 µL de cada amostra (2,0 mg/mL) e 200 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2% foram misturados num balão volumétrico contendo 5 mL de metanol. O volume foi ajustado para 10 mL com metanol. Após 30 minutos foi medida a absorbância a 425 nm contra o branco, a fim de quantificar flavonas e flavonóis (MIHAI et al., 2012). O teor de flavonas e flavonóis totais nas amostras (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) de própolis foi determinado utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para quercetina padrão. O resultado foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por g de amostra (QE mg/g).

Preparação da curva analítica com quercetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de quercetina, em metanol. Alíquotas de 400 µL de soluções nas concentrações de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 e 1 µL/mL foram misturadas a 200 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2% num balão volumétrico contendo 5 mL de metanol. O volume foi ajustado para 10 mL com metanol. Após 30 minutos foi medida a absorbância a 425 nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta $Y = 0,04078 + 0,00262 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 425 nm e X é a concentração de quercetina. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, onde se substituiu Y pela média da absorbância de cada amostra de própolis. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.13 – Atividades Farmacológicas

4.13.1 – Amostras testadas

Nos ensaios das atividades farmacológicas foram testados as amostras 1 e 2 de própolis vermelha e a substância isolada (Tabela 2).

Tabela 2 – Amostras utilizadas na avaliação das atividades farmacológicas.

Amostra 1	Amostra 2	Substância isolada
<i>in natura</i> triturada	<i>in natura</i> triturada	formononetina
extrato etanólico bruto	extrato etanólico bruto	
fração hexânica (Fr. Hex)	fração hexânica (Fr. Hex)	
fração acetato de etila (Fr. AcOEt)	fração acetato de etila (Fr. AcOEt)	
fração hidroalcoólica (Fr. HA)	fração hidroalcoólica (Fr. HA)	

4.13.2 – Atividade Antimicrobiana

As análises foram realizadas com a colaboração da professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba.

4.13.2.1 - Preparo das soluções das amostras

Para os testes *in vitro*, as amostras foram pesadas e diluídas em dimetilsulfóxido [DMSO (CH_3)₂SO – Vetec, Brasil] e água destilada sob agitação em Vortex (Daigger Vortex Genie 2, A. Daigger & Co., Inc, USA), obtendo-se assim, uma solução estoque de cada amostra (Figuras 9 e 10). A partir da solução estoque foram preparadas as soluções trabalho. A concentração final de DMSO em cultura não ultrapassou 1% DMSO (concentração esta que não apresenta toxicidade para os modelos celulares testados), porém também foi feito controle com DMSO. Posteriormente, foram estabelecidas seis concentrações (32 $\mu\text{g/mL}$; 64 $\mu\text{g/mL}$; 128 $\mu\text{g/mL}$; 256 $\mu\text{g/mL}$; 512 $\mu\text{g/mL}$ e 1.024 $\mu\text{g/mL}$) utilizadas em cada um dos experimentos. A substância isolada foi testada em outras seis concentrações diferentes (6,25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$).

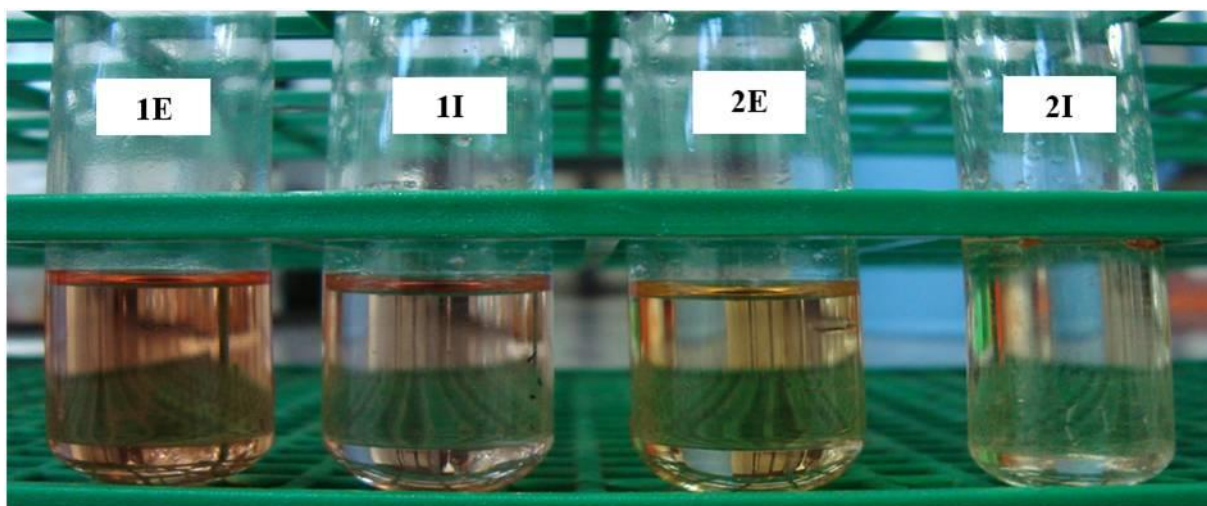


Figura 9 - Soluções estoques (2 mg/mL, DMSO) de própolis vermelha *in natura* triturada e do extrato etanólico bruto das amostras 1 e 2. **1E** – extrato etanólico bruto da amostra 1. **1I** – *in natura* triturada da amostra 1. **2E** – extrato etanólico bruto da amostra 2. **2I** – *in natura* triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques

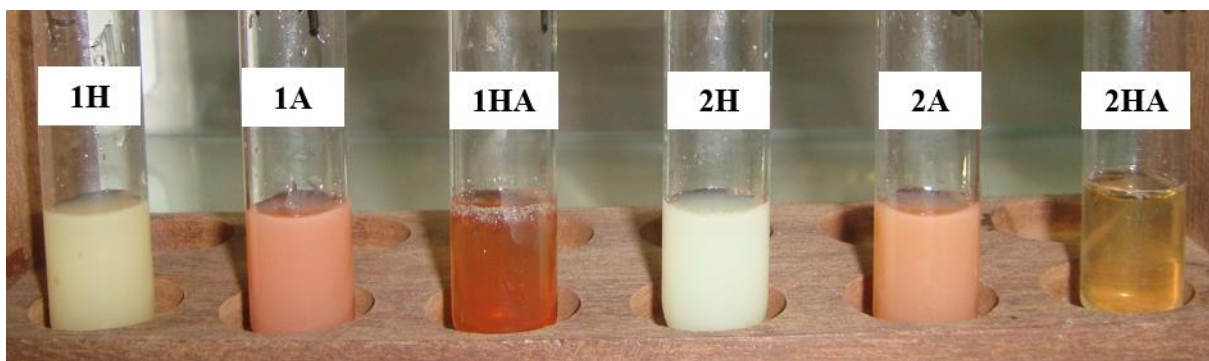


Figura 10 - Soluções estoques das frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica (2 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2. **1H** – fração hexânica da amostra 1. **1A** - fração acetato

de etila da amostra 1. **1HA** – fração hidroalcoólica da amostra 1. **2H** – fração hexânica da amostra 2. **2A** - fração acetato de etila da amostra 2. **2HA** – fração hidroalcoólica da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques

4.13.2.2 - Antimicrobianos Sintéticos

Para o controle de atividade antimicrobiana, foram usados clorafenicol (100 µg/mL) para as bactérias e nistatina (100 UI/mL) para as leveduras. Os produtos foram adquiridos na Sigma-Aldrich®.

4.13.2.3 – Micro-organismos

Nos ensaios de atividade biológica foram utilizados 12 micro-organismos, incluindo seis bactérias (gram positivas e gram negativas e seis leveduras) conforme mostra a Tabela 3. As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia - Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo e no Laboratório de Microbiologia - Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal da Paraíba. As cepas de bactérias foram mantidas em Agar Nutriente e as de leveduras em Agar Sabouraud dextrose (Difco Laboratories/USA/FRANCE), na temperatura de 35 - 37°C e 4°C, respectivamente.

Tabela 3 – Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos.

Bactérias	Leveduras
Gram-positivos	<i>Candida albicans</i> ATCC 76645
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13150	<i>Candida albicans</i> LM P-20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Candida tropicalis</i> LM 6
Gram-negativos	<i>Cryptococcus neoformans</i> ICB 59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Cryptococcus neoformans</i> LM 2601
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC P-12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC A-03	

4.13.2.4 - Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram: meio RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich®) para atividade

antifúngica e caldo nutriente (Difco Laboratories/USA/France) para atividade antibacteriana. Os mesmos foram preparados conforme instruções do fabricante.

4.13.2.5 - Inóculo

O inóculo das cepas selecionadas foi preparado a partir de repiques recentes nos meios apropriados e incubados a 35 - 37°C por 24 - 48 horas. Foram preparadas suspensões em NaCl a 0,9% esterilizada. As mesmas foram preparadas e padronizadas, ajustando-se à turbidez apresentada pela suspensão de sulfato de bário e ácido sulfúrico do tubo com turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem) durante 2 minutos. A suspensão foi ajustada para 90% de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340 - 800 nm), correspondendo a um inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/mL (BAUER et al., 1966; CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000; NCCLS, 2000).

4.13.2.6 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (ALAMAR®) e em duplicata (CLEELAND, SQUIRES, 1991; MANN, MARKHAM, 1998; HADACEK, GREGER, 2000; PALOMINO et al., 2002).

Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido duplamente concentrado (caldo nutriente para bactérias e RPMI para fungos). Posteriormente, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, 100 µL da solução das amostras na maior concentração de 1.024 µg/mL (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) e 200 µg/mL (formononetina). E por meio de uma diluição seriada a razão de dois, foram obtidas concentrações até 32 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente. Em seguida, foram adicionados 10 µL do inóculo dos microrganismos nas cavidades.

Também foram feitos controles: para cada microrganismo, antibacteriano (clorafenicol 100 µg/mL), antifúngico (nistatina 100 UI/mL e fluconazol 100 µg/mL) e com DMSO (solvente utilizado para solubilizar as amostras). As placas foram seladas e incubadas a 35 - 37°C por 24 - 48 horas (bactérias) e 24 - 72 horas (leveduras).

Decorrendo o tempo de incubação, foi adicionado 20 µL da solução de resazurina sódica (Sigma-Aldrich®) a 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador calorimétrico de óxido-redução para bactérias e 20 µL da solução de cloreto de trifetil tetrazelium – TTC (Sigma-

Aldrich®) a 0,5% para leveduras. A leitura foi realizada, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo, aglomerado de células e também pela observação da mudança da coloração do meio. Nas cavidades com resazurina ou TTC onde a cor mudou de azul para rosa, foi caracterizado que o corante foi reduzido, demonstrando viabilidade microbiana, considerando-se como concentração não inibidora, em contraposição, se a cor permanecer azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade microbiana e foi considerado como concentração inibidora. Produto ativo = transparente e Produto não ativo = coloração rósea – vermelho.

A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano e fúngico verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento do controle e também verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios, levando em consideração a CIM sobre 100% ou sobre 50% (CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

4.13.2.7 - Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

Alíquotas de 10µL das cavidades que não apresentaram crescimento nos procedimentos para a determinação das CIM, CIM x 2, CIM x 4, foram transferidas para placas de microtitulação esterilizadas (DISPOPETRI/Indústria Brasileira) contendo 100 µL/cavidade do meio CN (bactérias) e RPMI (leveduras), para a determinação da CBM e da CFM. As placas foram seladas e incubadas a 35 - 37°C por 24 - 48 horas (bactérias) e 24 - 72 horas (leveduras). Após a incubação do ensaio, foi feita a leitura e interpretação da CBM e CFM (MANN; MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

A CBM e CFM foram consideradas como a menor concentração capaz de causar a morte do inóculo, sendo esta determinada pelo não crescimento do inóculo. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CBM e CFM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

4.13.2.8 – Interpretação dos resultados

A atividade biológica das amostras foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50 - 100 µg/mL = excelente/ótima atividade, 100 - 500

$\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade, 500 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ = baixa atividade, > 1000 $\mu\text{g/mL}$ = produto inativo (MITCHER et al., 1972; ALLIGIANAIS et al., 2001; HOLETZ et al., 2002; HOUGHTON et al., 2007). Segundo Sartoratto et al. (2004), para valores de CIM, 50 - 500 $\mu\text{g/mL}$ é considerada elevada atividade, entre 600 - 1500 $\mu\text{g/mL}$ é considerada média atividade e acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$ é considerada baixa atividade.

4.13.3 – Atividade Antioxidante

As análises foram realizadas com a colaboração da professora Dra. Rosane Nora Castro, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.13.3.1 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) - Determinação da CE_{50}

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Pérez et al. (2007), com pequenas modificações. A porcentagem de atividade antiradicalar (% AA) é calculada através da descoloração do radical DPPH $^{\bullet}$, segundo a equação abaixo (MENSOR et al., 2001). Para determinação da atividade antioxidante (% AA), foram selecionados para o controle negativo três valores, dos quais foi feita a média usada no cálculo ($\text{Abs}_{\text{controle}}$) e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços (10 e 11).

$$\% \text{AA} = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorbância da amostra com a solução de DPPH
 $\text{Abs}_{\text{branco}}$ = absorbância da amostra com metanol
 $\text{Abs}_{\text{controle}}$ = absorbância do metanol com a solução de DPPH

Para a determinação da CE_{50} das amostras de própolis (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e substância isolada) foram preparadas soluções de 1, 10, 25, 50, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, partindo de uma solução inicial de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os ensaios foram realizados utilizando duas microplacas com 96 poços para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição, onde foram pipetados 0,71 μL das soluções de extratos de própolis (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 0,71 μL de metanol, e

para o branco foram pipetados 0,29 μL de metanol e 0,71 μL da solução de própolis (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 0,29 μL da solução de DPPH e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520nm (Figura 11). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram utilizadas para a construção das curvas, as concentrações iniciais presentes nos poços a partir das diluições que foram feitas a 71%. Sendo assim, pode ser calculada as concentrações obtidas em cada poço, representada por [] poço = 0,71 x [] sol, onde as concentrações de 0,71, 7,10, 17,75, 35,50, 56,80 e 71,00 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas para as amostras de extratos diluídas de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

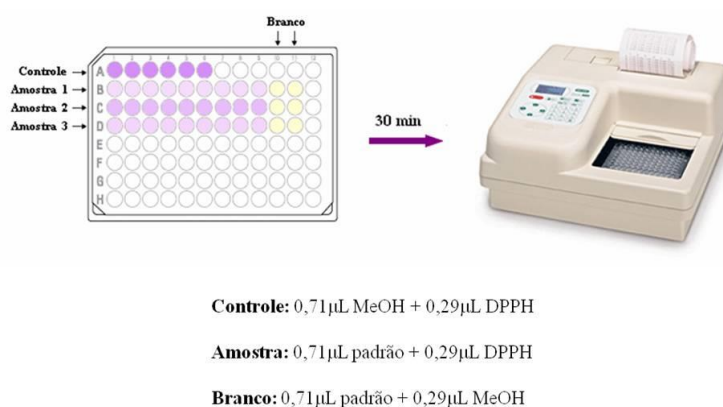


Figura 11 - Ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

4.13.3.2 - Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio]

A avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio com ABTS foi realizado segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007). O método consiste em medir a atividade antioxidante através da captura do radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$. O radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque 7 mM de ABTS com 88 μL da solução 140 mM de persulfato de potássio. A mistura é mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, 1 mL desta mistura é diluída com álcool etílico até obter

uma absorvância de $0,700 \pm 0,05$ nm a 734 nm. A solução deve ser preparada apenas no dia da análise.

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras de própolis (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) pelo método ABTS foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol-UV. A uma alíquota de 50 μ L dessa solução adicionou-se 5,0 mL de reagente de ABTS. A leitura da sua absorvância a 734 nm foi realizada após 6 minutos, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e álcool etílico como o branco. A curva analítica foi construída a partir de soluções de Trolox em concentração conhecida. Os resultados foram expressos em mmol de Trolox por 100 miligramas de extrato e todas as análises foram feitas em triplicatas.

Construção da curva analítica com Trolox

Uma curva analítica foi preparada uma curva analítica a partir da solução etanólica do padrão de Trolox. Em alíquotas de 50 μ L de concentrações variando de 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol/L, adicionou-se 5,0 mL do reagente de ABTS. A leitura da sua absorvância a 734 nm foi realizada após 6 minutos, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = -26.37778 \cdot X + 0.65164$, onde Y é a absorvância a 760 nm, X é a concentração de Trolox.

4.13.3.3 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

O teste de FRAP foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertonecelj et al. (2007). Este método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo Fe^{3+} - TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ), um complexo de cor mais intensa, na presença de antioxidantes. O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3.6), 2,5 mL de uma solução de 40 mM de HCl de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação.

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras de própolis (*in natura* bruta triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) pelo método FRAP foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol UV-HPLC. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 4,5 mL de Reagente de FRAP.

Manteve-se a mistura aquecida a 37°C por 10 minutos, onde a coloração da solução passou de azul claro para azul escuro. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 593 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a metanol UV como branco. Todos os ensaios foram efetuados em triplicada. Uma solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 - 1000 μM) foi utilizada como curva analítica e os resultados foram expressos em valores de FRAP (mmol de Fe (II) por 100 miligrama de extrato).

Construção da curva analítica com sulfato ferroso

Uma curva analítica foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa do padrão de sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Alíquotas de 0,5 mL de soluções de concentrações variando de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μM foram transferidas para tubos de ensaio, na qual acrescentou-se 4,5 mL do reagente de FRAP. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. As leituras foram feitas a 593 nm, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,00107 + 0,0018 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 593 nm, X é a concentração de sulfato ferroso heptaidratado.

4.13.3.4 - Análise estatística

Diferenças na porcentagem antioxidante, os fenólicos totais e as correlações entre o teor de compostos fenólicos em própolis e sua atividade antioxidante foram analisados aplicando o software Unscrambler X versão 10.1. O nível de significância foi de $p < 0,01$, a menos que seja indicado o contrário, e os coeficientes de correlação variaram de R 0,99006 a 99956.

4.13.4 – Atividade Antileishmania

As análises foram realizadas com a colaboração da professora Dra. Márcia Rosa de Oliveira, Laboratório de Biologia de *Leishmania*, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba.

4.13.4.1 - Preparo das soluções das amostras

Para os testes *in vitro*, as amostras foram pesadas (20 mg) e diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido [DMSO (CH_3)₂SO – Vetec, Brasil] sob agitação em Vortex (Daigger Vortex Genie 2, A. Daigger & Co., Inc, USA), obtendo-se assim, uma solução estoque de cada

amostra (Figura 12 – Página 68) com concentração final de 20 mg/mL e 100% de DMSO. Esta solução estoque foi diluída 10 vezes em tampão fosfato salina [PBS (NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, pH 7,4)], obtendo-se assim uma solução trabalho (Figura 12 – Página 68) de cada amostra com concentração final de 2 mg/mL e 10% de DMSO.

Posteriormente, foram estabelecidas seis concentrações (6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL e 200 µg/mL) utilizadas em cada um dos experimentos. A concentração final de DMSO em cultura não ultrapassou 1% (concentração esta que não apresenta toxicidade para os modelos celulares testados).

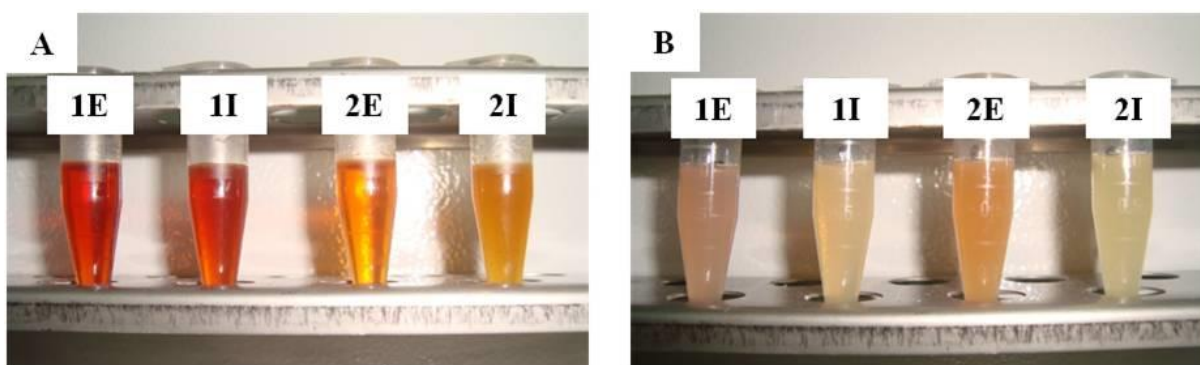


Figura 12 - A. Soluções estoques (20 mg/mL, DMSO) e **B.** Soluções trabalho (2 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2 de própolis vermelha *in natura* triturada e do extrato etanólico bruto seco. **1E** – extrato etanólico bruto da amostra 1. **1I** – *in natura* triturada da amostra 1. **2E** – extrato etanólico bruto da amostra 2. **2I** – *in natura* triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques

4.13.4.2 - Parasitas

No presente trabalho foram utilizadas as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). A cepa da *L. amazonensis* foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Norma Melo da Universidade Federal de Minas Gerais ou foi obtida por isolamento realizado pela Dra. Márcia Rosa de Oliveira, a partir de cães com diagnóstico de leishmaniose visceral, cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

4.13.4.3 - Cultivo e manutenção das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* PH 8

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) utilizadas no presente trabalho foram cultivadas, *in vitro*, em meio de cultura: meio líquido Schneider (para cultivo de parasitos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (Schneider completo). As culturas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e repicadas. As espécies de *Leishmania sp.* também foram criopreservadas para futuras utilizações. Para isto, adicionou-se 10% de glicerol estéril nas culturas de promastigotas no início da fase estacionária de crescimento, cultivadas apenas em meio Schneider completo. O glicerol foi adicionado lentamente à cultura sob agitação constante, e após 15 minutos, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação, e mantidas em freezer a -80°C e em nitrogênio líquido.

Conforme necessidade, essas culturas eram descongeladas à temperatura ambiente, observadas no microscópio comum, e uma alíquota de cerca de 200 μL era inoculada em 1 mL de meio Schneider completo e incubadas em estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para o crescimento das culturas. As cepas de *Leishmania amazonensis* PH8 encontram-se mantidas em estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Biologia Molecular - Universidade Federal da Paraíba.

4.13.4.4 - Curva de crescimento dos parasitos

Para avaliar o perfil de crescimento das formas promastigotas das espécies de *Leishmania amazonensis* PH8 (IFLA/BR/67/PH8), 1×10^6 promastigotas/mL foram inoculadas em meio Schneider completo e incubadas a $25 \pm 10^\circ\text{C}$ por sete dias. A cada 24 horas de cultivo eram retiradas alíquotas das suspensões, diluídas em solução de fixação ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5%, pH 7,2) e quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico comum (Olympus BX 41) num aumento final de 400x. A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1 mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula:

$$\text{Número de parasitas} = \text{Média dos quatro quadrantes} \times \text{fator de correção } (10^4) \times \text{inverso da diluição da amostra.}$$

O cálculo foi realizado levando-se em consideração o número total de células. O tempo de geração (período necessário para que a cultura duplique o número de células) foi

estimado graficamente utilizando papel milimetrado em escala logarítmica (Mono-log Canson).

4.13.4.5 - Avaliação da atividade antileishmania das amostras sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* PH 8

Para avaliação da atividade antipromastigota, experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo 1 mL de meio Schneider completo, onde adicionou-se uma alíquota de células de promastigotas de *Leishmania amazonensis* PH 8 (MHOM//BR/67/PH8), e as células foram ajustadas em 5×10^5 promastigotas/mL, em fase logarítmica de crescimento, na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações (6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL) das amostras de própolis (*in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e formononetina). Após 72 horas de incubação a $25^\circ\text{C} \pm 1$, alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada), analisadas sob microscopia óptica comum e quantificadas diretamente em câmara de Neubauer. A estimativa do número de parasitos/mL de cultura foi feita utilizando a fórmula:

$$\text{Número de parasitas} = \text{Média dos quatro quadrantes} \times \text{fator de correção } (10^4) \times \text{inverso da diluição da amostra.}$$

Paralelamente, as culturas de *Leishmania sp.* foram avaliadas quanto à sensibilidade ao Glucantime® [300 mg/mL (Aventis Pharma, Brasil)] e a Anfotericina B® [1 mg/mL (Cristália, COD 21.1184.v/08)], como drogas de referência. Ambas as substâncias foram diluídas em meio Scheneider completo, de acordo com as concentrações testadas. Esses medicamentos foram cedidos gentilmente pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB. As culturas mantidas na ausência dos compostos foram denominadas controles, onde seu crescimento foi considerado 100% e os cálculos da porcentagem de inibição dos compostos foram realizados em relação a esta cultura controle.

4.13.4.6 - Análise Estatística

Os dados obtidos de todos os experimentos foram comparados utilizando o teste “t-Student” para dados paramétricos. Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados

significativos. Para o cálculo da CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos) foi utilizado o modelo probit de análise de regressão, utilizando o programa SPSS 8.0 for Windows.

4.13.5 – Atividade Antileucêmica

As análises foram realizadas com a colaboração do professor Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo, Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

4.13.5.1 - Preparo das soluções das amostras

Para os testes *in vitro*, as amostras foram pesadas (20 mg) e diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido [DMSO (CH_3)₂SO – Vetec, Brasil] sob agitação em Vortex (Daigger Vortex Genie 2, A. Daigger & Co., Inc, USA), padronizando assim, uma solução estoque (Figura 13) de cada amostra com concentração final de 20 mg/mL e 100% de DMSO. Esta solução estoque foi diluída 10 vezes meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos: penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL e suplementado com 10% de SBF, caracterizando assim uma solução trabalho de cada amostra com concentração final de 2 mg/mL e 10% de DMSO. Posteriormente, foram estabelecidas sete concentrações (6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL, 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL) utilizadas em cada um dos experimentos. A substância isolada foi testada em outras seis concentrações diferentes (3,125 µg/mL; 6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL). A concentração final de DMSO em cultura não ultrapassou 1% (concentração esta que não apresenta toxicidade para os modelos celulares testados).

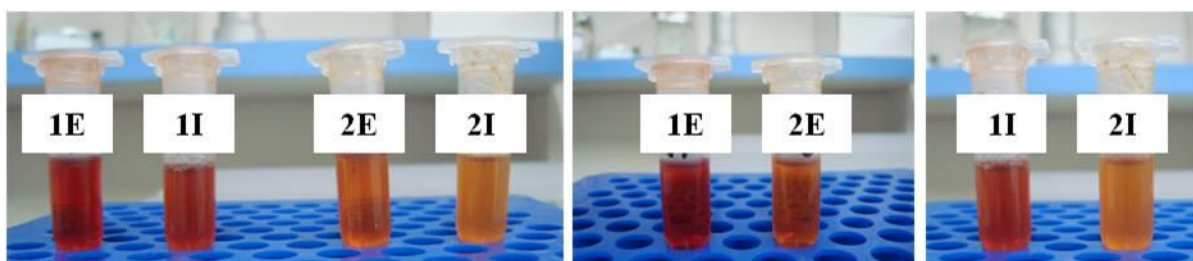


Figura 13 - Soluções estoques (20 mg/mL, DMSO) das amostras 1 e 2 de própolis vermelha *in natura* triturada e extrato etanólico bruto. **1E** – extrato etanólico bruto da amostra 1. **1I** – *in natura* triturada da amostra 1. **2E** – extrato etanólico bruto da amostra 2. **2I** – *in natura* triturada da amostra 2. Foto: ©Michelline Marques

4.13.5.2 - Linhagens Celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais (Figura 14 – Página 73): K562, leucemia mielógena crônica humana e HL-60, leucemia promielocítica aguda, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos: penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL e suplementado com 10% de SBF.

As células foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e em seguida incubadas com 5% de CO₂ a 37°C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, com auxílio de microscópio invertido, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Ao atingir 80% de confluência, era feita a tripsinização, no caso das células aderentes, retirando o sobrenadante e adicionando 1,5mL de solução de tripsinização, por 5 min., ou até observar-se o descolamento da monocamada de células da parede do frasco. Após esse período era acrescentado 5 mL de meio RPMI com 10% de SBF para interromper a ação da tripsina. As células foram então centrifugadas a 500 x g/5 min. e resuspensas em 2 mL de meio com SFB para contagem em câmara de Neubauer. Se a cultura apresentasse acima de 90% de células viáveis eram então destinadas aos experimentos, e uma alíquota era colocada em novos frascos para cultivo. As células em suspensão, das culturas eram diretamente centrifugadas.

Para manter o estoque das células parte das culturas foram congeladas. As células foram removidas das garrafas por tripsinização, e centrifugadas por 5 min. a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet resuspenso em 2 mL de meio RPMI com 10% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que desidrata as células e impede que elas sejam criofraturadas pelo cristais de gelo formado. Em seguida as amostras foram adicionadas em tubos criogênicos de 1,0 mL e levadas por meia hora a temperatura de -20°C, em seguida a -80°C por mais meia hora, e estocado em tambor de nitrogênio líquido.

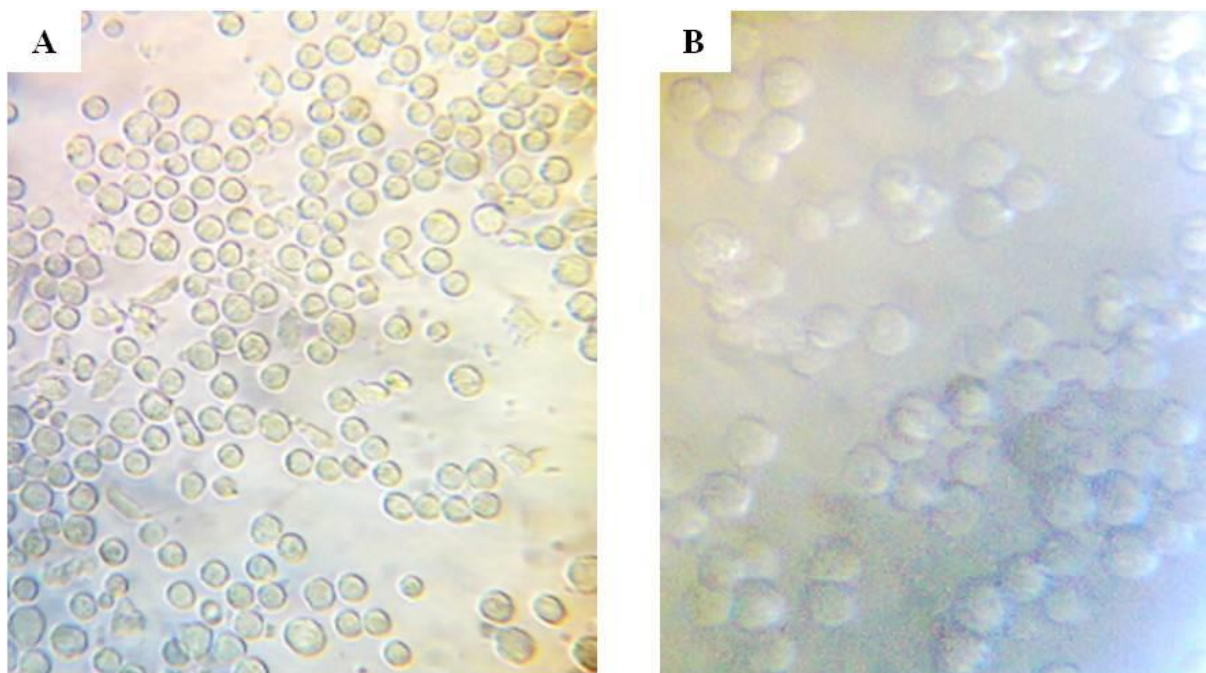


Figura 14 - Microfotografia de contraste de fase em microscópio óptico invertido. Aumento: 400 x. **A.** Linhagem celular HL-60. **B.** Linhagem celular K562.

4.13.5.3 - Estudo da atividade citotóxica *in vitro* – Ensaio com MTT

A redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difeniltetrazolium) é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a citotoxicidade de muitos compostos (KIM et al., 2009). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais (LIU et al., 1997). Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com os seus subprodutos, NADH e NADPH (LIU et al., 1997). Os cristais de formazan podem ser então dissolvidos e quantificados espectrofotometricamente (FREIMOSER et al., 1999). O valor da absorbância desse composto guarda uma proporção com o número de células viáveis (SERRANO et al., 2004).

4.13.5.4 - Metodologia experimental

As células foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/mL em placas com 96 poços, utilizando-se meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). O meio RPMI não continha vermelho de fenol. As células foram tratadas com concentrações crescentes das amostras, sendo as placas mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C por períodos que variaram entre 24 e 72 horas. Após o

tempo de incubação, retirou-se 110 μL do sobrenadante e colocou-se 10 μL de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich, EUA). Após 4 horas, acrescentou-se 100 μL de uma solução de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,01% de ácido clorídrico (HCl) para solubilizar os cristais de formazam. A leitura da placa foi feita com 12 hs, a 570 nm, em leitor tipo ELISA (Biotek Instruments EL800, EUA) (SILVEIRA, 2007).

4.13.5.5 - Análise Estatística

Os produtos foram testados em triplicata com um $n \geq 3$. Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração de cada produto. Foi determinada a CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.03. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Análise palinológica das amostras de própolis vermelha *in natura*

Devido à grande diversidade da flora brasileira, é necessário expandir os conhecimentos científicos acerca da origem botânica e geográfica do produto (TEIXEIRA et al., 2003; BARTH, 2004). A enorme disponibilidade dos derivados apícolas brasileiros no mercado e o crescente interesse internacional são um incentivo para que ocorra o aumento das pesquisas de caracterização palinológica da própolis produzida no país, de forma a ampliar o controle da qualidade deste produto (LUZ et al., 2007).

Sendo assim, a análise palinológica é um instrumento precioso para a verificação e rotulagem das amostras desse produto apícola, uma vez que permite determinar sua origem geográfica, fazendo a distinção entre as diferentes regiões produtoras e a estação do ano em que foram elaboradas (BARTH, 1998; BARTH et al., 1999).

Nas duas amostras estudadas de própolis vermelha do município de Igarassu do estado de Pernambuco foram encontrados 22 tipos polínicos, que foram devidamente identificados e pertencem a 16 famílias e 20 gêneros botânicos (Tabela 4). A família Rubiaceae obteve destaque com três tipos polínicos encontrados. O número de tipos polínicos por amostra variou de 15 na amostra 1 a 17 na amostra 2 (Tabela 4).

Apenas a amostra 1 teve a totalidade de seus tipos polínicos (15) identificados taxonomicamente, enquanto na amostra 2 houve um residual de grãos de pólen cujos tipos polínicos não foram identificados. Contudo, é importante ressaltar que a quantidade de grãos não identificados foi pequena, apenas 0,97% na amostra 2 (Tabela 4).

Dentre os 22 tipos polínicos encontrados, 14 estão representados na Figura 15, dez ocorreram nas duas amostras analisadas, são eles: *Borreria* (Figura 15 A), *Dalbergia* (Figura 15 B), Fabaceae 1 (Figura 15 B), *Mikania*, *Myrcia*, Poaceae (Figura 15 G), *Phyllanthus*, *Richardia* (Figura 15 I), *Stigmaphyllon* (Figura 15 L) e *Syagrus* (Figura 15 M). Nas duas amostras coletadas em maio de 2012 o tipo polínico que apareceu em maior frequência foi o de *Stigmaphyllon* (Figura 15 L), 83,9% (amostra 1) e 51,9% (amostra 2).

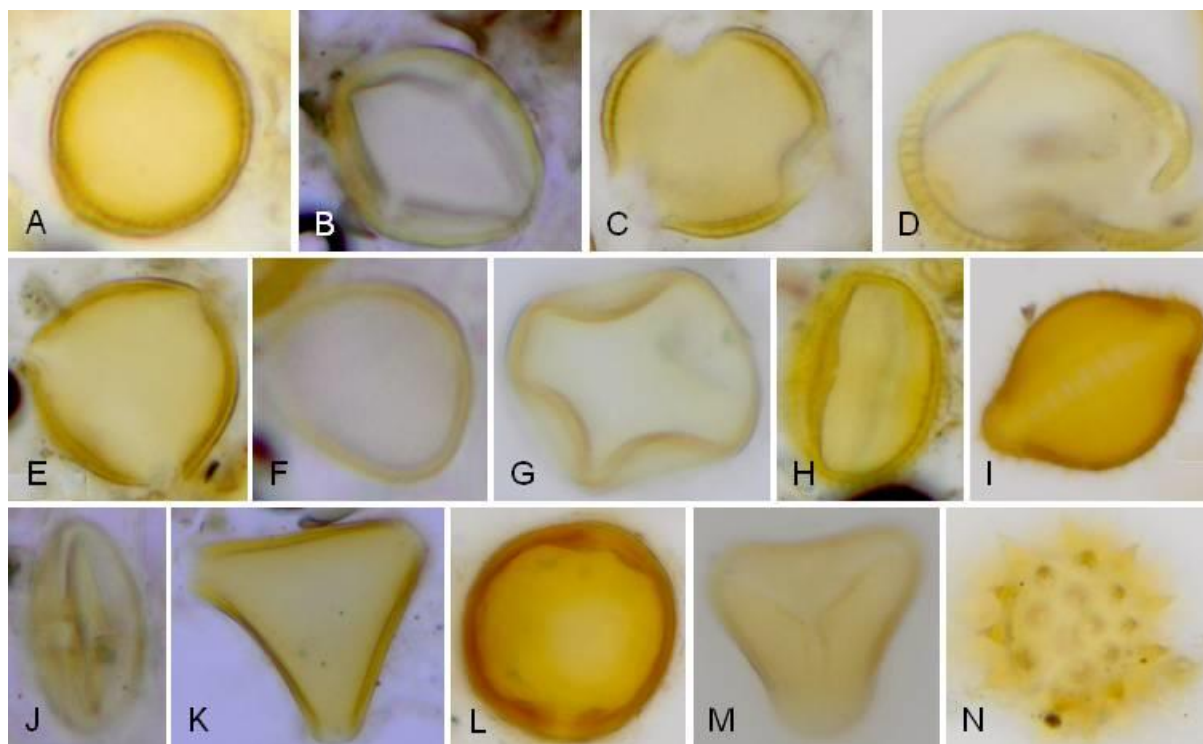


Figura 15 - Tipos polínicos encontrados nas amostras de própolis vermelha estudadas de Igarassu, estado de Pernambuco, Brasil. **A.** *Borreria*. **B.** *Dalbergia*. **C.** Fabaceae 1. **D.** Fabaceae 2. **E.** Fabaceae 3. **F.** *Ficus*. **G.** Poaceae. **H.** *Psychotria*. **I.** *Richardia*. **J.** *Schinus*. **K.** *Serjania*. **L.** *Stigmaphyllon*. **M.** *Syagrus*. **N.** *Venonanthura*.

Luz et al. (2009) realizaram análise palinológica em sete amostras de própolis vermelha brasileira, produzidas no Nordeste, três amostras do estado de Alagoas, três amostras do estado da Bahia e uma amostra do estado da Paraíba, onde os tipos *Mimosa scabrella*, *Mimosa verrucosa*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Cocos nucifera* e *Cecropia* foram os mais frequentes nesse estudo. Dos tipos polínicos encontrados por Luz et al. (2009), apenas *Cecropia* foi identificada nas amostras de própolis vermelha do município de Igarassu, estado de Pernambuco. Ressaltando ainda, que o pólen de *Cecropia* foi identificado em todas as amostras, com exceção da amostra 1 coletada em maio de 2012 (Tabela 4).

Essa ocorrência ampla do tipo polínico *Cecropia* é comum, uma vez que ele representa, segundo Colinviaux et al. (1999), uma grande lista de espécies cujos grãos de pólen são anemófilos (dispersos pelo vento) e assim contaminam o material coletado pelas abelhas para confecção da própolis. O gênero *Cecropia* (Cecropiaceae) tem ampla ocorrência no Brasil, estando presente na maior parte dos biomas do país, principalmente em áreas de matas secundárias (LORENZI, 2002 a, b)

Freitas et al. (2011) analisaram 28 amostras de própolis produzidas em diferentes estados brasileiros, duas amostras do Nordeste, 18 amostras do Sudeste e oito amostras do Sul. Os tipos polínicos dominantes que ocorrem nas amostras do Nordeste foram de *Mimosa verrucosa* (Irecê - Bahia) e *Borreria densiflora* (João Câmara - Rio Grande do Norte). Destes, o tipo polínico de *Borreria* foi identificado em todas as amostras de própolis vermelha (com exceção da amostra 2 coletada em abril de 2011) do município de Igarassu, estado de Pernambuco.

Assumiu-se que o exsudato vermelho resinoso de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), o "rabo de bugio", seja a origem botânica da própolis vermelha, pois foram observadas abelhas coletando-o desta planta (SILVA et al., 2007). Por serem os isoflavonóides, típicos da família Fabaceae, alguns autores sugeriram que estes possam ser usados como marcadores da origem botânica deste produto (SILVA et al., 2007). Comparações qualitativas e quantitativas dos flavonoides e outros constituintes químicos entre os perfis cromatográficos da própolis vermelha e dos exsudatos resinosos da planta *D. ecastaphyllum* indicaram similaridade nos padrões (DAUGSCH et al. 2007; SILVA et al. 2007).

Daugsch et al. (2007) analisaram as estruturas anatômicas de *Dalbergia ecastaphyllum*, tais como os parênquimas lignificados e as células parenquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado. As amostras de própolis vermelha do grupo 13 apresentaram na análise microscópica diversos elementos que caracterizam a presença de *Dalbergia ecastaphyllum*. Foi encontrada na própolis, a presença de tricomas que são os mesmos encontrados na planta *Dalbergia ecastaphyllum*. A análise comparativa entre os elementos microscópicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13 e observados no estudo realizado para *Dalbergia ecastaphyllum*, como os ápices vegetativos, demonstrou que os elementos botânicos encontrados são idênticos.

Luz et al. (2009) observaram que grãos de pólen de *Dalbergia ecastaphyllum*, planta considerada em outros estudos como a fornecedora da resina para a própolis vermelha, não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas, o que não indica a falta de ocorrência desta espécie nas áreas em estudo. No entanto, nas duas amostras de própolis vermelha de Igarassu – PE, analisadas no nosso trabalho, coletadas em meses e anos diferentes, foram detectados pólen de *Dalbergia*, com maior frequência nas amostras coletadas em abril de 2011 do que as amostras coletadas em maio de 2012 (Tabela 4 – Página 80).

De modo geral, a própolis contém 50 – 60% de resinas e bálsamos vegetais, 30 – 40% de ceras, 5 – 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de grãos de pólen, além de

microelementos como alumínio, cálcio, ferro, cobre, estrôncio, manganês e pequenas quantidades de vitamina B₁, B₂, B₆, C e E (GHISALBERTI, 1979; ALENCAR, 2002; MENEZES, 2005; FUNARI; FERRO, 2006). Portanto, apenas cerca de 5% do peso da própolis é formado por grãos de pólen que participa como contaminante do produto (GHISALBERTI, 1979; WARAKOMSKA, MACIEJEWICZ, 1992; BARTH et al. 1999).

O espectro polínico resultante do resíduo insolúvel em álcool da própolis contém grãos de pólen entomófilos (trazidos pelas abelhas) e grãos de pólen anemófilos (dispersos pelo vento) aderidos à resina. Contudo, esta ferramenta não pode ser utilizada para assegurar a real origem botânica de uma amostra de própolis, uma vez que os grãos de pólen contaminantes, anemófilos principalmente, podem levar a uma interpretação errônea dos resultados.

Pode elucidar também sobre a estação do ano em que foi elaborada, pois a liberação dos grãos de pólen no meio ambiente depende da época de floração das plantas, oferecendo resultados que podem ser usados para a verificação de rotulagem das amostras (BARTH, 1998; BARTH et al. 1999). Porém, a origem botânica da própolis pode ser comprovada somente quando vários métodos são adotados em conjunto com a análise palinológica tais como o estudo da composição florística das áreas de alocação das colméias com relação às principais fontes de resinas; observação do comportamento de coleta de matéria-prima pelas abelhas em campo; a análise dos perfis físico-químicos e a observação das estruturas anatômicas vegetais presentes em sua composição.

Foi afirmado também que nas áreas onde *D. ecastaphyllum* é rara ou não está presente, as abelhas coletam a resina vermelha de outras plantas, misturando-as. Várias espécies de plantas encontradas no litoral nordestino produzem exsudato avermelhado como *Anacardium occidentale* L. ("cajuero", Anacardiaceae), *Clusia* sp. ("cebola da restinga", Clusiaceae) (KAMINSKI, ABSY, 2006), *Protium* sp. ("almécega, alméscar, breu vermelho", Burseraceae), *Schinus terebinthifolius* Raddi ("aroeira vermelha", Anacardiaceae) (SAWAYA et al. 2006), *Tapirira* sp. ("pau pombo, cupiúba", Anacardiaceae) e *Vismia* ("lacre", Clusiaceae) (ABSY, KERR, 1977). No nosso estudo, foi detectado pólen de *Schinus* nas duas amostras analisadas e pólen de *Protium* apenas na amostra 2.

Tabela 4 – Tipos polínicos (%) presentes nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha coletadas em maio de 2012 em Igarassu – PE.

Tipos polínicos	Amostra 1	Amostra 2

Tipos polínicos	Amostra 1	Amostra 2
Anacardiaceae		
<i>Schinus</i>	0,70	0,70
<i>Spondias</i>	0,40	
Arecaceae		
<i>Syagrus</i>	2,10	2,41
Asteraceae		
<i>Mikania</i>	0,20	0,48
<i>Venonanthura</i>	-	2,42
Buseraceae		
<i>Protium</i>	-	0,48
Convolvulaceae		
<i>Jacquemontia</i>	-	-
Fabaceae		
<i>Bauhinia</i>	-	-
<i>Dalbergia</i>	4,60	6,31
<i>Delonix regia</i>	-	-
Fabaceae 1	2,40	3,88
<i>Mimosa tenuiflora</i>	0,20	-
<i>Senna</i>	0,40	-
Laminaceae		
<i>Hyptis</i>	-	0,48
Malpighiaceae		
<i>Stigmaphyllon</i>	83,90	65,53
Moraceae		
<i>Ficus</i>	-	5,82
Myrtaceae		
<i>Myrcia</i>	0,70	0,97
Poaceae	0,40	0,97
Phytolaccaceae		
<i>Microtea</i>	-	-
Phyllanthaceae		

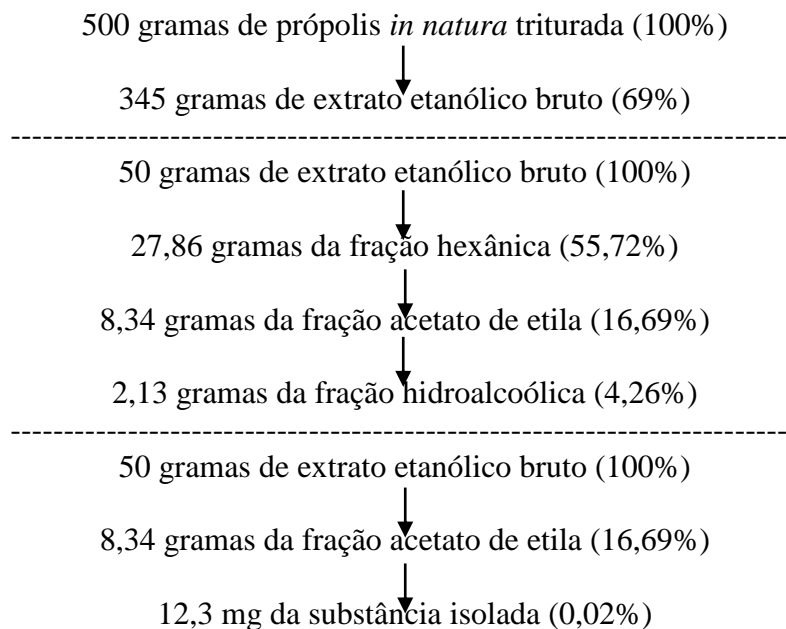
Tipos polínicos	Amostra 1	Amostra 2
<i>Phyllanthus</i>	0,90	1,46
Rubiaceae		
<i>Borreria</i>	1,40	0,97
<i>Mitracarpus 1</i>	-	-
<i>Mitracarpus 2</i>	-	-
<i>Psychotria</i>	-	0,48
<i>Richardia</i>	0,70	1,94
Sapindaceae		
<i>Serjania</i>	0,20	-
Urticaceae		
<i>Cecropia</i>	-	2,91
Tipos polínicos não identificados		0,97
Total de tipos polínicos (no.)	15	17

5.2 – Preparo e fracionamento do extrato etanólico bruto

A partir de 500 gramas de própolis *in natura* triturada, foi obtido 345 gramas de extrato etanólico bruto da amostra 1 com rendimento de 69% e 335 gramas de extrato etanólico bruto da amostra 2 com rendimento de 67% (Figura 16). Depois de preparado, o extrato foi submetido ao fracionamento, que iniciou-se pela extração líquido-líquido, esse tipo de cromatografia é denominada cromatografia de partição, e a partição líquido-líquido é uma técnica cromatográfica que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra entre os solventes imiscíveis (CABRAL, 2008). Uma amostra de 50 gramas do extrato etanólico bruto foi suspensa numa mistura de 100 mL de metanol grau HPLC e 100 mL de água destilada (1:1, v / v). A solução foi colocada em um funil de separação e fracionado por extração líquido-líquido com solvente hexano (700 mL, 7 extrações para a amostra 1 e 400 mL, 4 extrações para a amostra 2) e acetato de etila (500 mL, 5 extrações para a amostra 1 e 2). As frações resultantes foram evaporadas até à secura para proporcionar: fração hexânica (27,86 gramas – 55,72%), fração acetato de etila (8,34 gramas – 16,69%) e fração hidroalcoólica (2,13 gramas – 4,26%) da amostra 1 e fração hexânica (27,89 gramas – 55,79%), fração acetato de etila (9,14 gramas – 18,29%) e fração hidroalcoólica (1,70 gramas – 3,41%) da amostra 2 (Figura 16). O processo de fracionamento separa compostos com polaridades diferentes e fornece frações de diferentes composições e propriedades com

atividades farmacológicas individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial (CABRAL, 2008).

AMOSTRA 1



AMOSTRA 2

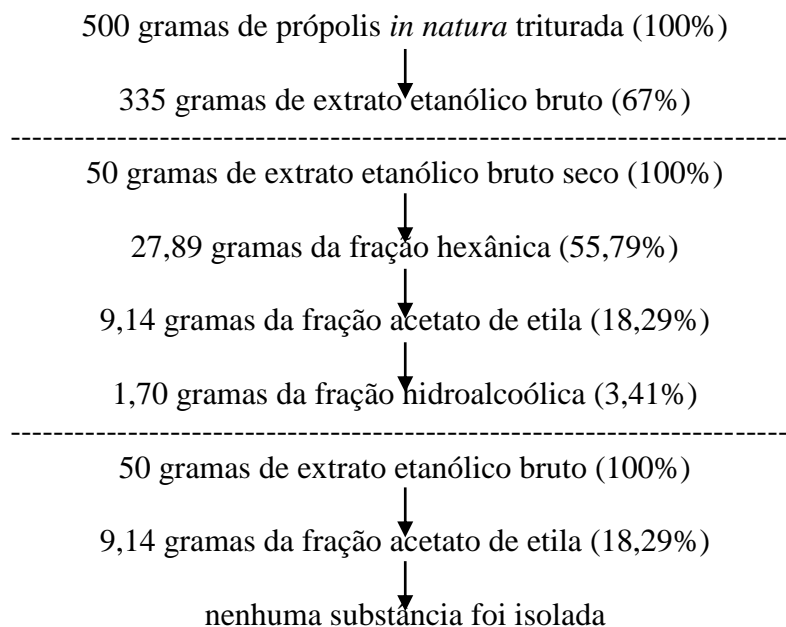


Figura 16 – Esquema demonstrativo dos rendimentos das amostras 1 e 2 de própolis vermelha.

5.3 - Fracionamento e purificação da fração acetato de etila da amostra 1

A eluição da fração acetato de etila da amostra 1 através da coluna cromatográfica LH-20, gerou 48 subfrações (1 - 48), que foram reunidas em quatro sub-grupos (F7-8, F9-14, F15-29 e F30-48) de acordo com seus perfis fitoquímicos de CCDA. As subfrações 13 e 14 da fração acetato de etila da amostra 1, produziram um precipitado em forma de cristais e os cristais da subfração 14 foram filtrados, secos e submetidos a espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 18 - 22), para a elucidação estrutural. Os dados espectrais (Tabela 5) confirmaram a identidade da substância, tal como a isoflavona formononetina (12,3 mg – 0,2%) conforme mostra a figura 17.

5.4 - Identificação estrutural da formononetina

No espectro de RMN ^1H (DMSO - D_6 , 300 MHz) observou-se a presença de sinais característicos de dois sistemas aromáticos substituídos, que juntamente com o singlete em 8,34 ppm característico de hidrogênio olefínico ligado a carbono oxigenado sugeriu a estrutura de um flavonoide.

O duplete em 7,51 ppm ($J = 8,7$ Hz) integrado para 2 hidrogênios (H-2' e H-6'), juntamente com o duplete em 6,94 ppm ($J = 8,8$ Hz) também integrado para 2 hidrogênios (H-3' e H-5') indicaram a presença de um anel aromático p-dissubstituído. O conjunto de sinais em 6,87 ppm (d, 2.1 Hz, 1 hidrogênio), 6,99 ppm (dd, 9Hz, 2.1Hz, 1 hidrogênio) e o sinal em 7,98 ppm (d, 9Hz, 1 hidrogênio) indicou dois hidrogênios aromáticos acoplados em posição orto (H-5 e H-6) e um hidrogênio acoplado em posição meta (H-8), completando assim os sinais para os hidrogênios aromáticos. A comparação dos deslocamentos químicos para hidrogênio e carbono com os dados da literatura (Tabela 5) permitiu identificar a substância como a isoflavona formononetina.

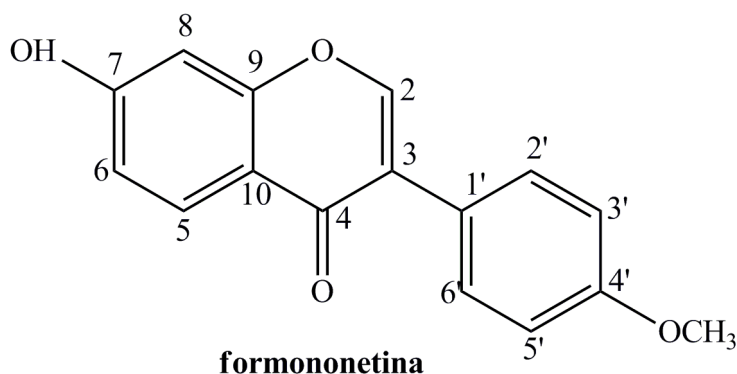


Figura 17 - Estrutura da isoflavona formononetina.

Tabela 5 - Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C da formononetina isolada da amostra 1 de própolis vermelha.

Posição	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}^*$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}^{**}$
OMe	3.79 (s)	3.82 (s)	55.11	54.2
2	8.34 (s)	8.02 (s)	153.12	152.26
3			123.12	122.67
4			174.57	178.58
5	7.98 (d, 9.0)	7.91 (d, 8.09)	127.27	127.19
6	6.99 (dd, 9.0, 2.1)	6.75 (dd, 8.9, 2.2)	115.16	115.05
7			162.56	162.62
8	6.87 (d, 2.1)	6.58 (d, 2.2)	102.10	102.15
9			157.42	157.64
10			116.58	116.87
1'			124.21	123.91
2'	7.51 (d, 8.7)	7.44 (d, 8.7)	130.05	129.98
3'	6.94 (d, 8.8)	6.96 (d, 8.7)	113.57	115.05
4'			158.92	157.33
5'	6.94 (d, 8.8)	6.96 (d, 8.7)	113.57	115.05
6'	7.51 (d, 8.7)	7.44 (d, 8.7)	130.05	129.98

Espectro em DMSO – 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C).

*valores de ^1H comparados com Khamsan et al., 2012 (espectros em MeOH).

**valores de ^{13}C comparados com Jha, Zilliken, Breitmaier, 1980 (espectros em CDCl_3 e DMSO – D_6).

Onde: s = singlete, d = dublete, dd = duplo dublete.

5.5 – Substância isolada da fração acetato de etila da amostra 1 de própolis vermelha

O estudo fitoquímico das amostras 1 e 2 de própolis vermelha, coletadas em maio de 2012, em dois apiários diferentes, em Igarassu-PE, resultou no isolamento e identificação estrutural da isoflavona formononetina. A substância foi isolada da subfração 14 da fração acetato de etila da amostra 1 de própolis vermelha (Figura 17).

De acordo com Oliveira (2005) as isoflavonas são compostos bastante raros na natureza, apresentando normalmente substituintes como grupos hidroxí/metoxi nas posições 7, 2' e 4', menos frequentemente nas posições 8 e 3'. Os isoflavonoides, dentre eles as isoflavonas, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antimicrobiana

(TRUSCHEVA et al., 2006), anticâncer (LI et al., 2008; AWALE et al., 2008), antioxidante (CABRAL et al., 2009), além de serem associados a diversos benefícios para a saúde, como prevenção de doenças cardiovasculares (PICCINELLI et al., 2005), combate ao colesterol, prevenção da osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa (OLONI, 2007).

Os isoflavonoides são uma subclasse dos flavonoides e possuem uma distribuição limitada na natureza. São compostos intrínsecos das plantas, cuja quantidade depende de fatores como crescimento e base genética. Embora várias plantas sintetizem isoflavonoides, a forma bioativa para o consumo humano está presente em poucos vegetais, que são espécies tipicamente da família das leguminosas (DEWICK, 1996; PETERSON, DWYER, 1998).

Desta forma, estes compostos podem ser úteis como marcadores químicos deste novo tipo de própolis (OLDONI, 2007). Os isoflavonoides em geral são considerados constituintes característicos de plantas da família Leguminosae (PICCINELLI et al., 2005). A presença desses compostos na própolis vermelha brasileira corrobora com a evidência de que sua origem botânica seja uma espécie de leguminosa, conforme verificado por Silva et al. (2007) e demonstra a importância dessa família como fonte de resinas com compostos bioativos para a produção de própolis.

No Brasil, um novo tipo de própolis proveniente do Estado de Alagoas e denominada de própolis vermelha teve a sua composição química e origem botânica estudada por Silva et al. (2007) e Alencar et al. (2007). O extrato etanólico da própolis e de 20 resinas diferentes, secretadas por espécies de plantas mencionadas como a provável origem botânica, foram avaliados por espectrofotometria na região UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas. Todas as evidências fitoquímicas demonstraram ser *Dalbergia ecastaphyllum*, que é uma leguminosa normalmente encontrada na América tropical e África, rica em isoflavonas, como sendo a principal fonte da própolis vermelha de Alagoas. Esse foi o primeiro relato de uma própolis brasileira ter com fonte botânica uma espécie de leguminosa, o que corrobora com o fato da presença de várias isoflavonas em sua composição química (CABRAL, 2008).

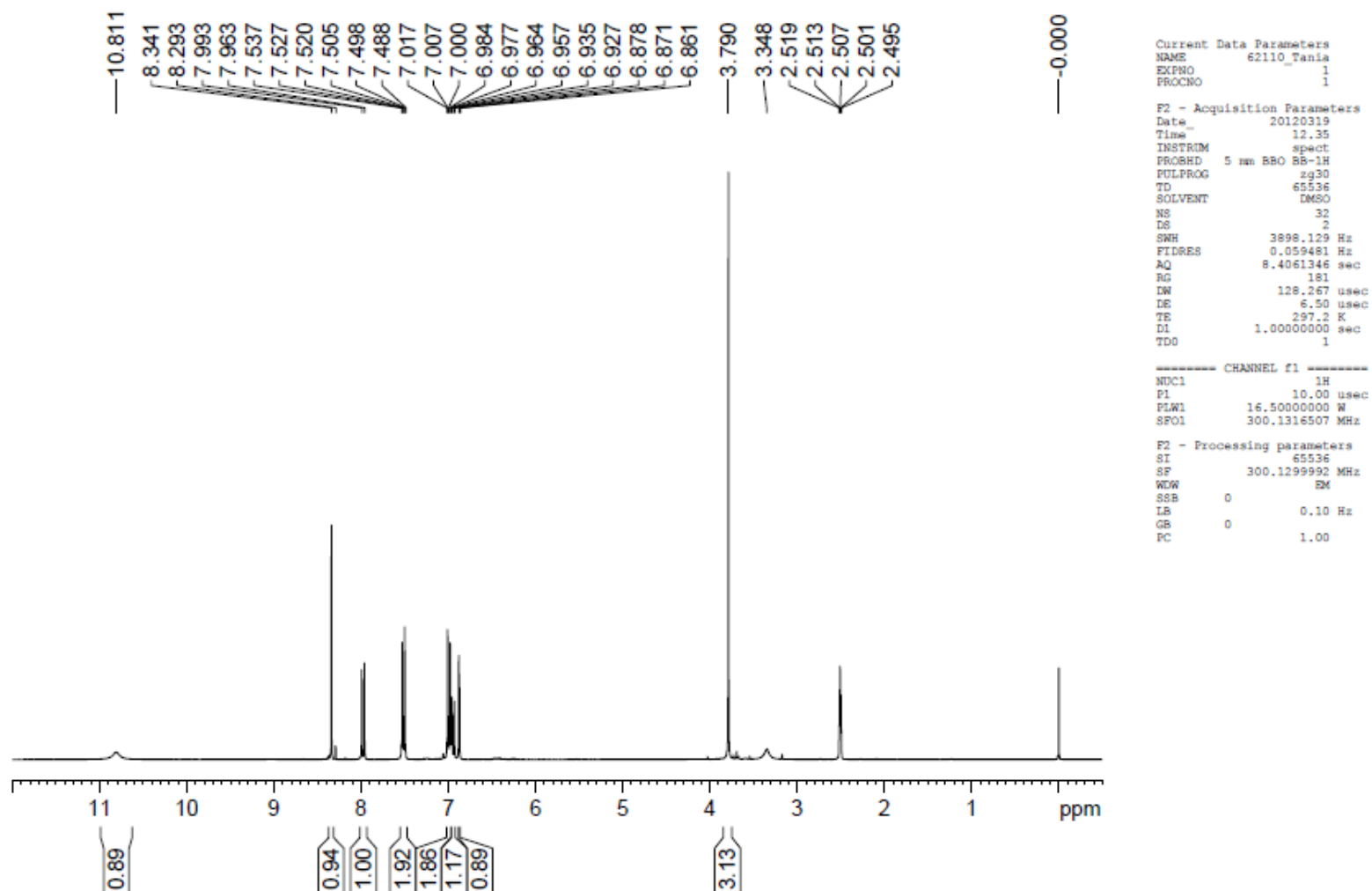


Figura 18 – Espectro de RMN ^1H (DMSO - D6 - 300 MHz) de formononetina.

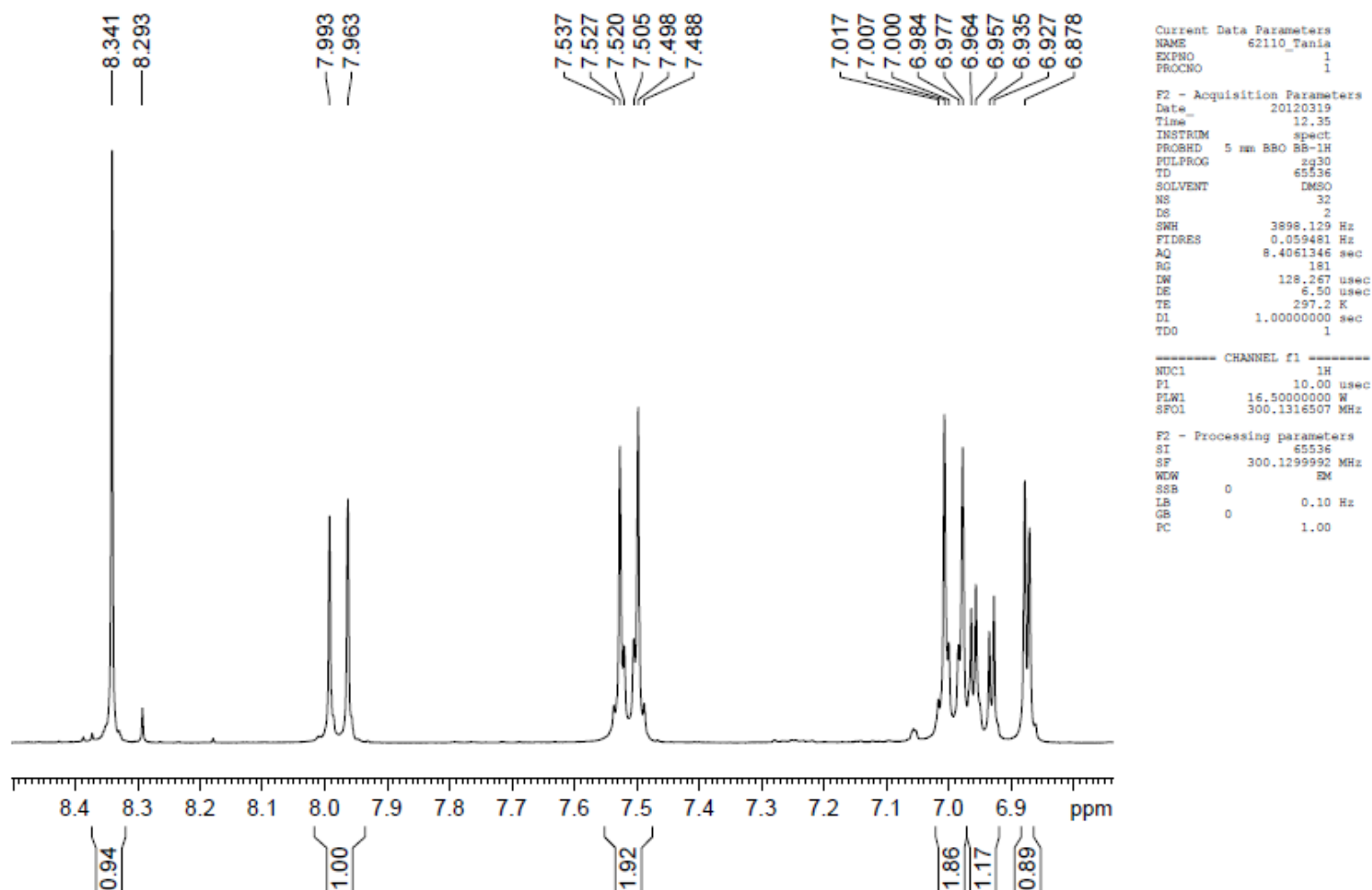


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ^1H (DMSO - D₆ - 300 MHz) de formononetina na região de 6,9 – 8,4 ppm.

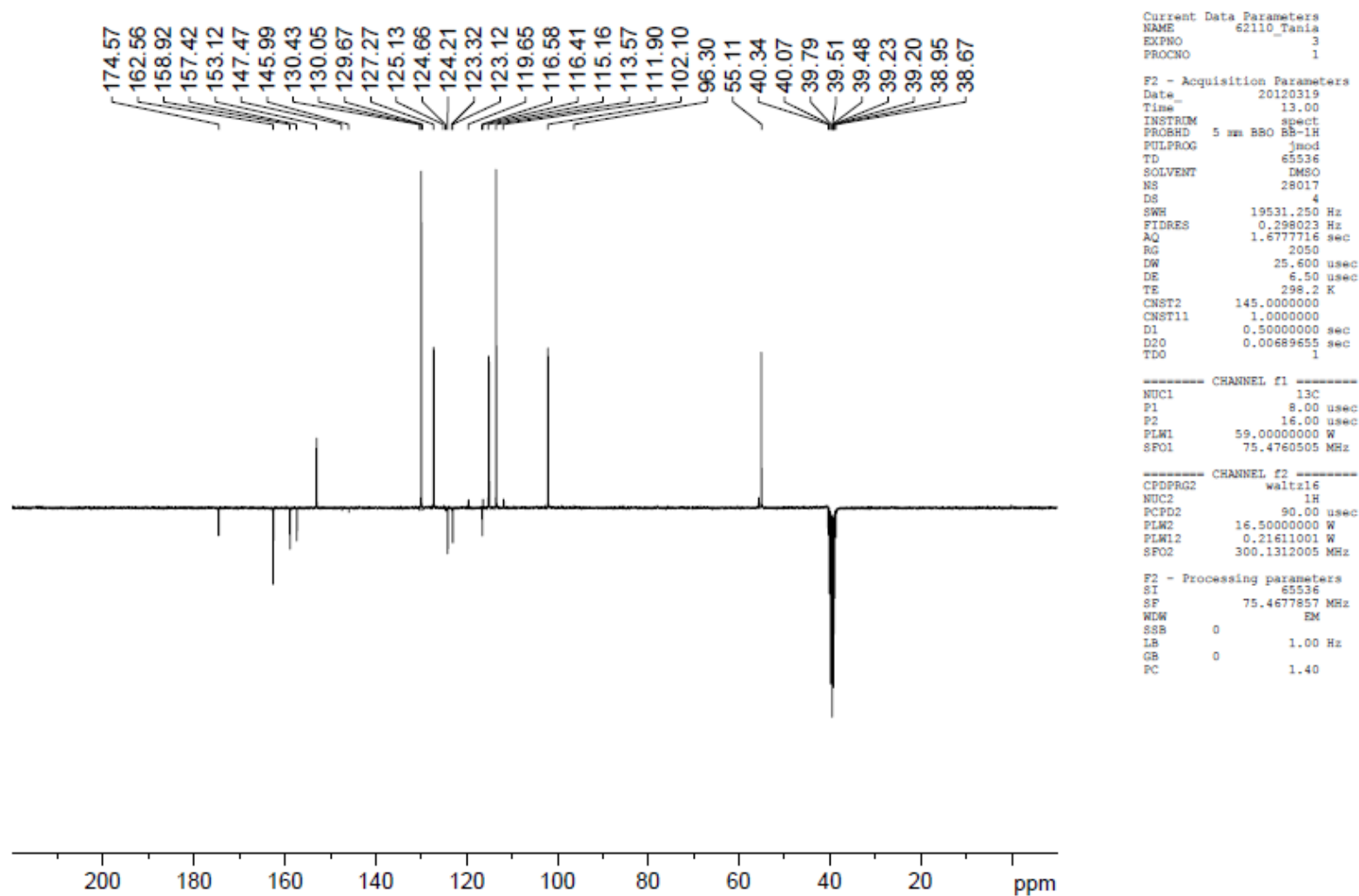


Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina.

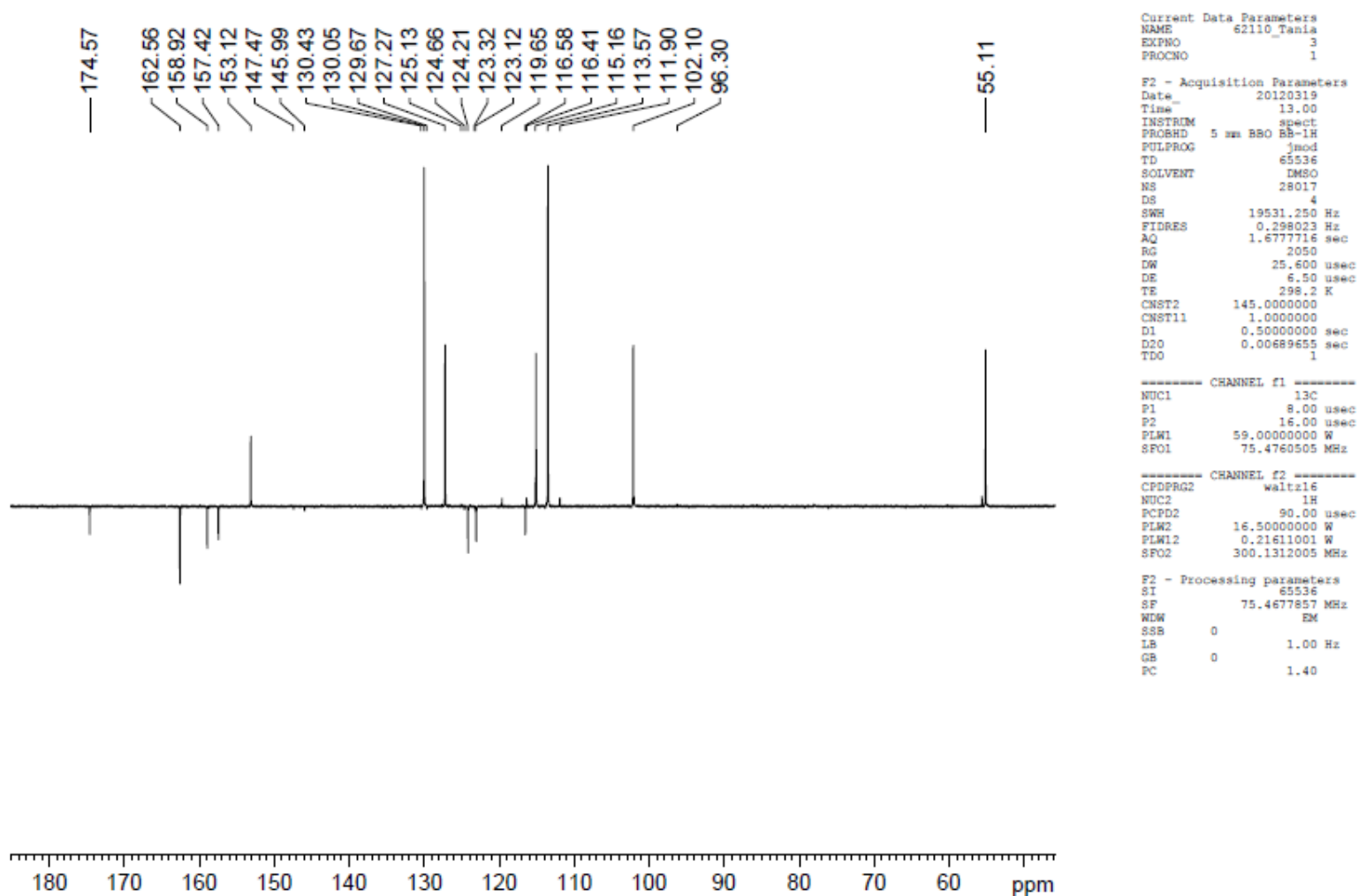


Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina na região de 60 – 180 ppm.

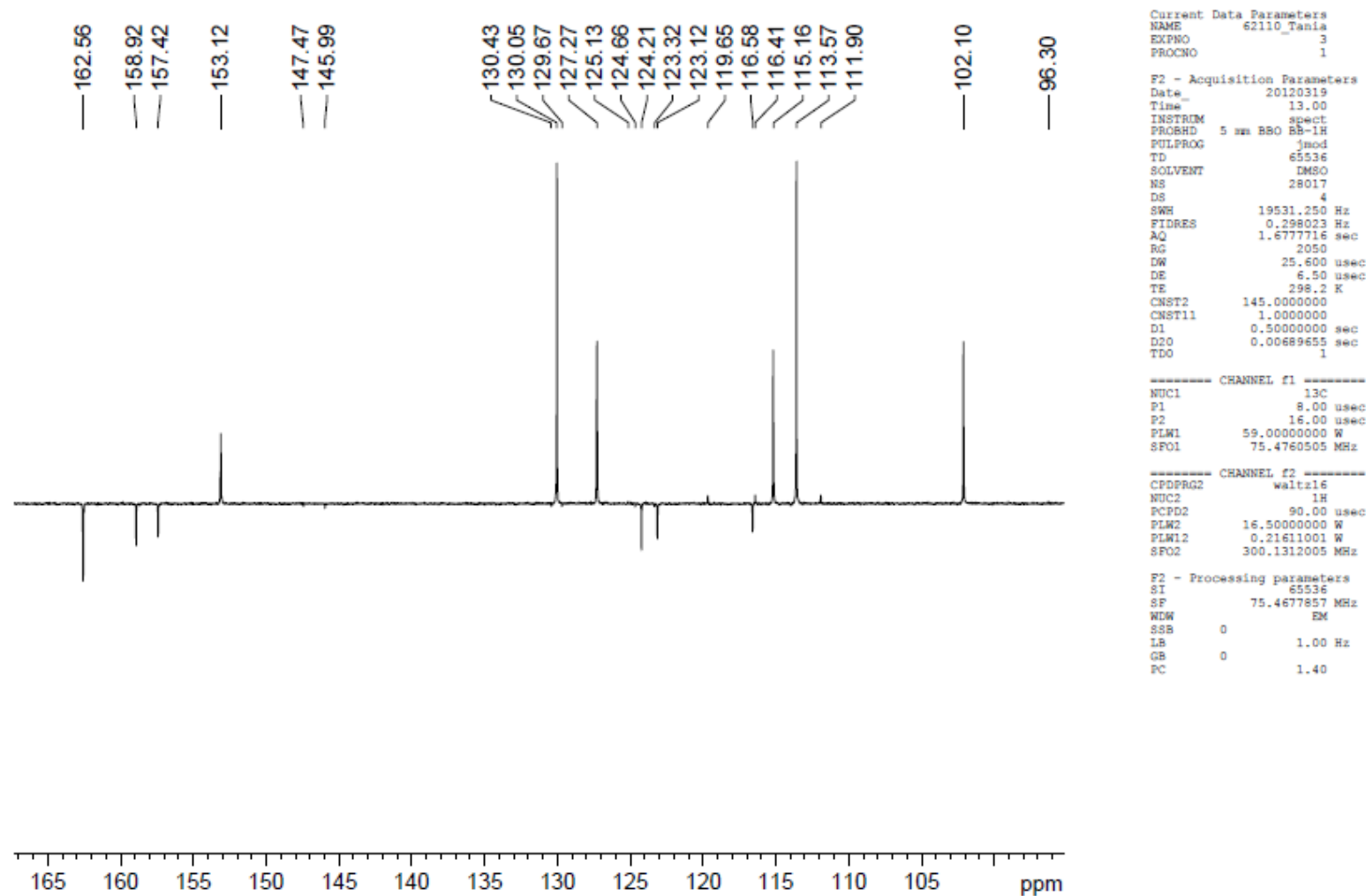


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (DMSO - D6 - 75 MHz) de formononetina na região de 105 – 165 ppm.

5.6 – Análise físico-química da própolis vermelha *in natura* triturada

5.6.1 - *Screening* fitoquímico preliminar

O conhecimento prévio dos componentes químicos encontrados nos produtos naturais é necessário, pois fornece a relação dos seus principais metabólitos. Uma vez detectada a presença de determinados grupos químicos, direciona-se para futuras análises (DOURADO, 2006). A prospecção fitoquímica preliminar buscou sistematizar ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem a própolis vermelha *in natura* triturada, através de um exame qualitativo rápido, no qual utilizou-se reagentes de coloração ou precipitação. A triagem foi realizada seguindo metodologias específicas para cada classe de substância e seus resultados encontram-se na tabela 6 (Página 94). A avaliação qualitativa realizada confirmou a presença de dois grupos de constituintes presentes nas amostras: flavonoides e esteroides, não evidenciando a presença de alcaloides, saponinas e taninos. Esse resultado foi encontrado nas duas amostras de própolis vermelha coletadas em maio de 2012.

Tabela 6 - Triagem fitoquímica realizada com duas amostras de própolis vermelha coletadas em maio de 2012.

Grupo químicos		Amostra 1	Amostra 2
Esteroides	0,12	+	+
	0,25	+	+
	0,50	++	+
Flavonoides	Fita-magnésio	++	+
	Fluorescência	+++	+++
Alcaloides	Ácido Sílico	-	-
	Bouchardat	-	-
	Dragendorff	-	-
	Mayer	-	-
Saponinas	Espuma	-	-
Taninos	0,5	-	-
	Gelatina 0,5%	-	-
	2,0	-	-
FeCl ₃ 2%	0,5	-	-
	1,0	-	-
	2,0	-	-

O símbolo (-) significa ausência e (+) significa presença da classe de substância e a quantidade de símbolos significa o quanto há da mesma.

5.7 – Análise físico-química do extrato etanólico bruto

5.7.1 – Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE – EM)

Analisando o extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2 de própolis vermelha por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE– EM), foi possível identificar 25 compostos (Tabela 7). A estrutura química das substâncias tentativamente identificadas encontram-se na Figura 32. Destes, 21 compostos foram identificados na amostra 1 (Figura 23) e 15 compostos foram identificados na amostra 2 (Figura 24). Dentre os 25 compostos identificados, apenas 11 foram encontrados em ambas as amostras, são eles: biochanina-A 7-O-gentobiosídeo, quercetina, pinobanksina, liquiritigenina, formononetina, glicinol, 6,8-diprenilgenisteína, gutiferona E, cicloxantochimol, gutiferona J, gutiferona N.

López et al. (2014) estudaram 14 amostras de própolis vermelha, sendo 2 de Alagoas, 1 de Cuba, 2 da Paraíba, 5 de Roraima, 4 de Sergipe e 1 amostra da resina de *Dalbergia ecastaphyllum*. Os autores, através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, identificaram: daidzeína (m/z 253,05) em amostras de própolis vermelha de Alagoas, Cuba, Paraíba e Sergipe; pinocembrina (m/z 255,06) em amostras de própolis vermelha de Sergipe e em *Dalbergia ecastaphyllum*; formononetina (m/z 267,06) e biochanina A (m/z 283,06) em amostras de própolis vermelha de Alagoas, Cuba, Paraíba, Sergipe e em *Dalbergia ecastaphyllum*; gutiferona E e xantochimol (m/z 601,35) em amostras de própolis vermelha de Alagoas e Paraíba. Dentre os seis compostos que os autores identificaram, cinco também foram identificados no presente estudo através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, com exceção apenas da daidzeína que não foi identificada no nosso trabalho através dessa técnica, mas, foi identificada e quantificada através da cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 10).

Segundo López et al. (2014) estas amostras foram claramente classificadas em três grupos por análise de componente principal (PCA). A análise e os íons marcadores característicos para cada um dos três grupos foram identificados. As amostras de Roraima, apresentaram um íon marcador muito abundante (m/z 501,30), estando ausente em todas as outras amostras de própolis vermelha das outras regiões e que parece caracterizar estas amostras como um novo tipo de própolis brasileira. As outras amostras de própolis vermelha (exceto a de Cuba que apresentaram somente as isoflavonas de *D. ecastaphyllum*) foram divididas em dois grupos de acordo com a predominância de íons marcadores específicos. No

grupo A, foram incluídas as amostras de própolis vermelha de Alagoas e Paraíba, que apresentaram o íon marcador de m/z 601,35 (gutiferona E e xantochimol provavelmente de uma espécie de Guttiferae). No grupo B, permaneceram as amostras de própolis vermelha de Sergipe, com os íons marcadores que foram os mesmos para a resina de *D. ecastaphyllum* (pinocembrina - m/z 255,06; formononetina - m/z 267,06 e biochanina A - m/z 283,06).

No entanto, o íon de m/z 601,35 (íon marcador do grupo A), também estava presente em baixa abundância nas impressões digitais de amostras do grupo B, mas estava ausente nas impressões digitais de *D. ecastaphyllum*, amostras de Roraima e a amostra cubana. As isoflavonas, tais como formononetina e biochanina A, que são marcadores do grupo B, também estavam presentes em abundâncias inferiores nas impressões digitais de todas as outras amostras e nas impressões digitais de *D. ecastaphyllum*. Estes resultados indicam que, pelo menos, duas espécies de plantas são as principais fontes de resinas para a própolis vermelha brasileira e a contribuição relativa de cada espécie para a composição desse tipo de própolis varia regionalmente e possivelmente sazonalmente. Resultando assim, em dois tipos diferentes de própolis vermelha brasileira, um tipo definido pelo seu teor de isoflavonas e o outro tipo definido pelo seu teor de benzofenonas.

Nas amostras de própolis vermelha de Igarassu – PE, estudadas no presente trabalho, observa-se que na amostra 1 (Figura 23) há uma grande quantidade de gutiferona E (pico 20) e cicloxantochimol (pico 21), uma relativa quantidade de formononetina (pico 7) e glicinol (pico 8) e pouca quantidade de pinocembrina (pico 10) e biochanina A (pico 11). Enquanto, na amostra 2 (Figura 24), há uma grande quantidade de 18-OH-hiperibona K (pico 18), gutiferona J (pico 22), gutiferona N (pico 23) e adlupona (pico 24), pouca quantidade de gutiferona E (pico 20), cicloxantochimol (pico 21), formononetina (pico 7) e glicinol (pico 8) e não há pinocembrina (pico 10) e biochanina A (pico 11). Portanto, ambas amostras podem ser classificadas como um tipo de própolis vermelha brasileira definida pelo seu teor de benzofenonas, encaixando-se no grupo A, segundo sugerido por López et al. (2014).

Piccinelli et al. (2005) e Alencar et al. (2007) afirmaram que tanto a própolis vermelha produzida no Brasil como a própolis vermelha cubana, produzida na província de Pinar Del Rio, não contem benzofenonas. Essa afirmação não corrobora com os resultados encontrados por López et al. (2014) que encontraram nas amostras de própolis vermelha de Alagoas e Paraíba, um alto teor de benzofenonas. Tal afirmação também não corrobora com os resultados encontrados no nosso estudo, onde foi identificado um alto teor de benzofenonas, tanto na amostra 1 quanto na amostra 2 de própolis vermelha de Igarassu-PE.

Tabela 7 – Dados de espectrometria de massas de alta resolução das substâncias identificadas nas amostras 1 e 2 de própolis (para o número do pico, referir-se aos cromatogramas das figuras 24 e 25).

Pico	tr ^a	Nome	Fórmula	[M-H] ^{-T}	[M-H] ^{-E}	Identificação
1	4.4	Biochanina-A 7-O-gentobiosídeo	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.1663		Mzmine/Pubchem
2	9.67	*Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0348		Daugusch et al. (2007)
3	10.18	*Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0399		Daugusch et al. (2007)
4	11.76	3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	285.0763	285.0756	Daugusch et al. (2007)
5	11.87	Pinobanksina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0606		Daugusch et al. (2007)
6	13.20	Liquiritigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0657	255.0651	Daugusch et al. (2007)
7	13.74	*Formononetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0657	267.0652	Daugusch et al. (2007) López et al. (2014)
8	14.66	Glicinol	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0606		Mzmine/Pubchem
9	15.8	Dalbergioidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	286.0477		Mzmine/Pubchem
10	16.18	*Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0657	255.0651	Daugusch et al. (2007) López et al. (2014)
11	16.42	*Biochanina-A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0606	283.0601	Daugusch et al. (2007) López et al. (2014)
12	16.90	4-OH-homopterocarpano	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	299.0919		Mzmine/Pubchem
13	25.35	Propolona C	C ₃₃ H ₄₁ O ₅	516.2875		Mzmine/Pubchem
14	26.95	Gutiferona Q	C ₃₃ H ₄₂ O ₄	501.3004		Mzmine/Pubchem
15	27.2	6,8-diprenilgenisteína	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	405.1702		Mzmine/Pubchem
16	27.53	Garcinialiptona A	C ₃₈ H ₄₈ O ₆	599.3372		Mzmine/Pubchem
17	27.53	Garcianiliptona B	C ₃₈ H ₄₈ O ₆	599.3372		Mzmine/Pubchem
18	29.7	18-OH-hiperibona K	C ₃₃ H ₄₀ O ₅	515.2797		Mzmine/Pubchem
19	30.10	Papuaforina C	C ₂₇ H ₃₈ O ₄	425.2691		Mzmine/Pubchem
20	32.88	Gutiferona E	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	601.3529	601.3517	López et al. (2014)
21	32.90	Cicloxantochimol	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	601.3529	601.3517	López et al. (2014)
22	34.40	Gutiferona J	C ₃₈ H ₄₉ O ₅	584.3501		Mzmine/Pubchem
23	35.58	Gutiferona N	C ₃₈ H ₅₀ O ₅	585.3580	585.3576	Mzmine/Pubchem
24	36.73	Adlupona	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	497.3267		Mzmine/Pubchem
25	39.24	Gutiferona B	C ₄₃ H ₅₈ O ₆	669.4155	669.4147	Mzmine/Pubchem

^atr=tempo de retenção (min) *Substâncias também identificadas e quantificadas através do uso de padrões analíticos. [M-H]^{-T} = massa exata monoisotópica teórica. [M-H]^{-E} = massa exata experimental obtida.

C:\Users\...PredextactE1_eduardo_new

27/03/2013 07:12:45

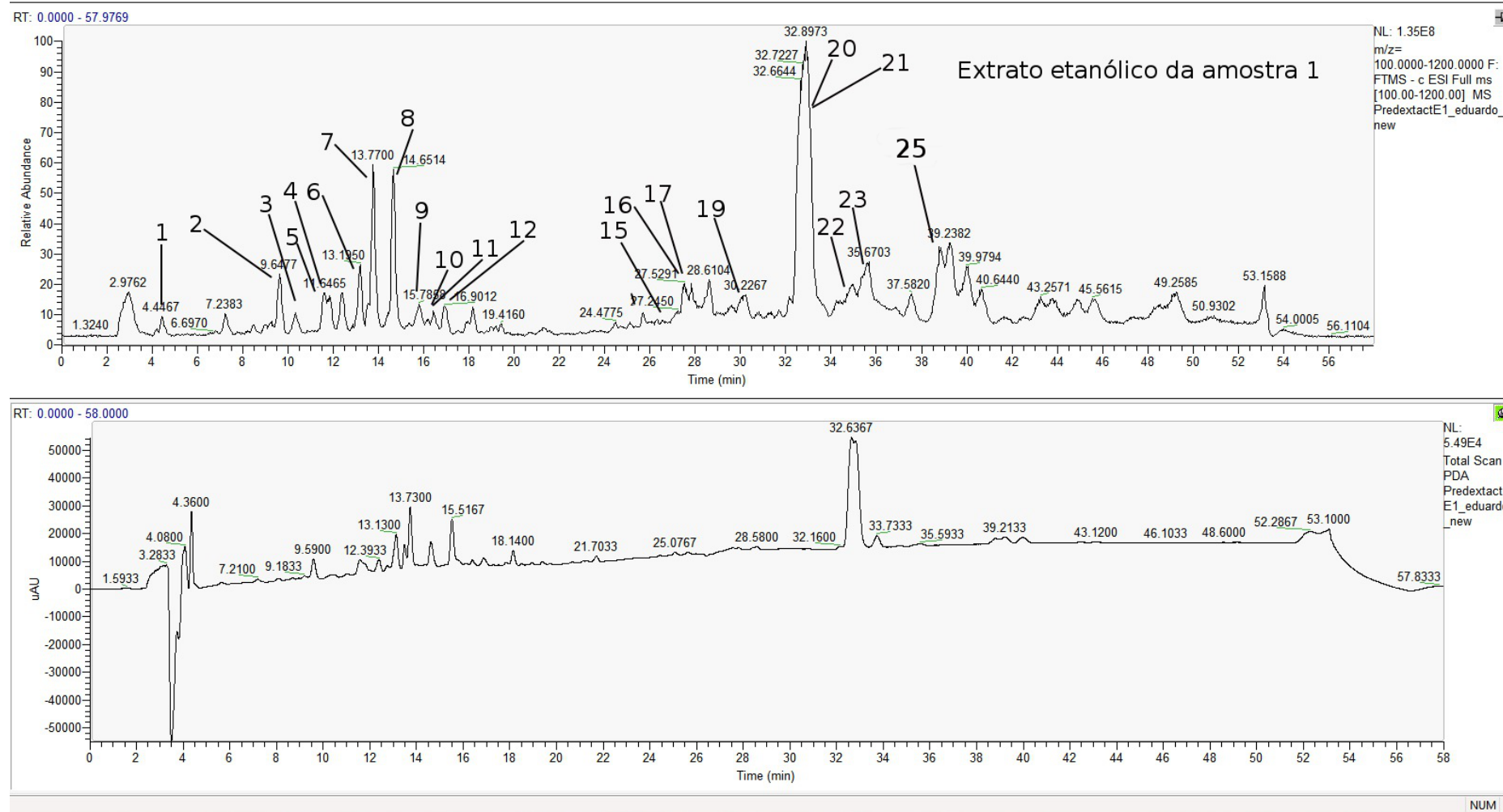


Figura 23 – Cromatograma de íons totais (m/z 100-1200, traço superior) e de ultravioleta (traço inferior) do extrato etanólico bruto da amostra 1 de própolis vermelha.

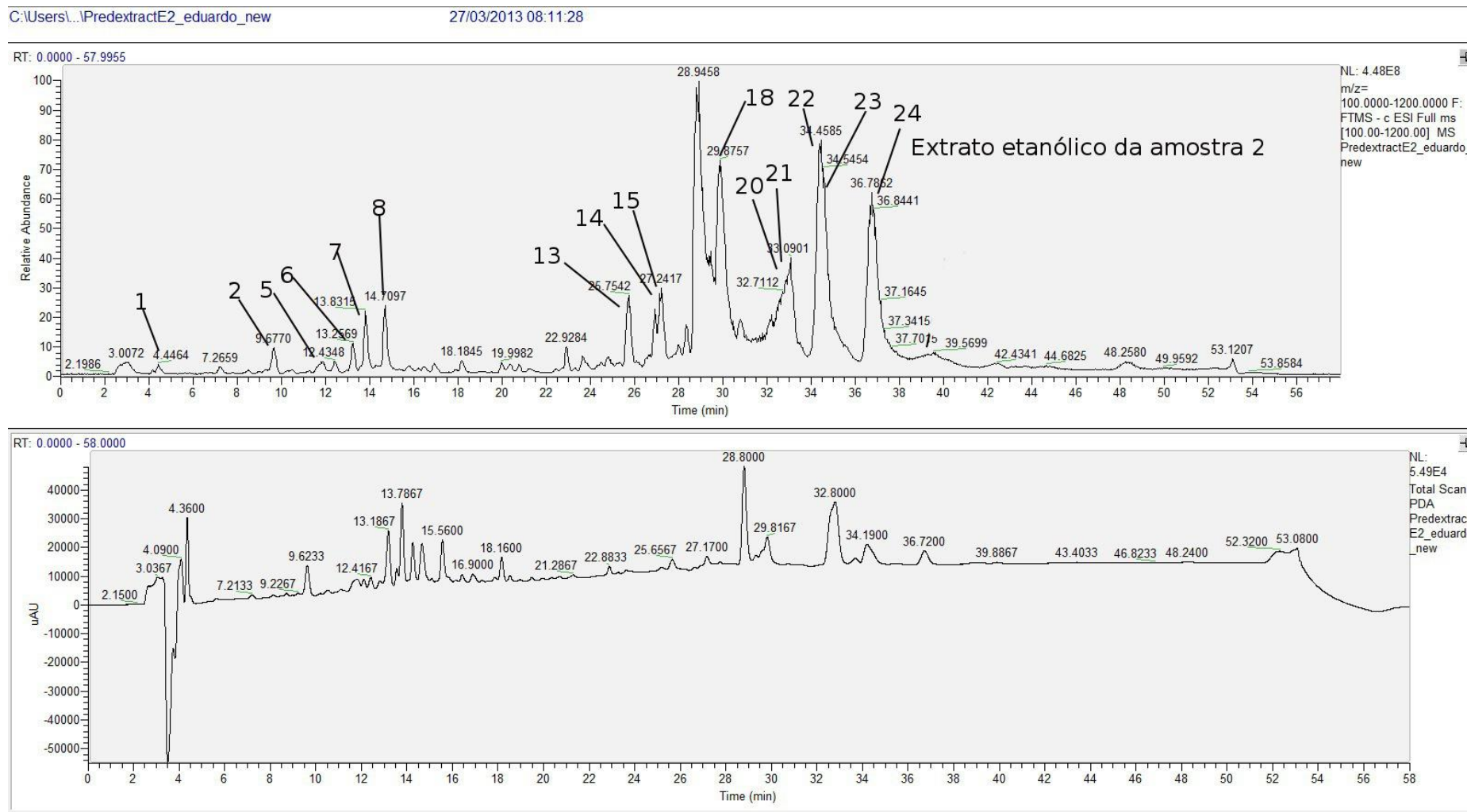


Figura 24 – Cromatograma de íons totais (m/z 100-1200, traço superior) e de ultravioleta (traço inferior) do extrato etanólico bruto da amostra 1 de própolis vermelha.

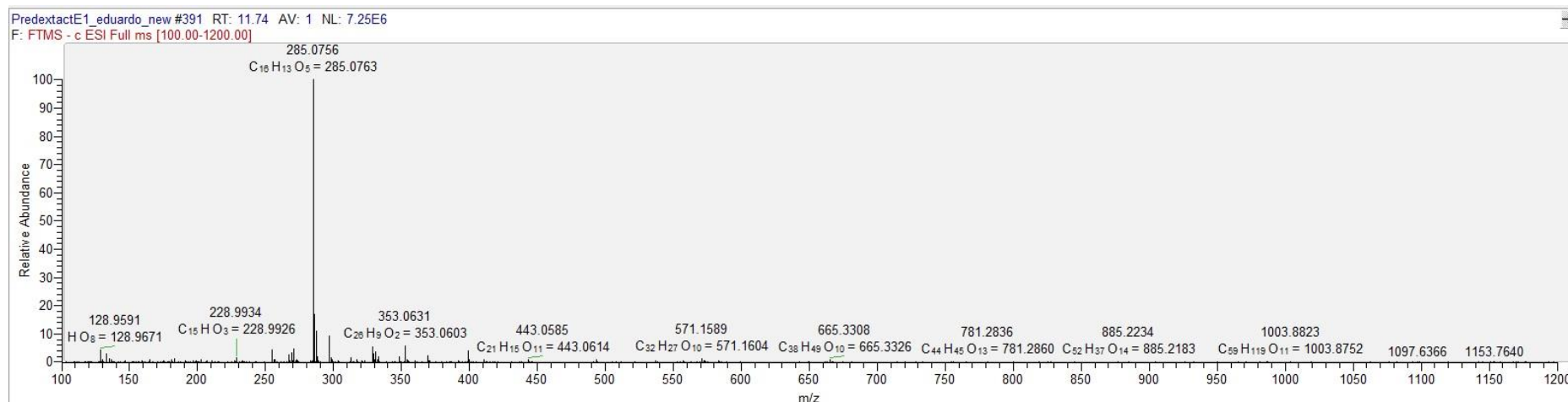


Figura 25 – Espectro do pico 4 (3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano), $[M-H]^{-T} = 285.0763$ e $[M-H]^{-E} = 285.0756$.

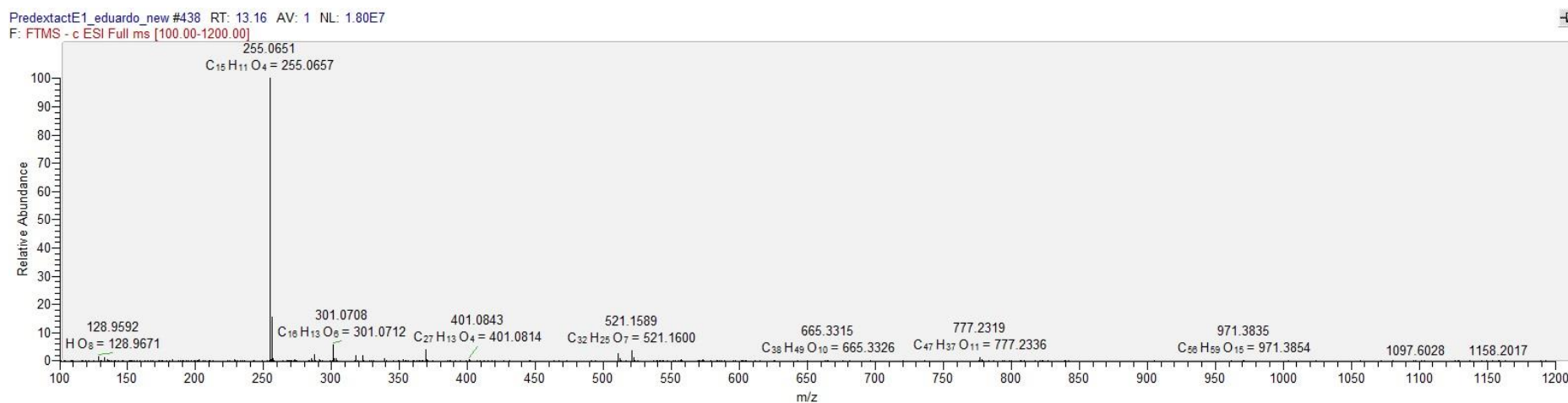


Figura 26 – Espectro do pico 6 (Liquiritigenina) e 10 (Pinocembrina), $[M-H]^{-T} = 255.0657$ e $[M-H]^{-E} = 255.0651$.

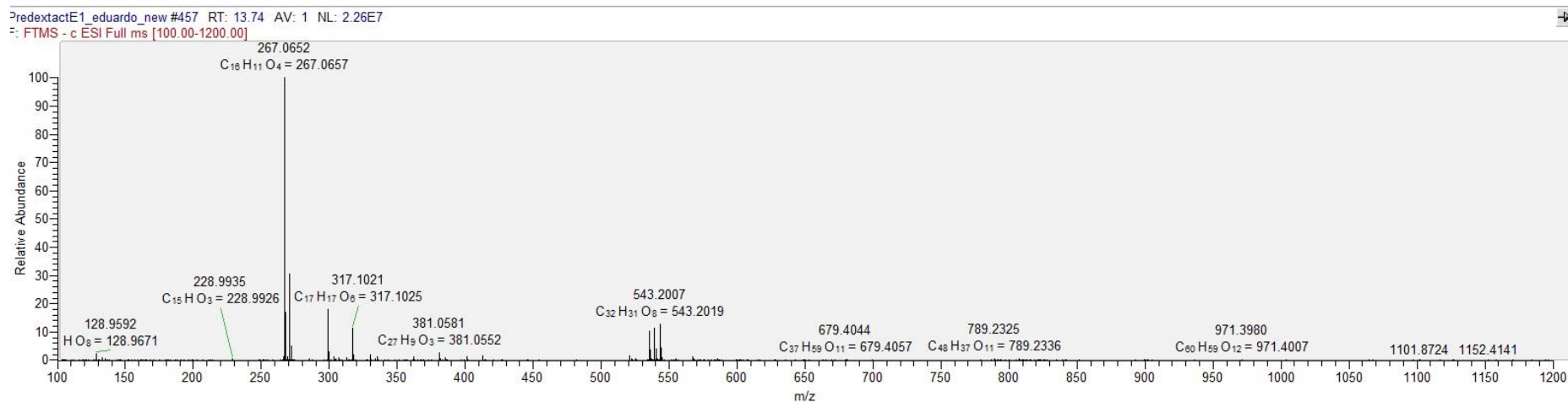


Figura 27 – Espectro do pico 7 (Formononetina), $[M-H]^{-T} = 267.0657$ e $[M-H]^{-E} = 267.0652$.

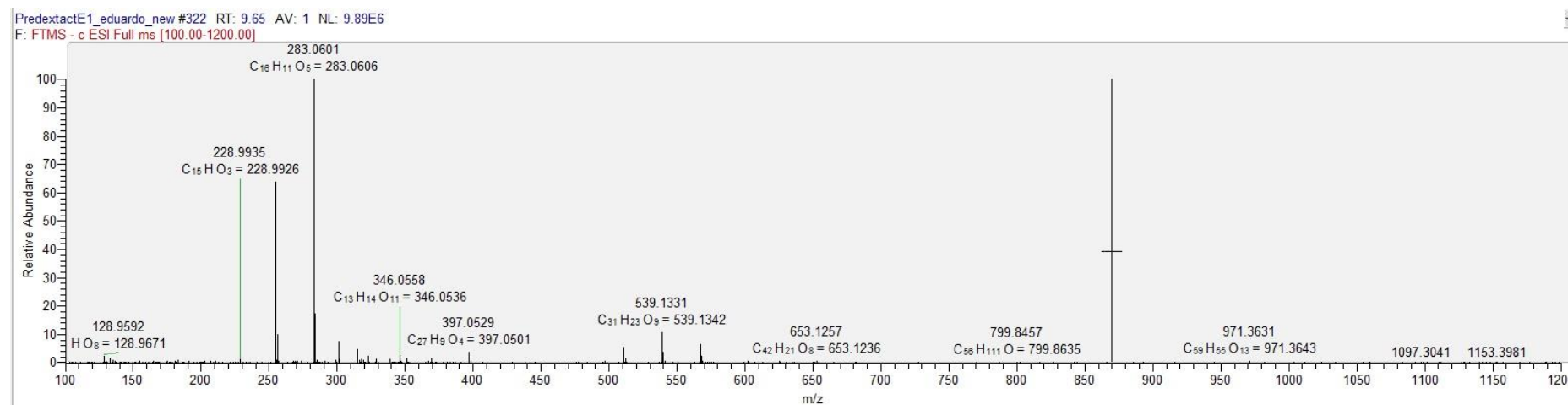


Figura 28 – Espectro do pico 11 (Biochanina A), $[M-H]^{-T} = 283.0606$ e $[M-H]^{-E} = 283.0601$.

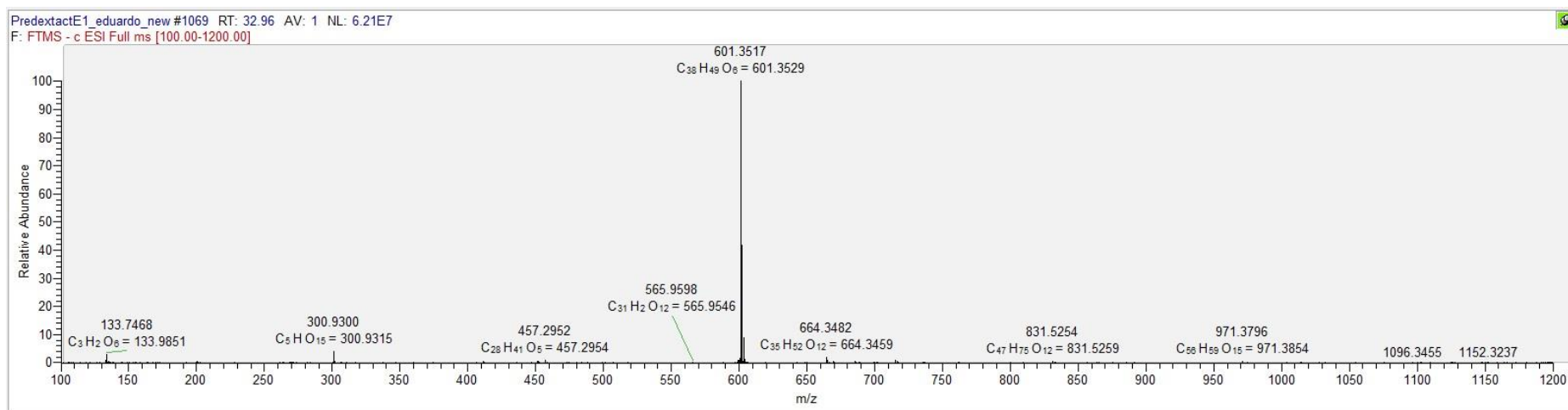


Figura 29 – Espectro do pico 20 (Gutiferona E) e pico 21 (Cicloxantochimol), $[M-H]^{-T} = 601.3529$ e $[M-H]^{-E} = 601.3517$.

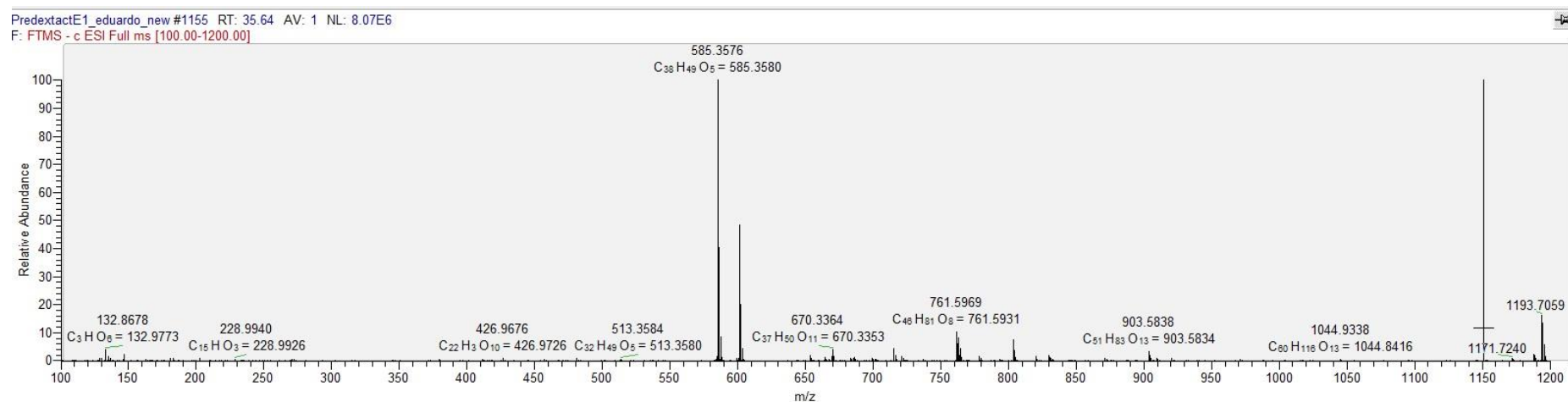


Figura 30 – Espectro do pico 23 (Gutiferona N), $[M-H]^{-T} = 585.3580$ e $[M-H]^{-E} = 585.3576$.

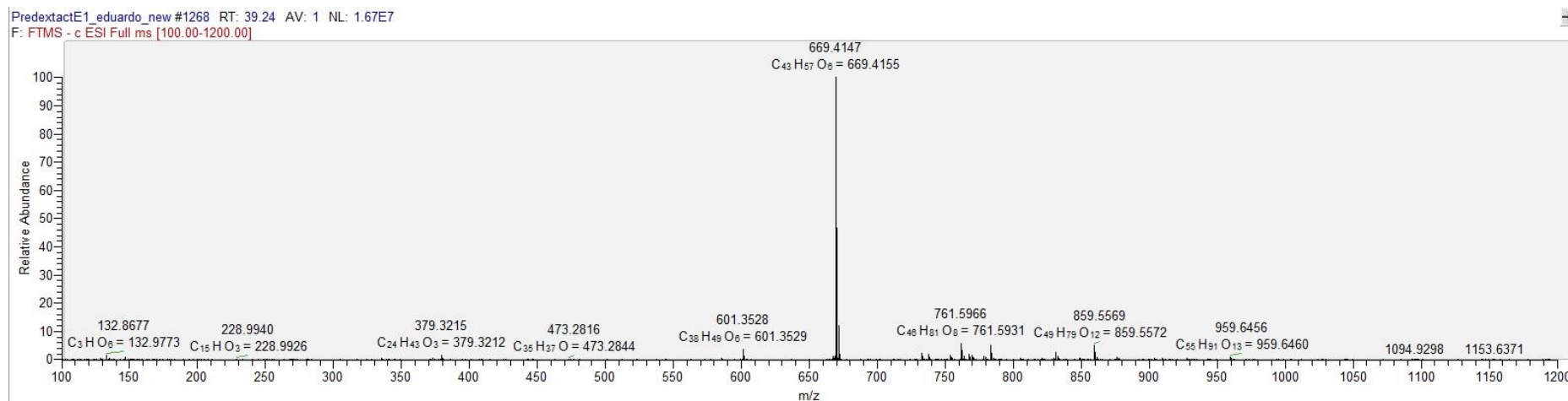


Figura 31 – Espectro do pico 25 (Gutiferona B), $[M-H]^{-T} = 669.4155$ e $[M-H]^{-E} = 669.4147$.

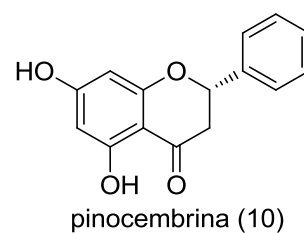
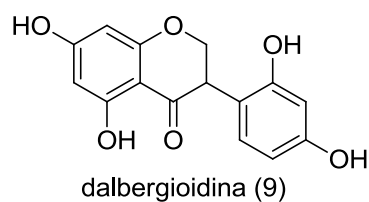
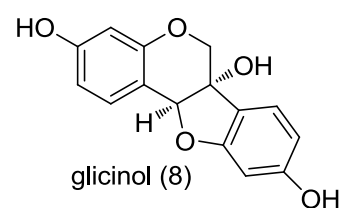
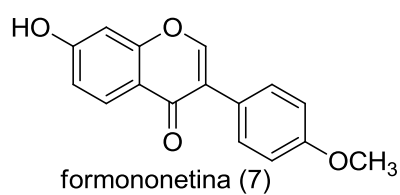
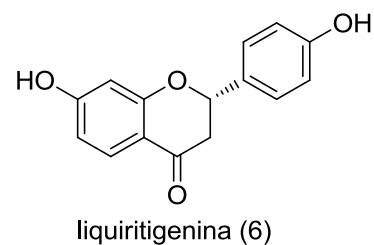
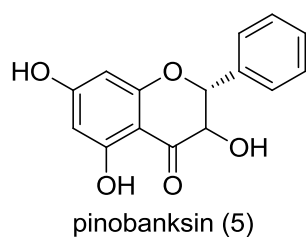
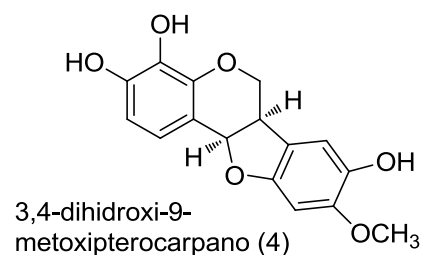
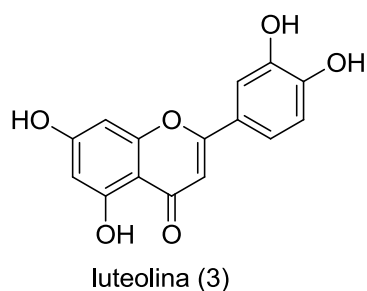
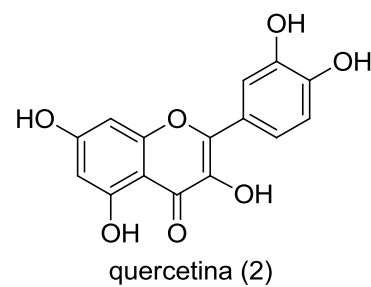
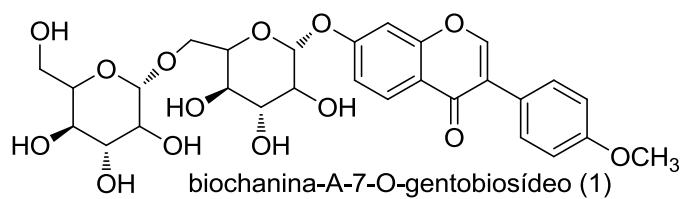
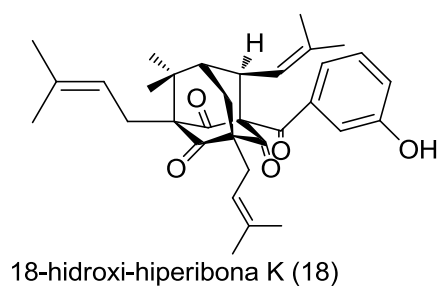
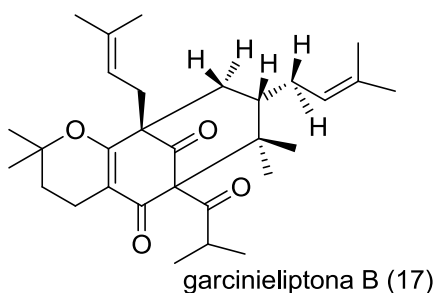
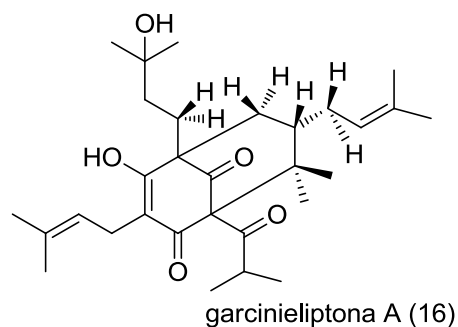
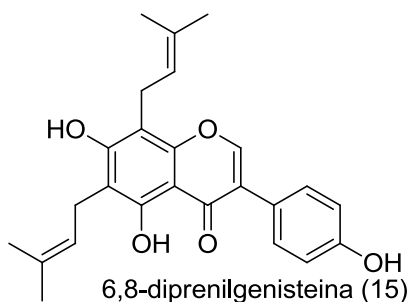
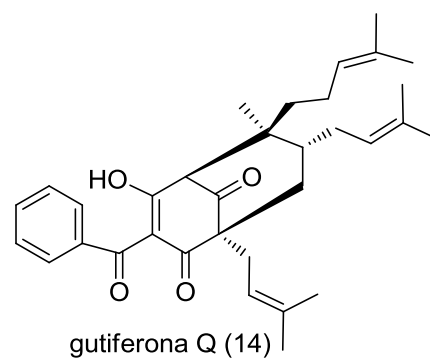
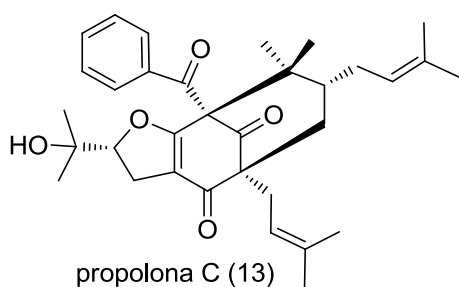
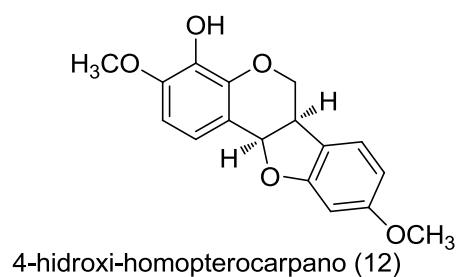
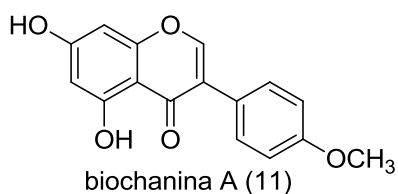
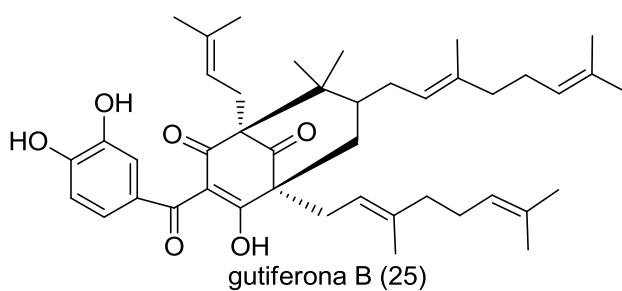
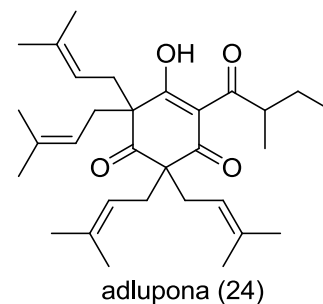
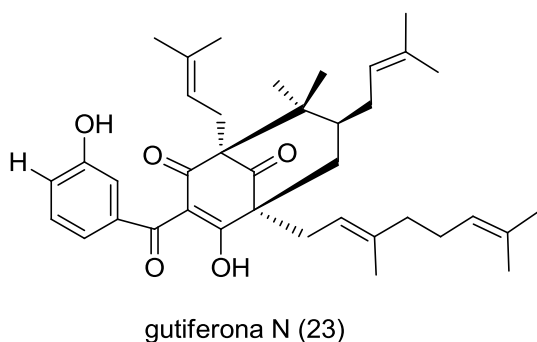
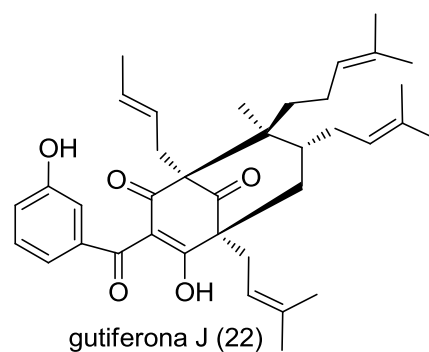
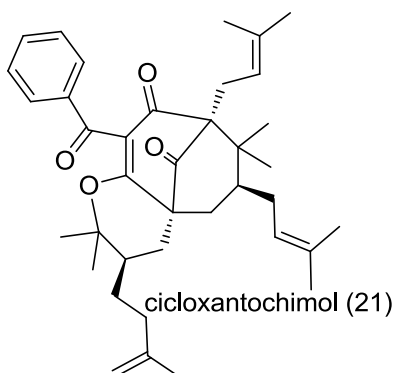
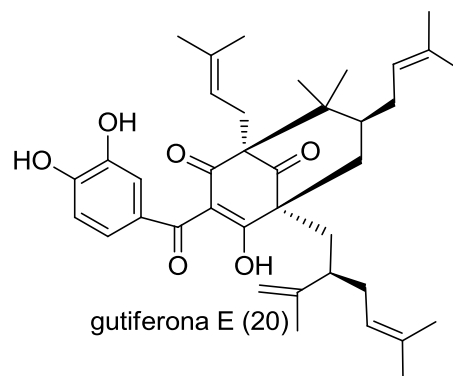
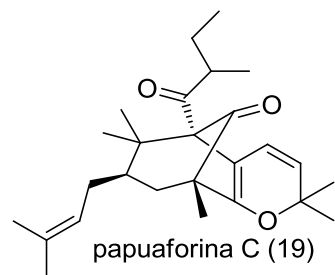


Figura 32 – Estrutura química das substâncias identificadas nas amostras de 1 e 2 de própolis vermelha através de análise por espectrometria de massas de alta resolução usando ionização por electrospray em modo negativo e Orbitrap-FT (LC/MS, ESI, Orbitrap-FT). O número entre parenteses refere-se ao número do pico nos cromatogramas das Figuras 23 e 24.



Continuação da Figura 32 – Estrutura química das substâncias identificadas nas amostras de 1 e 2 de própolis vermelha através de análise por espectrometria de massas de alta resolução usando ionização por electrospray em modo negativo e Orbitrap-FT (LC/MS, ESI⁻, Orbitrap-FT). O número entre parenteses refere-se ao número do pico nos cromatogramas das Figuras 23 e 24.



Continuação da Figura 32 – Estrutura química das substâncias identificadas nas amostras de 1 e 2 de própolis vermelha através de análise por espectrometria de massas de alta resolução usando ionização por electrospray em modo negativo e Orbitrap-FT (LC/MS, ESI, Orbitrap-FT). O número entre parenteses refere-se ao número do pico nos cromatogramas das Figuras 23 e 24.

5.8 - Análise físico-química da própolis *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica

5.8.1 - Análise do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas obtidos através da cromatografia líquida de alta eficiência da própolis *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica demonstraram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção (Figuras 33 – 47). O método de separação desenvolvido por CLAE teve um tempo total de análise de 170 minutos. Este elevado tempo de análise foi necessário para garantir uma resolução global elevada entre os picos e permitir a quantificação dos padrões, que englobam uma ampla faixa de polaridade.

A própolis vermelha *in natura* (Figuras 33 e 38), extrato etanólico bruto (Figuras 34 e 39) e fração acetato de etila (Figuras 36 e 41) da amostra 1 e 2 caracterizam-se por apresentar tanto substâncias polares quanto apolares. Enquanto a fração hexânica (Figuras 35 e 40) e hidroalcoólica (Figuras 37 e 42) da amostra 1 e 2, são ricas em substâncias apolares e polares, respectivamente.

O processo de fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico bruto originou três frações quimicamente diferentes: hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica. A maioria dos compostos do extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2 se concentraram na fração acetato de etila. Já a fração hexânica apresentou apenas dois picos majoritários, cujo tempo de retenção foi de 110 minutos (formononetina) e 160 minutos (o composto não foi identificado e quantificado), respectivamente, enquanto a fração hidroalcoólica apresentou três picos majoritários, cujo tempo de retenção foi entre 5 e 20 minutos, sendo identificado e quantificado o pico que aparece em 8,8 minutos como sendo do ácido ferúlico.

Cabral (2008) através do fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas, obteve uma fração hexânica e uma fração clorofórmica, e identificou no extrato e na fração clorofórmica: um flavonoide (quercetina), duas isoflavonas (daidzeína e formononetina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico), sendo que a maioria dos compostos usados como padrão e comumente encontrados em outros tipos de própolis brasileiras não foi identificada.

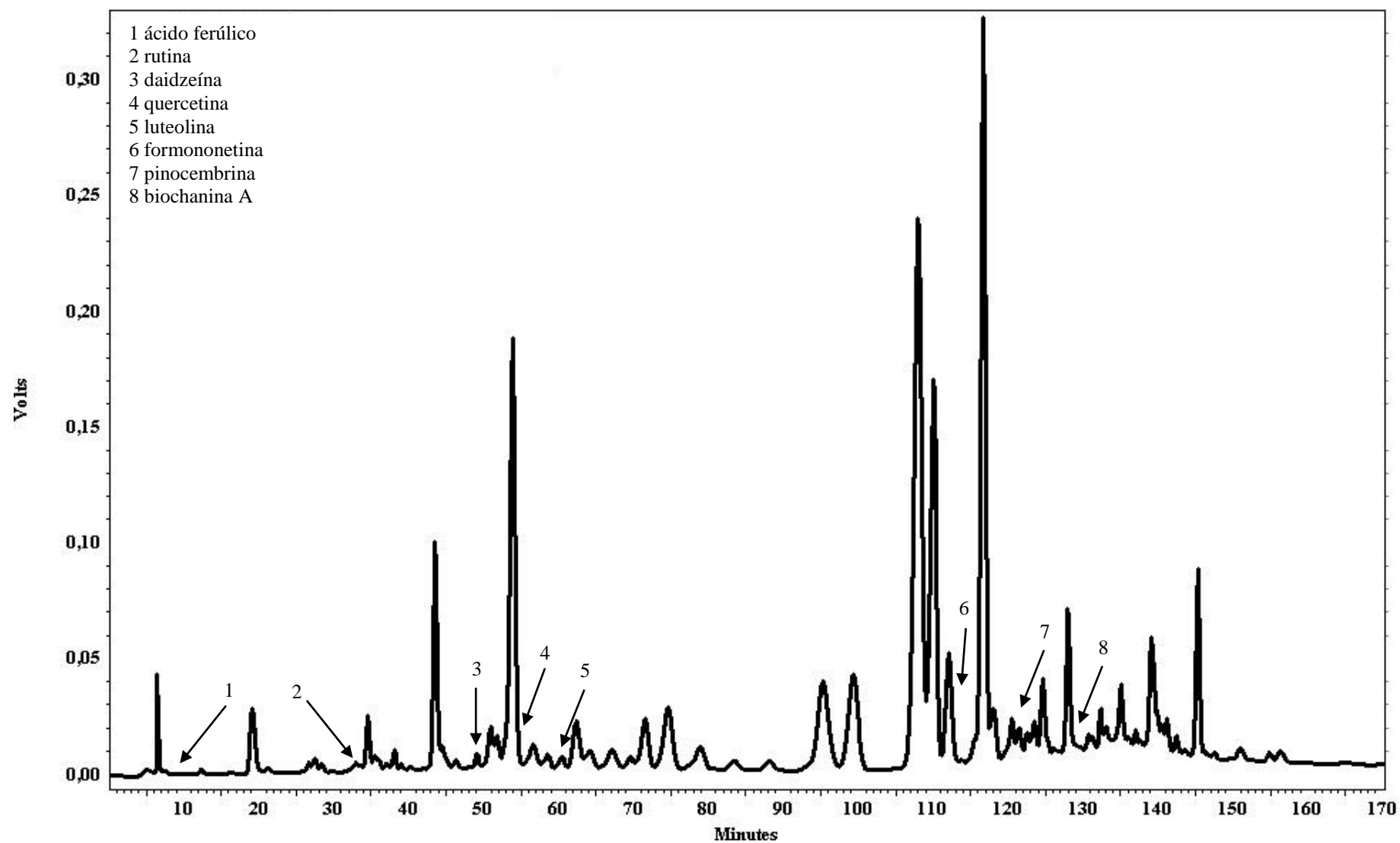


Figura 33 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 obtido por CLAE.

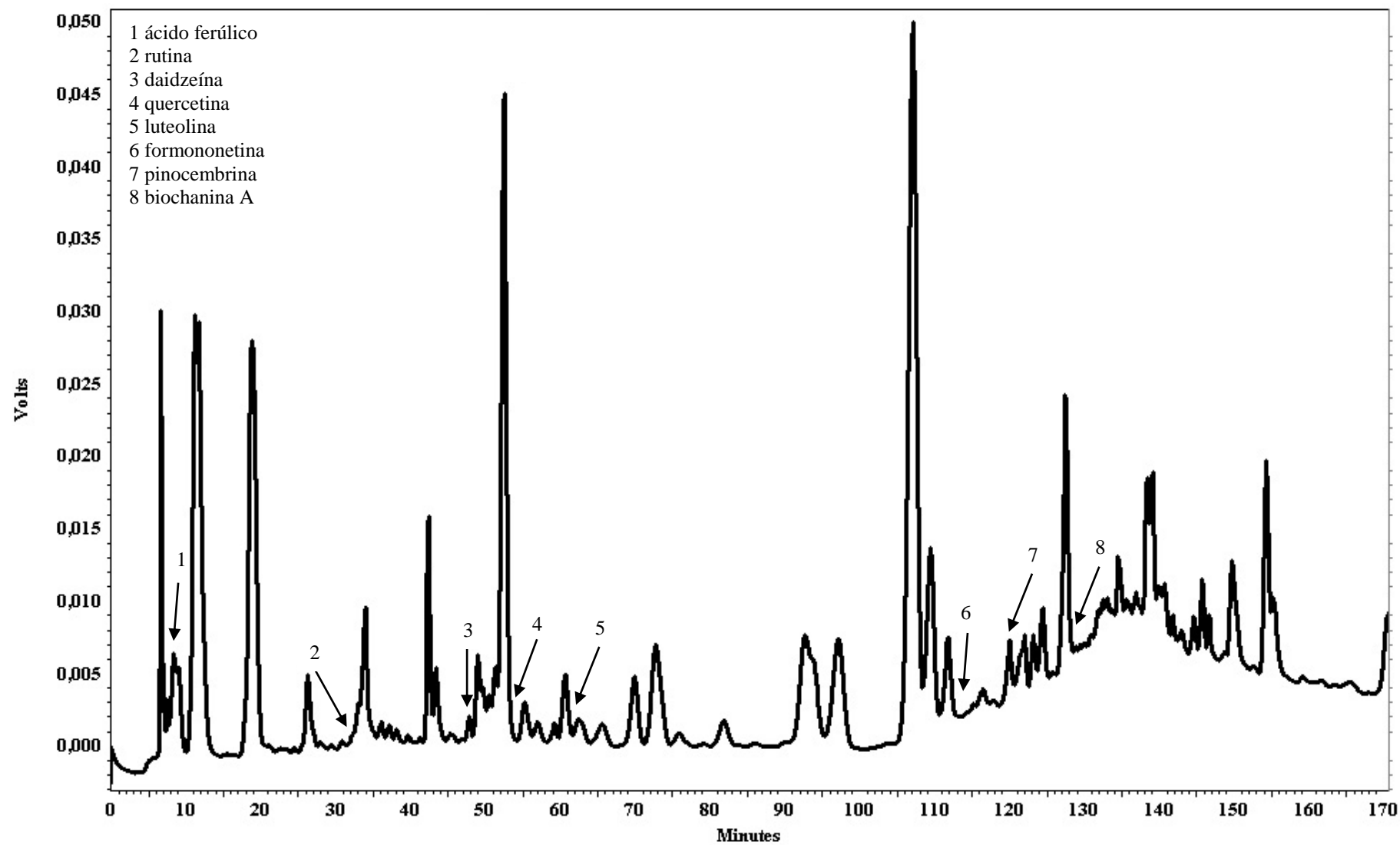


Figura 34 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 1 obtido por CLAE.

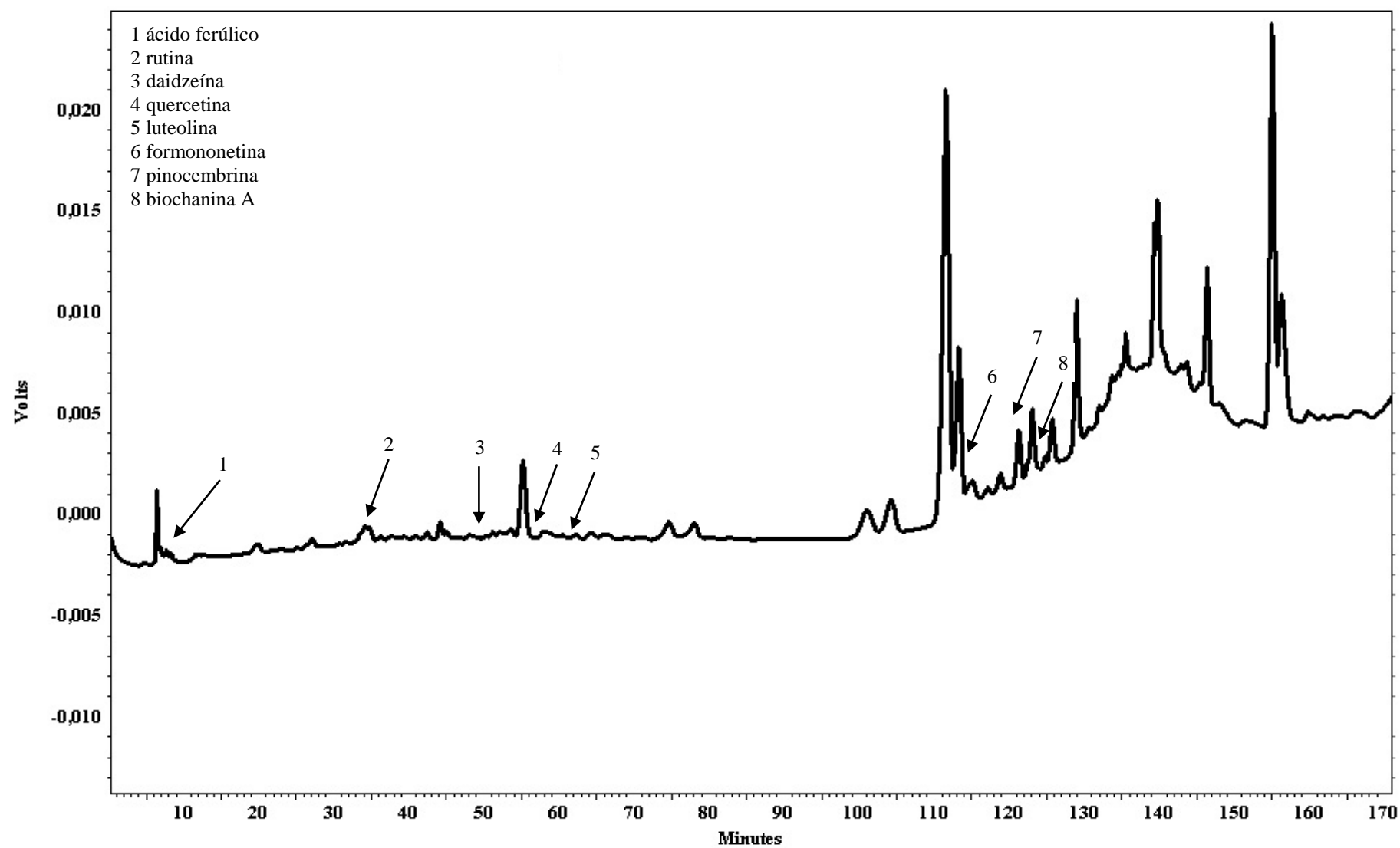


Figura 35 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 1 obtido por CLAE.

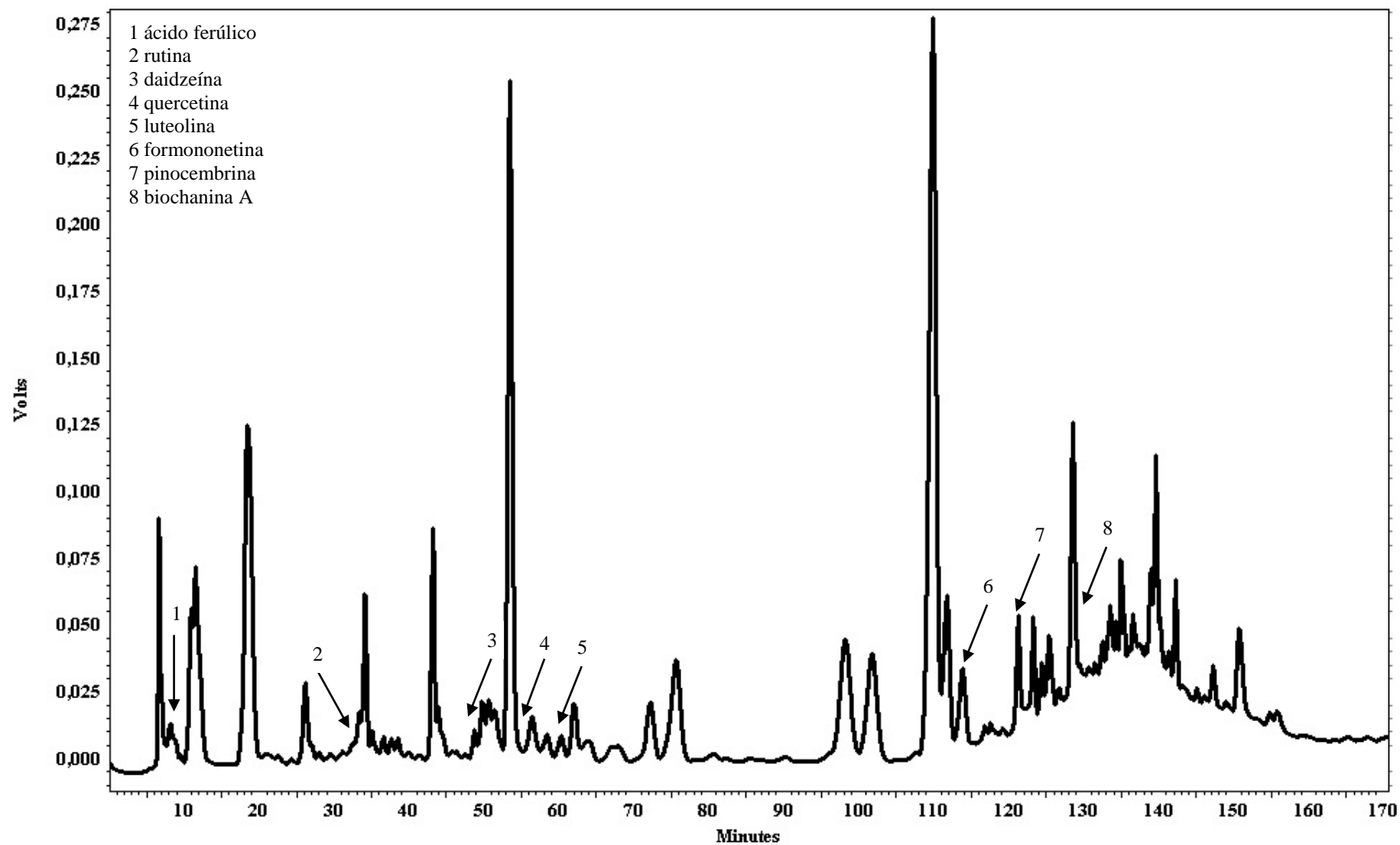


Figura 36 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 1 obtido por CLAE.

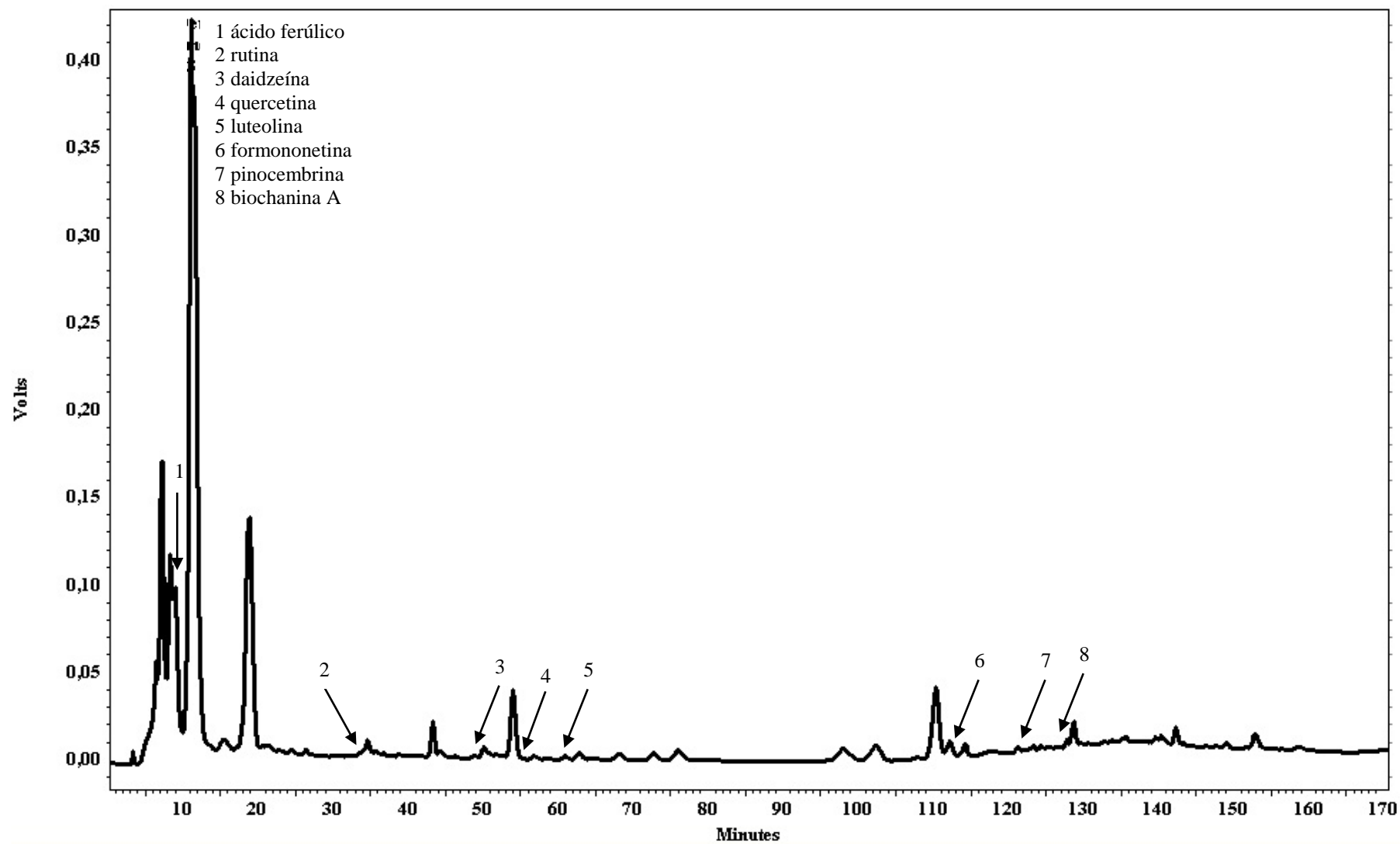


Figura 37 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 1 obtido por CLAE.

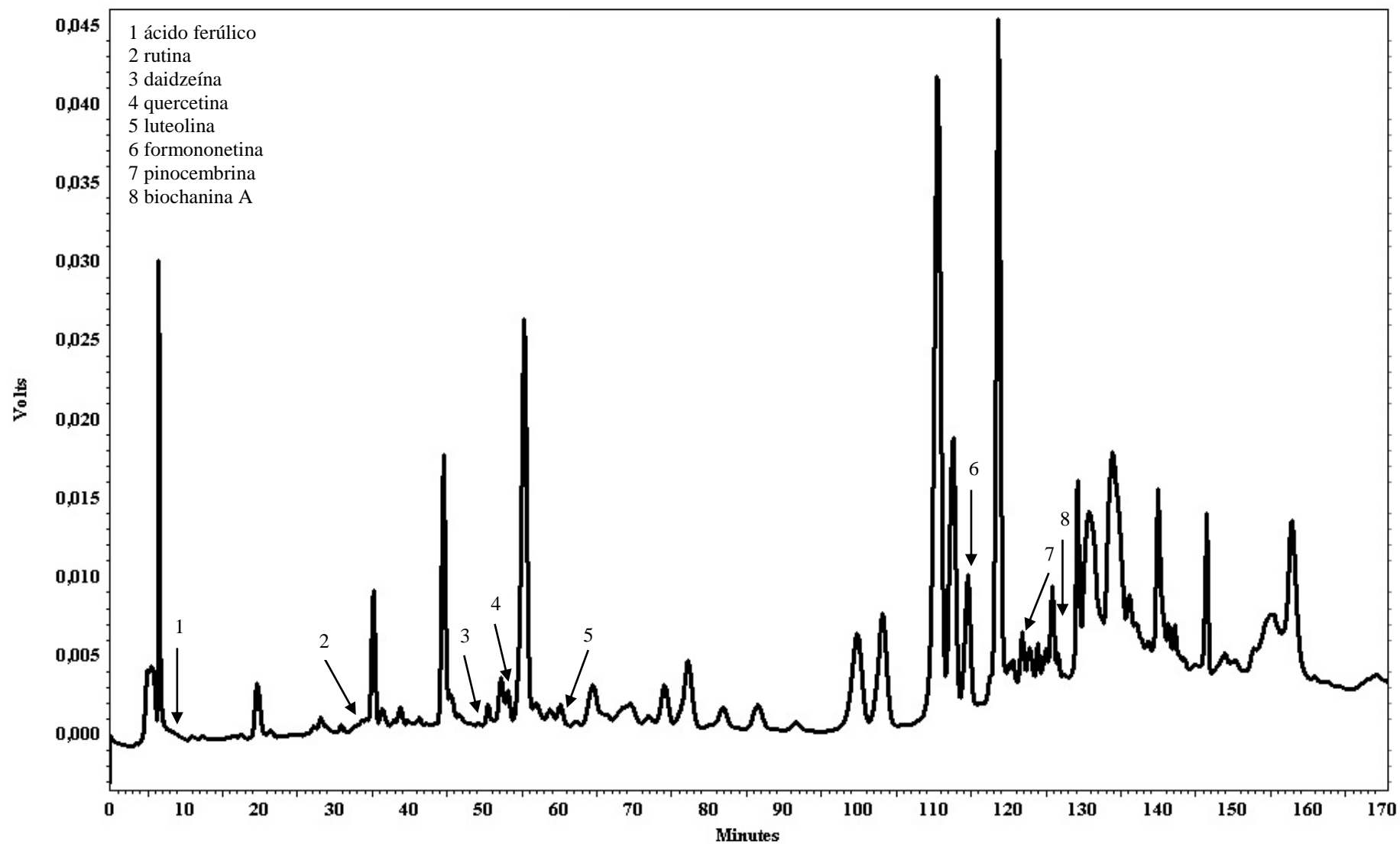


Figura 38 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 obtido por CLAE.

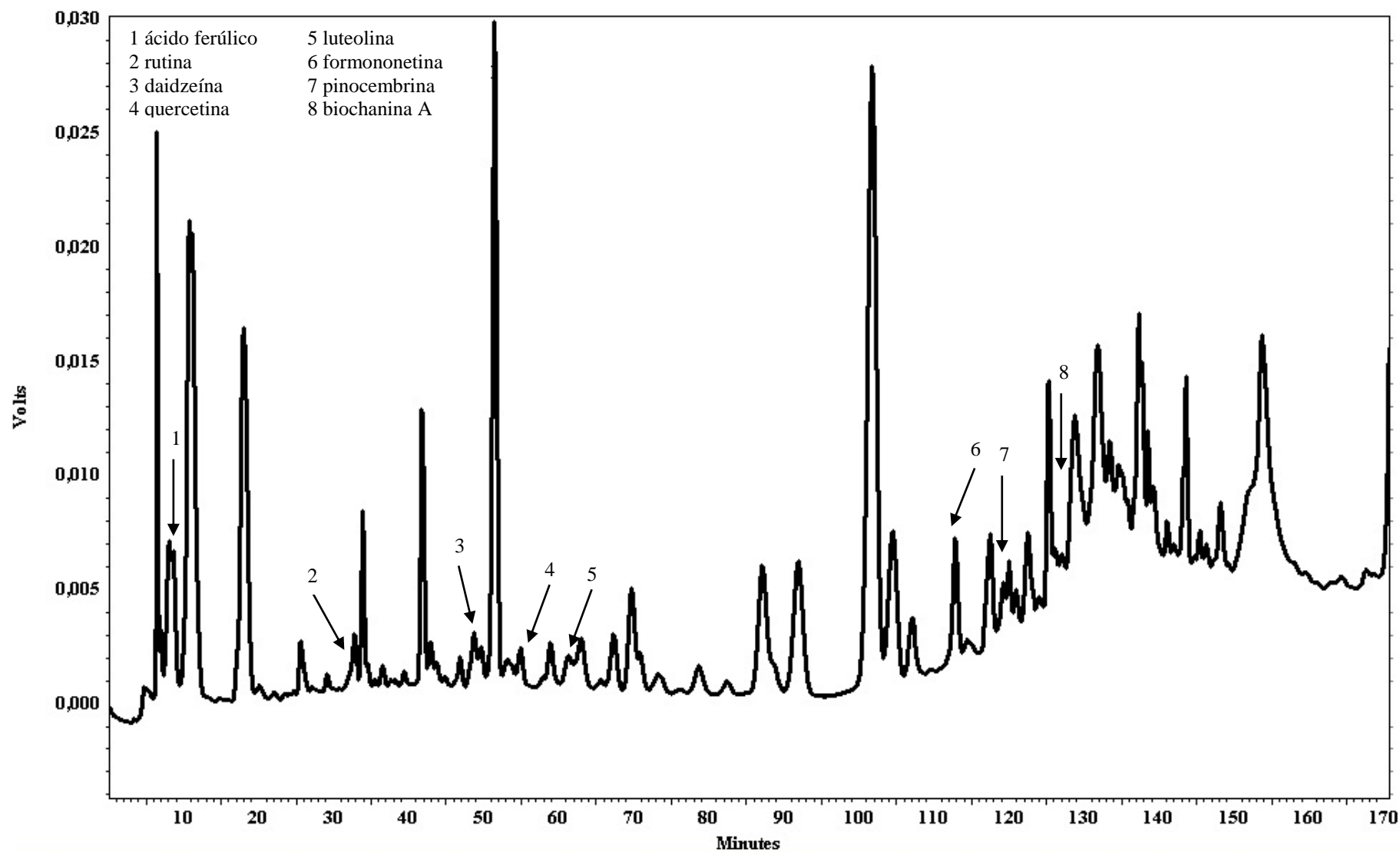


Figura 39 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 2 obtido por CLAE.

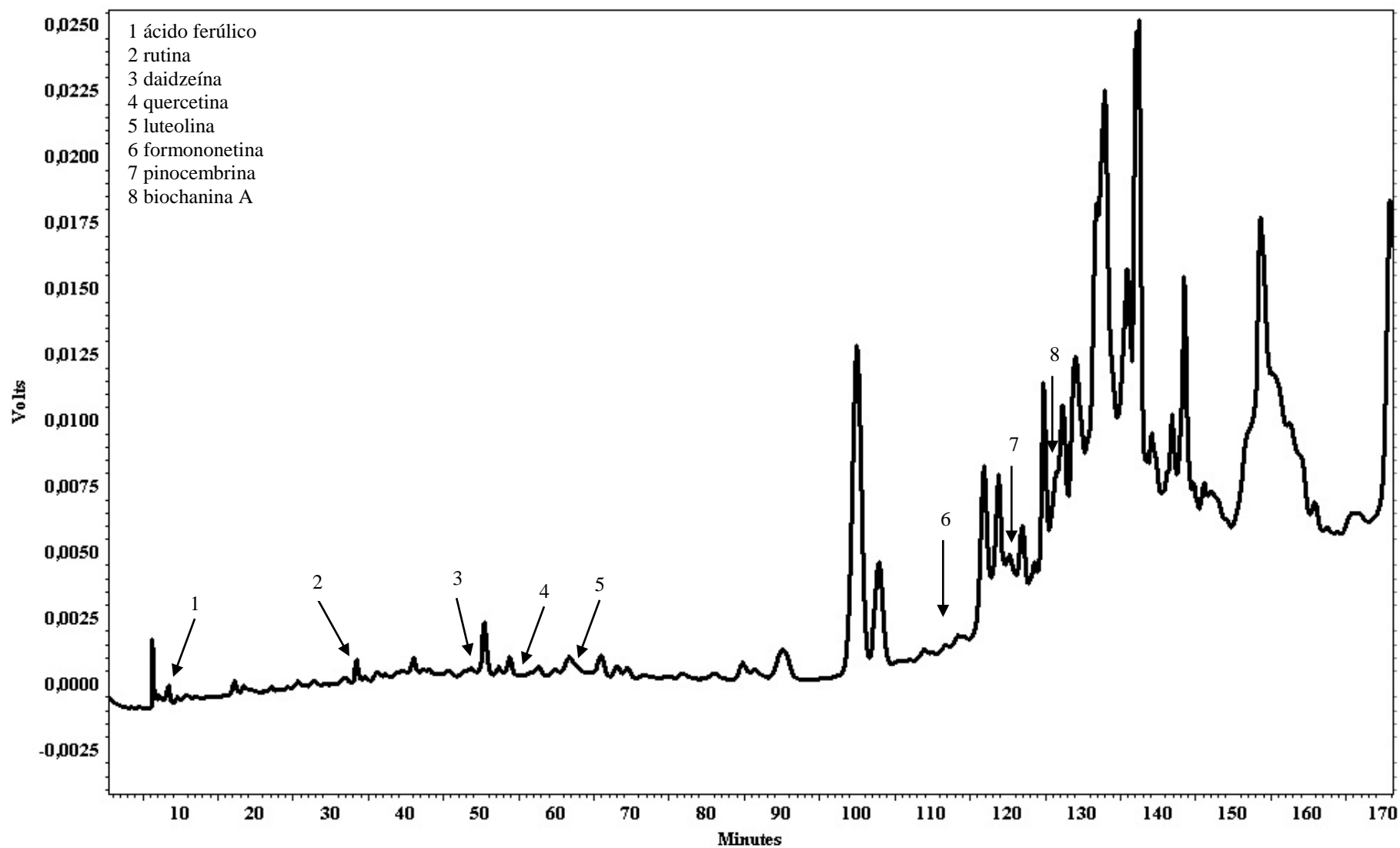


Figura 40 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 2 obtido por CLAE.

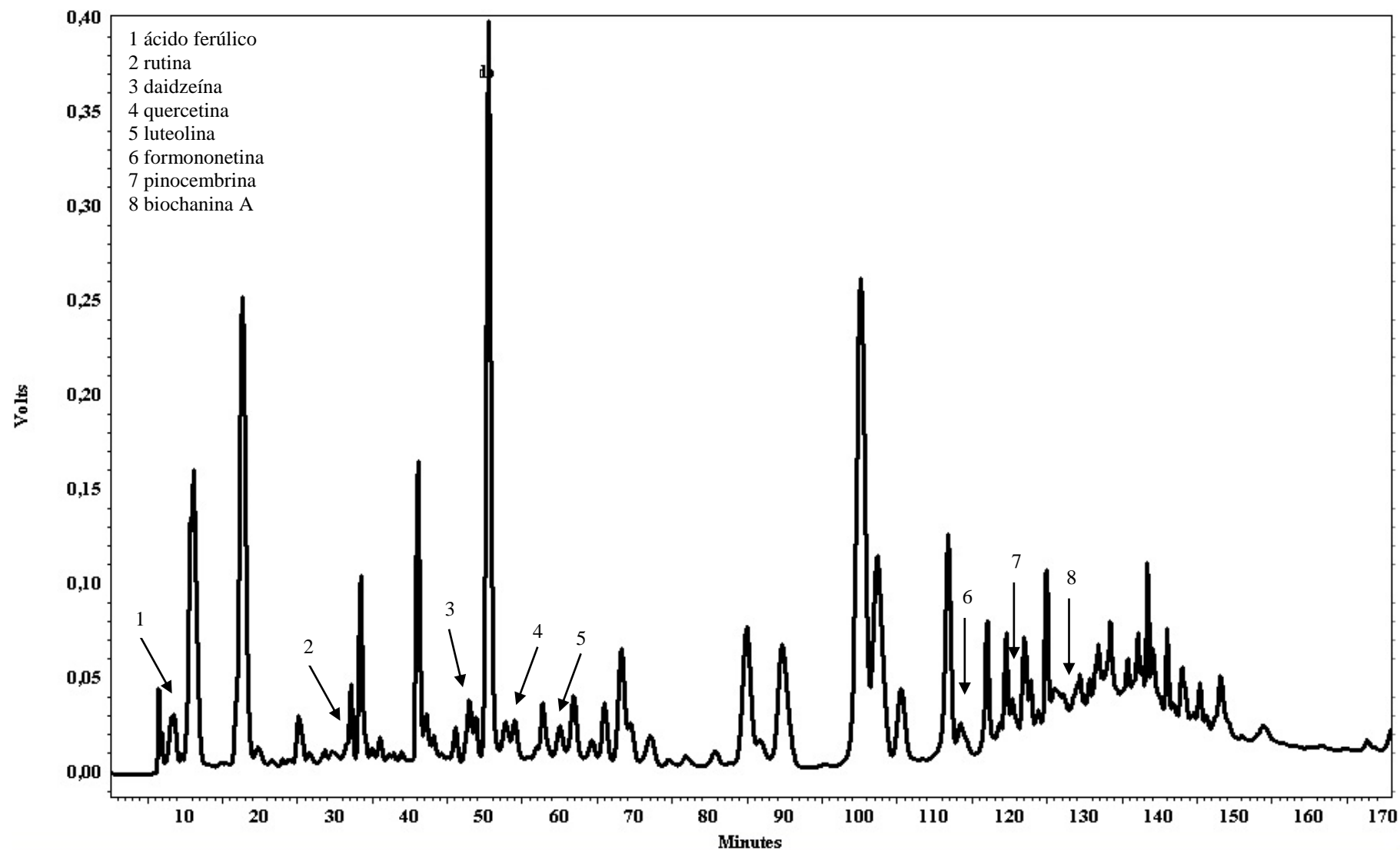


Figura 41 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 2 obtido por CLAE.

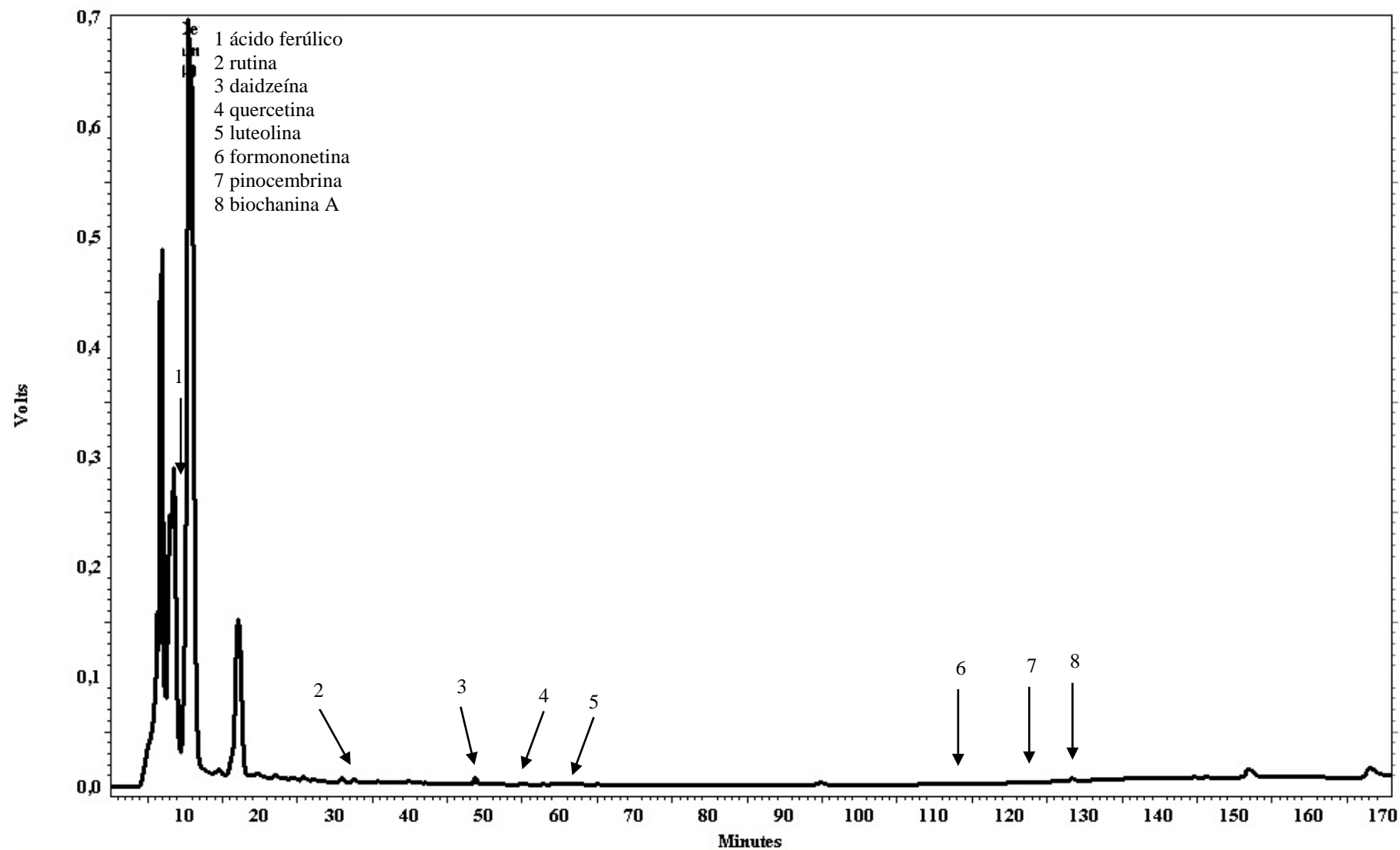


Figura 42 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 2 obtido por CLAE.

De acordo com a literatura a composição química da própolis pode variar de acordo com diversos fatores, são eles: flora da região, locais e épocas de coleta, técnica empregada para a produção (tipo de coletores) e características genéticas (gênero e espécie de abelhas) (PARK et al., 1998; PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002; DUTRA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008; SIMÕES et al., 2008). Porém como mostra os cromatogramas apresentados nas figuras 43 – 47 pode-se observar que, apesar das amostras 1 e 2 terem sido coletadas em apiários diferentes, ambas são muito semelhantes.

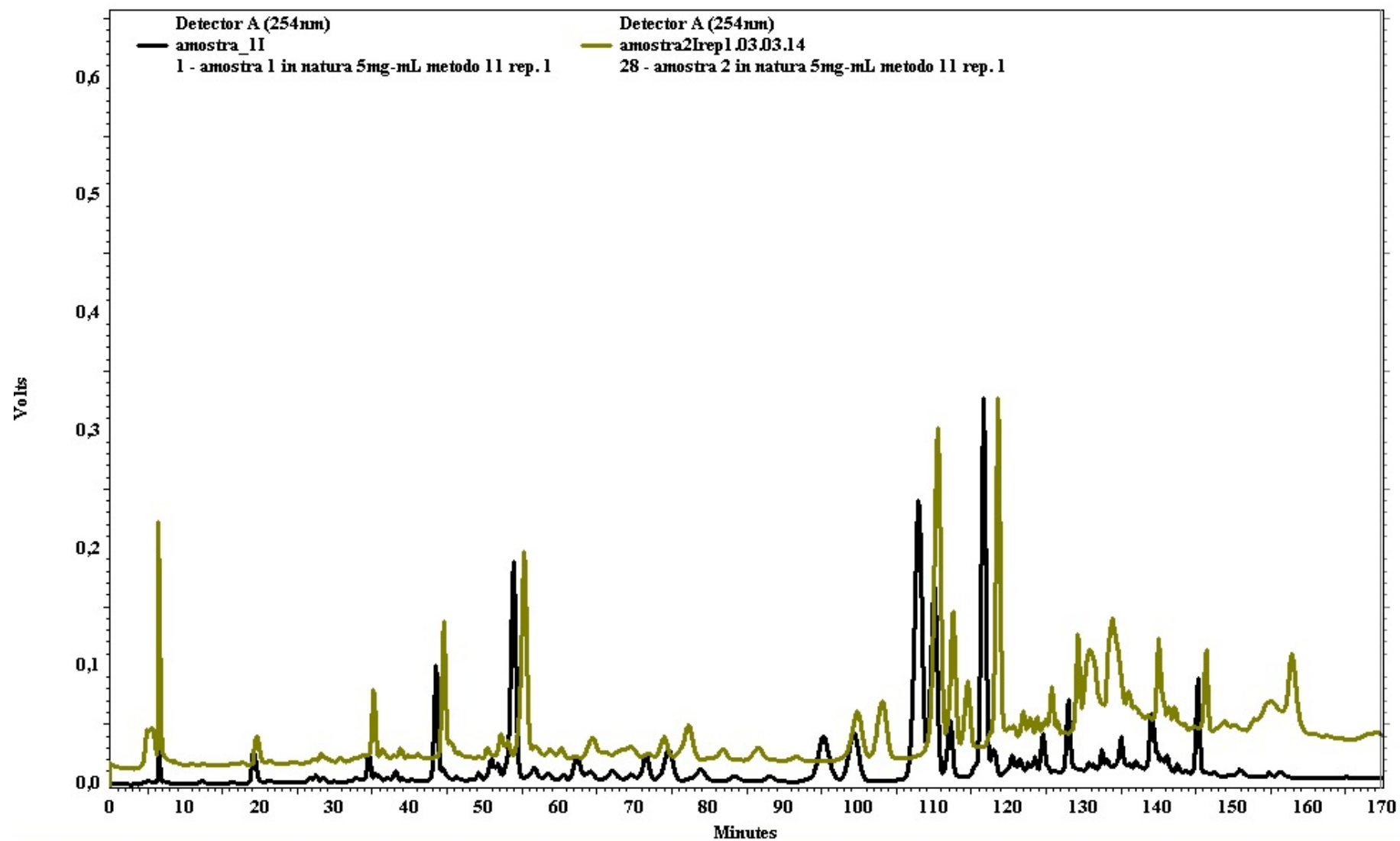


Figura 43 – Perfil cromatográfico de própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.

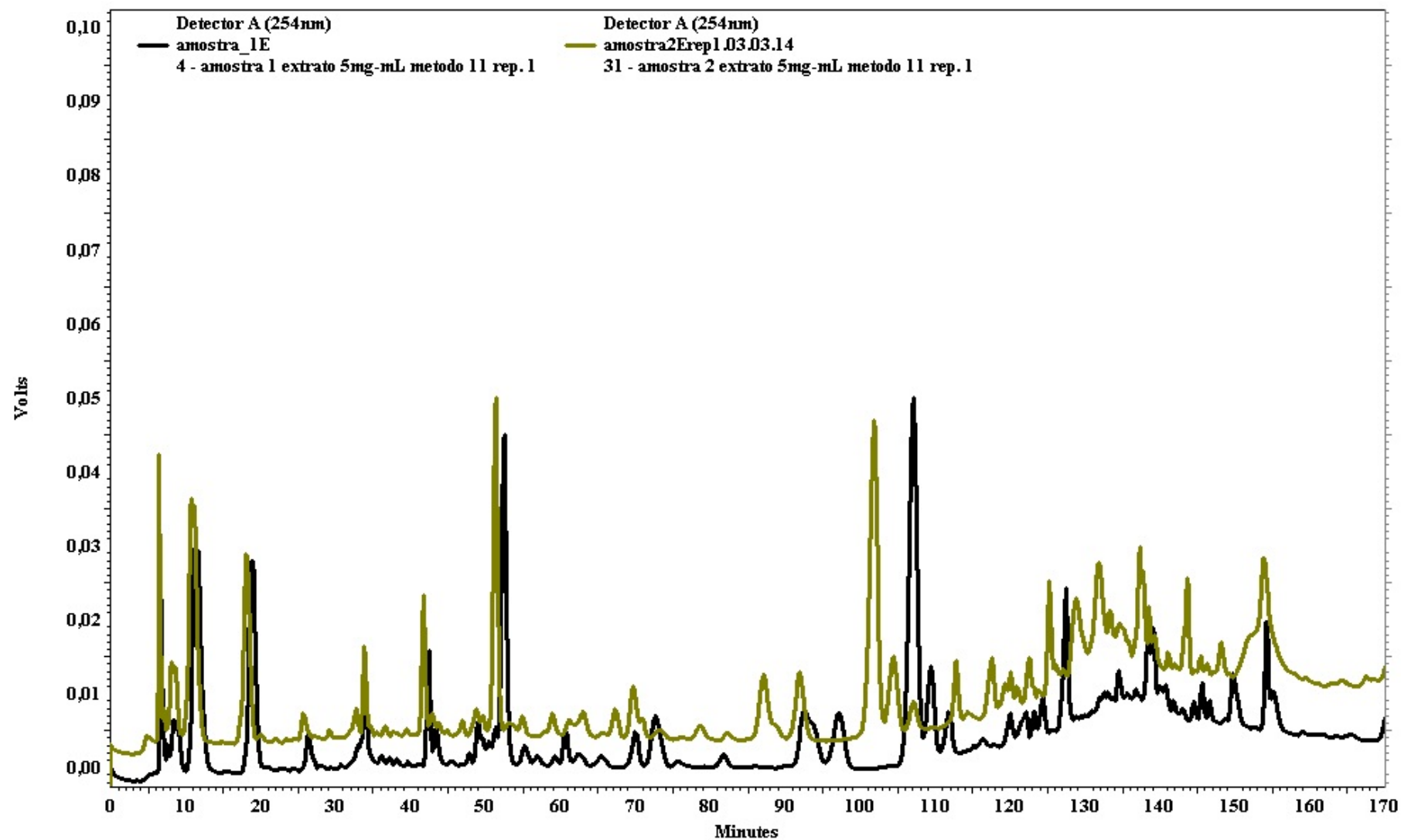


Figura 44 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.

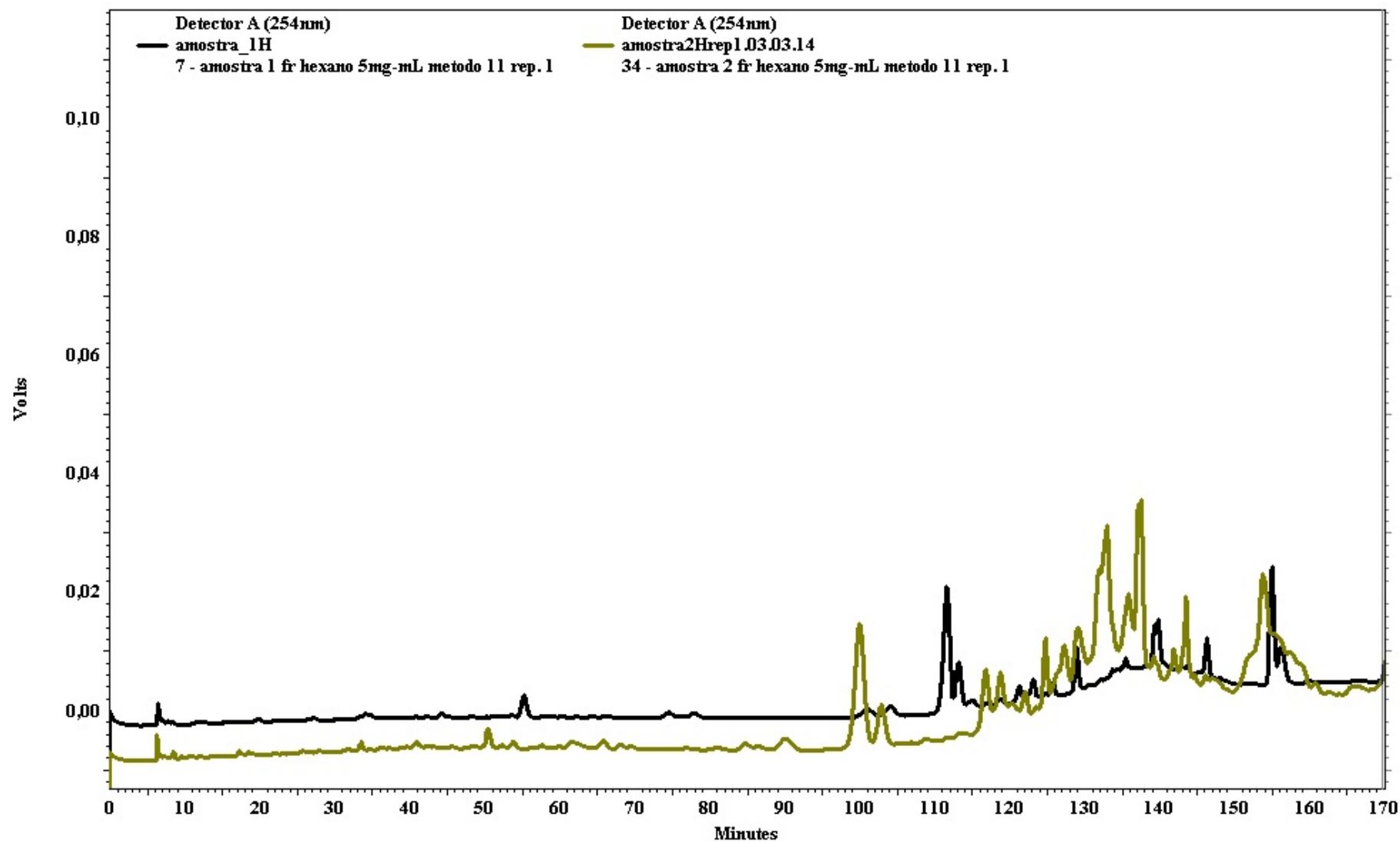


Figura 45 – Perfil cromatográfico da fração hexânica da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.

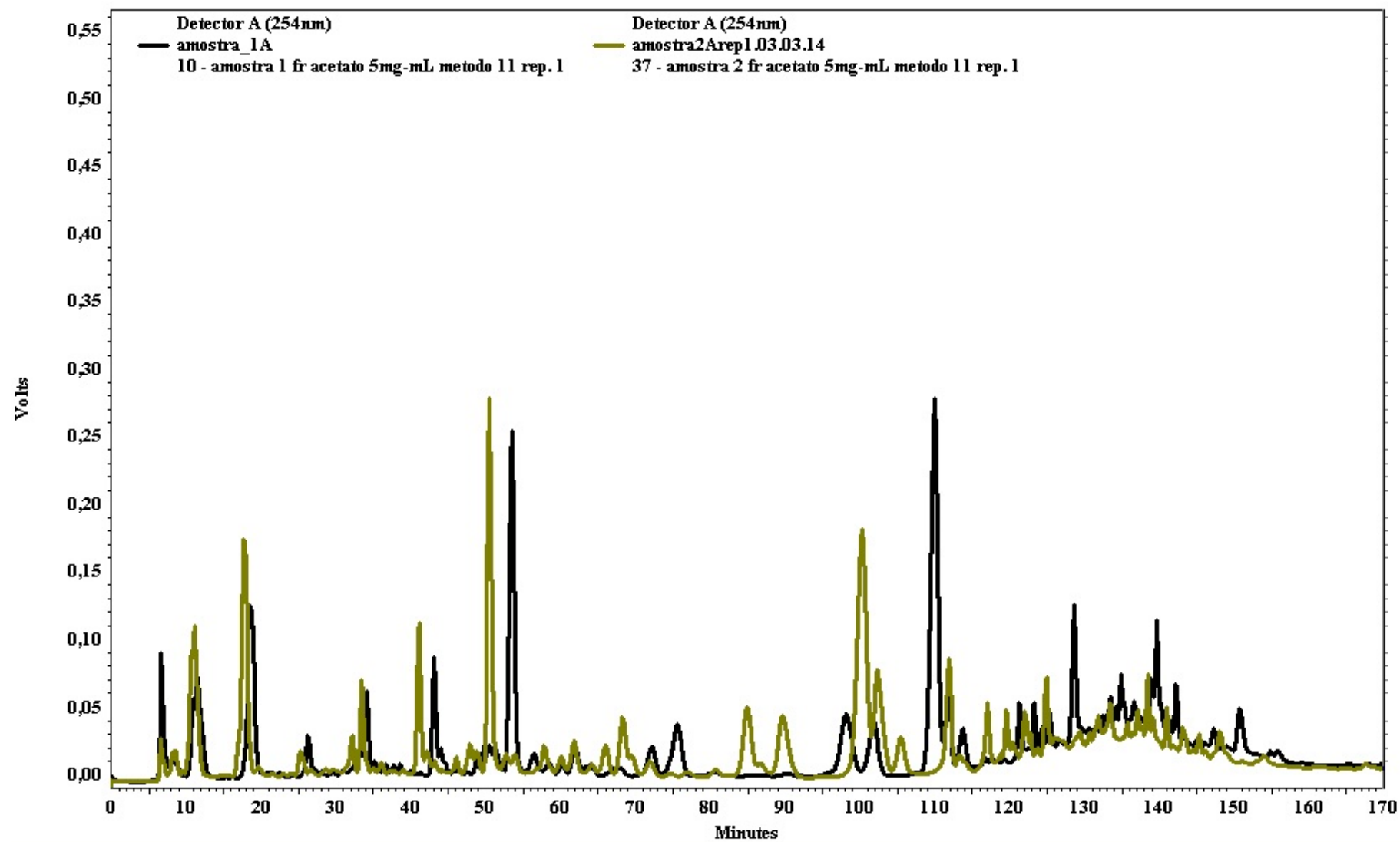


Figura 46 – Perfil cromatográfico da fração acetato de etila da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.

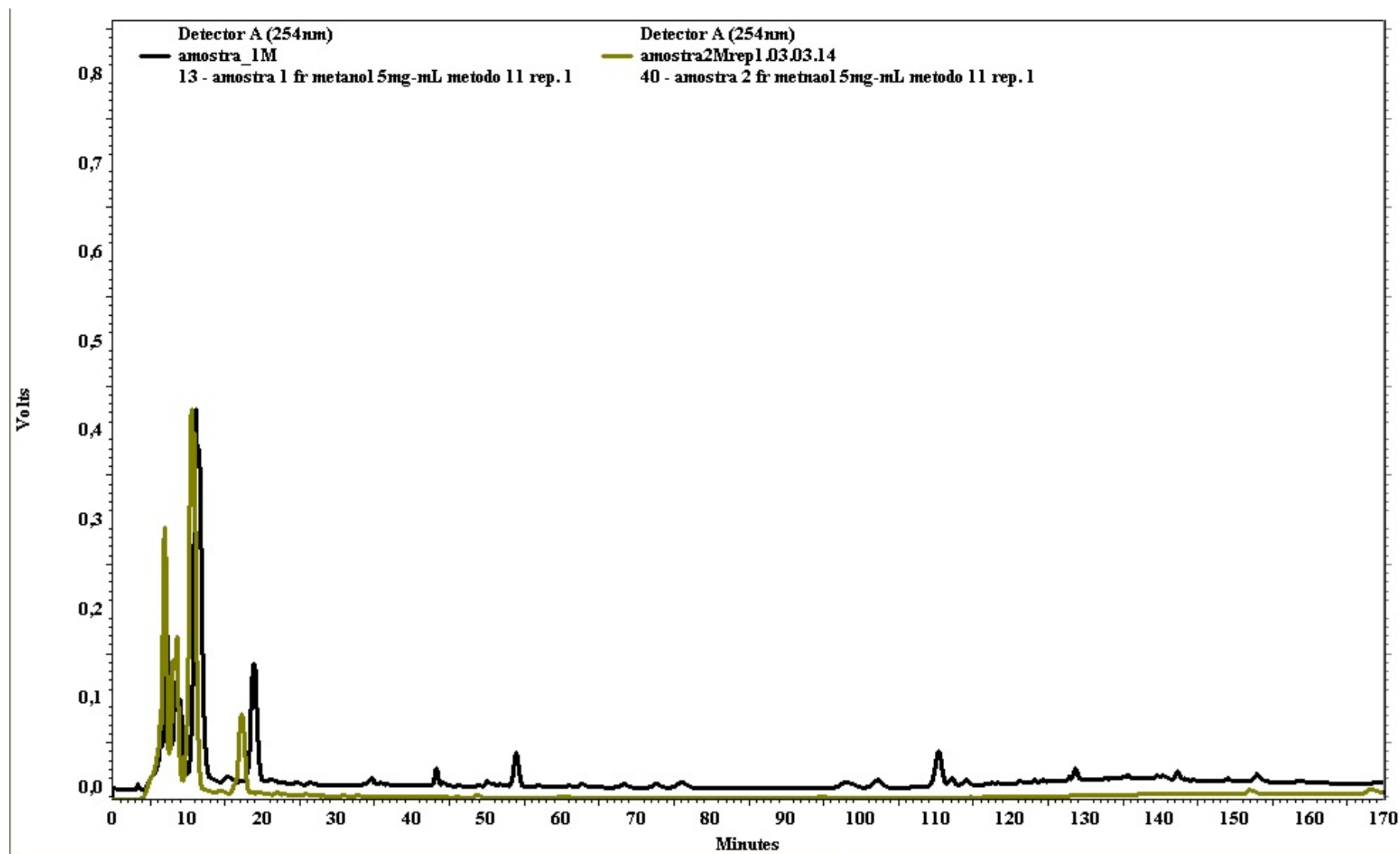


Figura 47 – Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica da amostra 1 e 2 obtido por CLAE.

5.8.2 - Identificação e quantificação dos padrões

Oito compostos fenólicos foram identificados e quantificados (1 ácido fenólico e 7 flavonoides) nas amostras *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, fração hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica das amostras 1 e 2 de própolis vermelha. O perfil cromatográfico de cada padrão separado estão apresentados nas figuras 48 – 55. O perfil cromatográfico dos padrões juntos em seis concentrações (0,5 – 100 µg/mL) estão apresentados nas figuras 56 – 61. As curvas de calibração dos compostos fenólicos criadas a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL, previamente produzidas contendo todos os padrões juntos estão apresentadas nas figuras 62 – 69. Os tempos de retenção e áreas dos compostos fenólicos estão apresentados nas tabelas 8 e 9. Os resultados da determinação quantitativa dos compostos fenólicos estão apresentados na Tabela 10.

Conforme mostra a tabela 10, todos os compostos fenólicos foram identificados e quantificados em todas as amostras analisadas, com exceção da luteolina que não estava presente na fração hexânica da amostra 1. Na própolis *in natura* e fração acetato de etila da amostra 1 o composto em menor quantidade foi a luteolina e em maior quantidade foi a formononetina. No extrato etanólico e na fração hexânica da amostra 1 o composto em menor quantidade foi a daidzeína e em maior quantidade foi a formononetina. Na fração hidroalcoólica da amostra 1 o composto em menor quantidade foi a daidzeína e em maior quantidade foi a pinocembrina. Na própolis *in natura* da amostra 2 o composto em menor quantidade foi a daidzeína e em maior quantidade foi a formononetina. No extrato etanólico e na fração hexânica da amostra 2 o composto em menor quantidade foi a daidzeína e em maior quantidade foi a pinocembrina. Na fração acetato de etila da amostra 2 o composto em menor quantidade foi a biochanina A e em maior quantidade foi a formononetina. Na fração hidroalcoólica da amostra 2 o composto em menor quantidade foi a biochanina A e em maior quantidade foi a luteolina.

A formononetina, composto que foi isolado da fração acetato de etila da amostra 1, através de Cromatografia em Coluna Aberta Sephadex LH-20, foi também identificado e quantificado nas 10 amostras analisadas através de Cromatografia Analítica de Alta Eficiência e apresentou-se como sendo o composto em maior quantidade entre 6 dessas 10 amostras. Ressaltando ainda, que este composto foi encontrado em maior quantidade na fração acetato de etila da amostra 1 (44,14 µg/mL), conforme apresentando na tabela 10, fração de onde o composto foi isolado.

Daugsch et al. (2007) analisaram o extrato etanólico de seis amostras de própolis vermelha e da resina de *Dalbergia ecastaphyllum* através de Cromatografia Analítica de Alta

Eficiência de Fase Reversa e listaram 18 compostos tanto na própolis quanto na planta, mas, identificaram e quantificaram apenas 12 desses compostos listados, dentre estes, 7 compostos foram identificados e quantificados no nosso trabalho, são eles: rutina, daidzeína, quercetina, luteolina, formononetina, pinocembrina e biochanina A. Apesar dos autores terem utilizado uma metodologia diferente da utilizada no nosso trabalho, pode-se observar que assim como os autores, esses 7 compostos também foram eluídos na mesma sequência de eluição do nosso trabalho (Tabelas 8 e 9 – Página 145), o que corrobora com os nossos resultados.

Nas seis amostras de própolis vermelha assim como na resina de *Dalbergia ecastaphyllum*, estudadas por Dausch et al. (2007), dentre os 18 compostos que foram listados e os 12 compostos que foram identificados e quantificados pelos autores, apenas a formononetina é que aparece como um composto majoritário, outras substâncias que aparecem como majoritárias nos cromatogramas, não foram identificadas e quantificadas pelos autores. Esses resultados corroboram como os encontrados no nosso estudo, onde algumas substâncias majoritárias não foram identificadas e quantificadas nas nossas amostras.

Alencar et al. (2007) analisaram o extrato etanólico, fração hexânica e fração clorofórmica de própolis vermelha através de Cromatografia Analítica de Alta Eficiência e listaram 6 compostos no extrato e fração clorofórmica e 1 composto na fração hexânica. Identificaram e quantificaram no extrato e na fração clorofórmica, apenas 3 desses compostos listados, dentre estes, todos os compostos foram identificados e quantificados no nosso trabalho, são eles: ácido ferúlico, daidzeína e quercetina. Apesar dos autores terem usado uma metodologia que difere da utilizada no nosso estudo, os compostos aparecem na mesma sequência que a encontrada no nosso trabalho. Os outros 3 compostos que não foram identificados e quantificados por Alencar et al. (2007) aparecem como compostos majoritários.

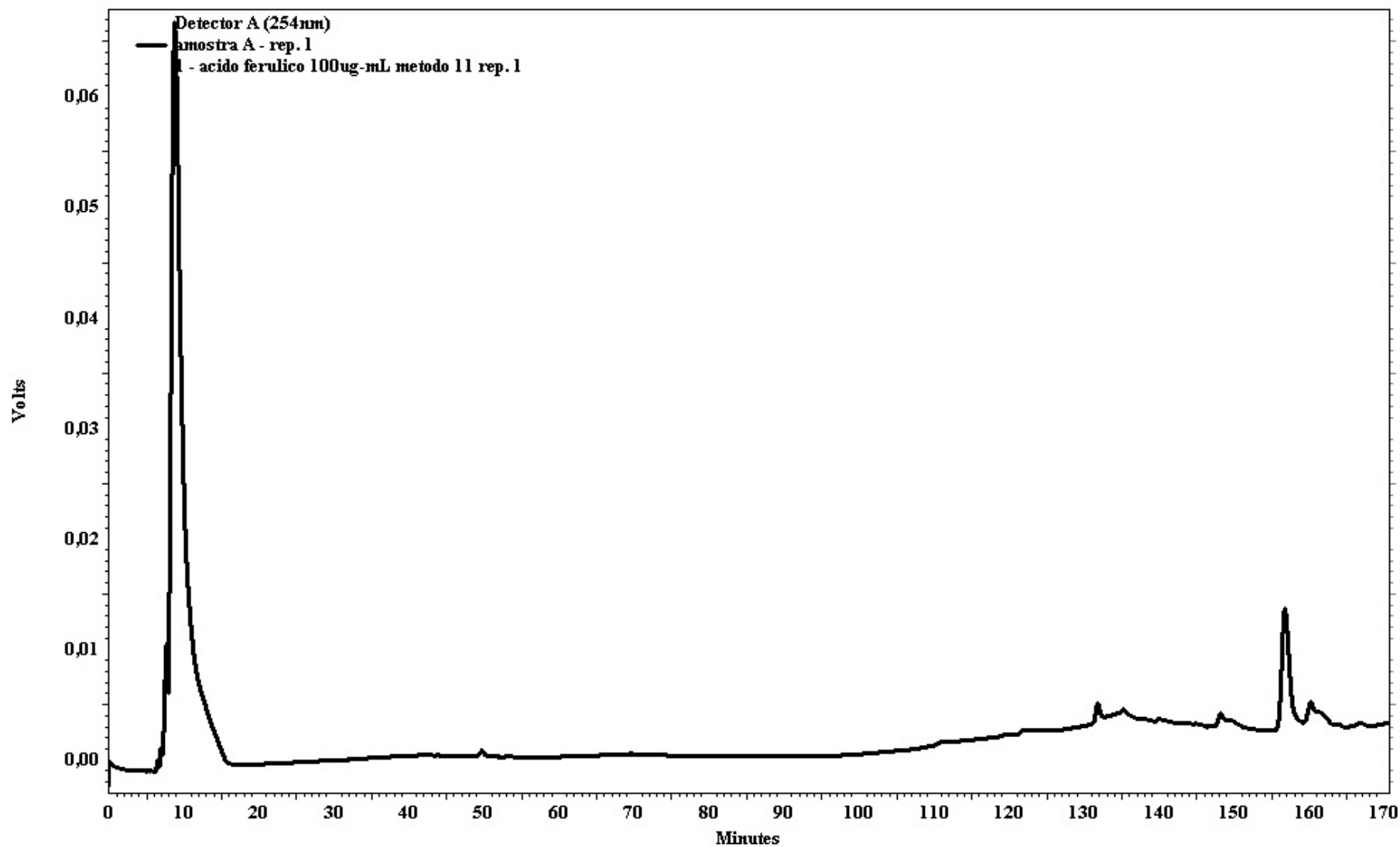


Figura 48 – Perfil cromatográfico do ácido ferúlico na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

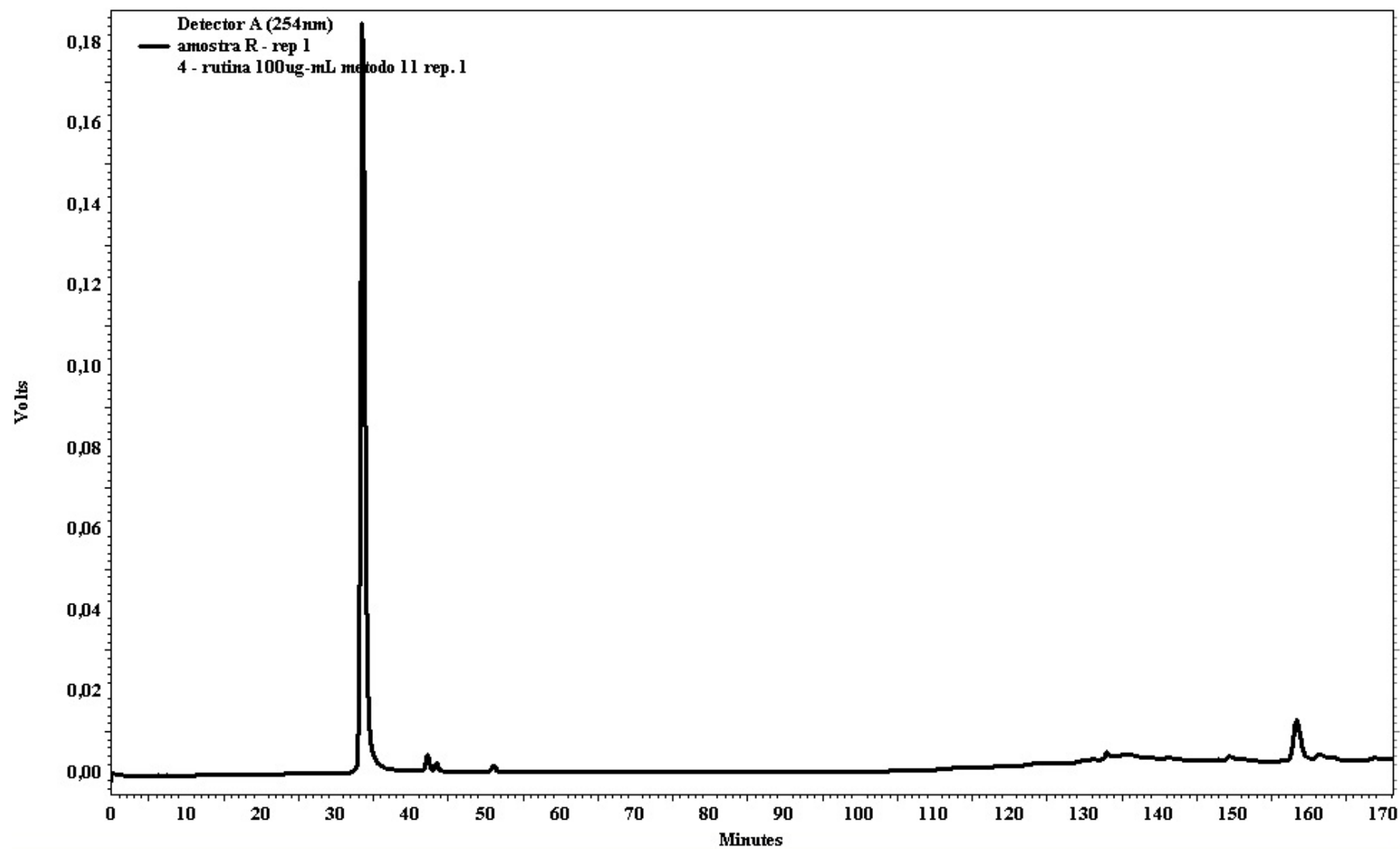


Figura 49 – Perfil cromatográfico da rutina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

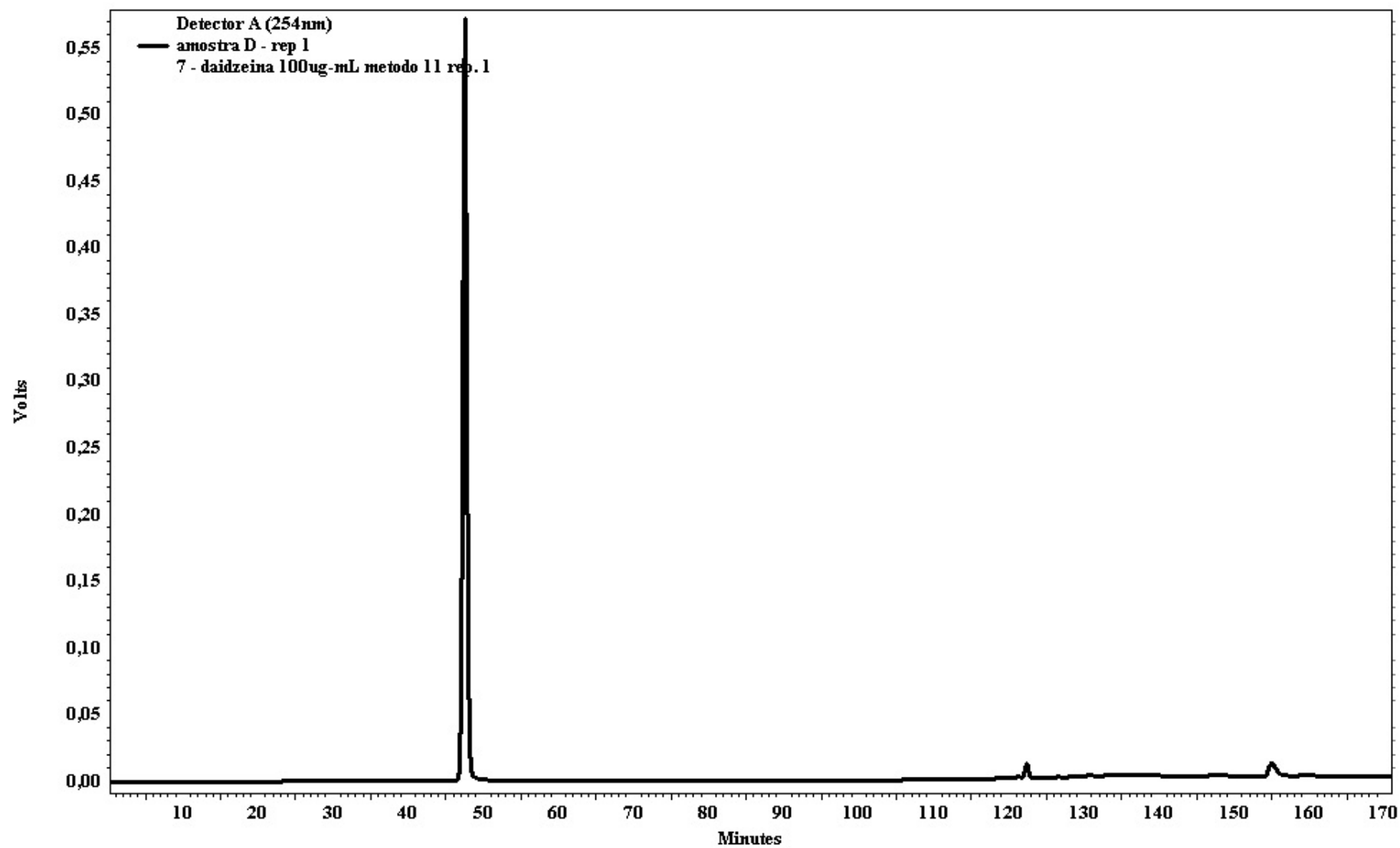


Figura 50 – Perfil cromatográfico da daidzeína na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

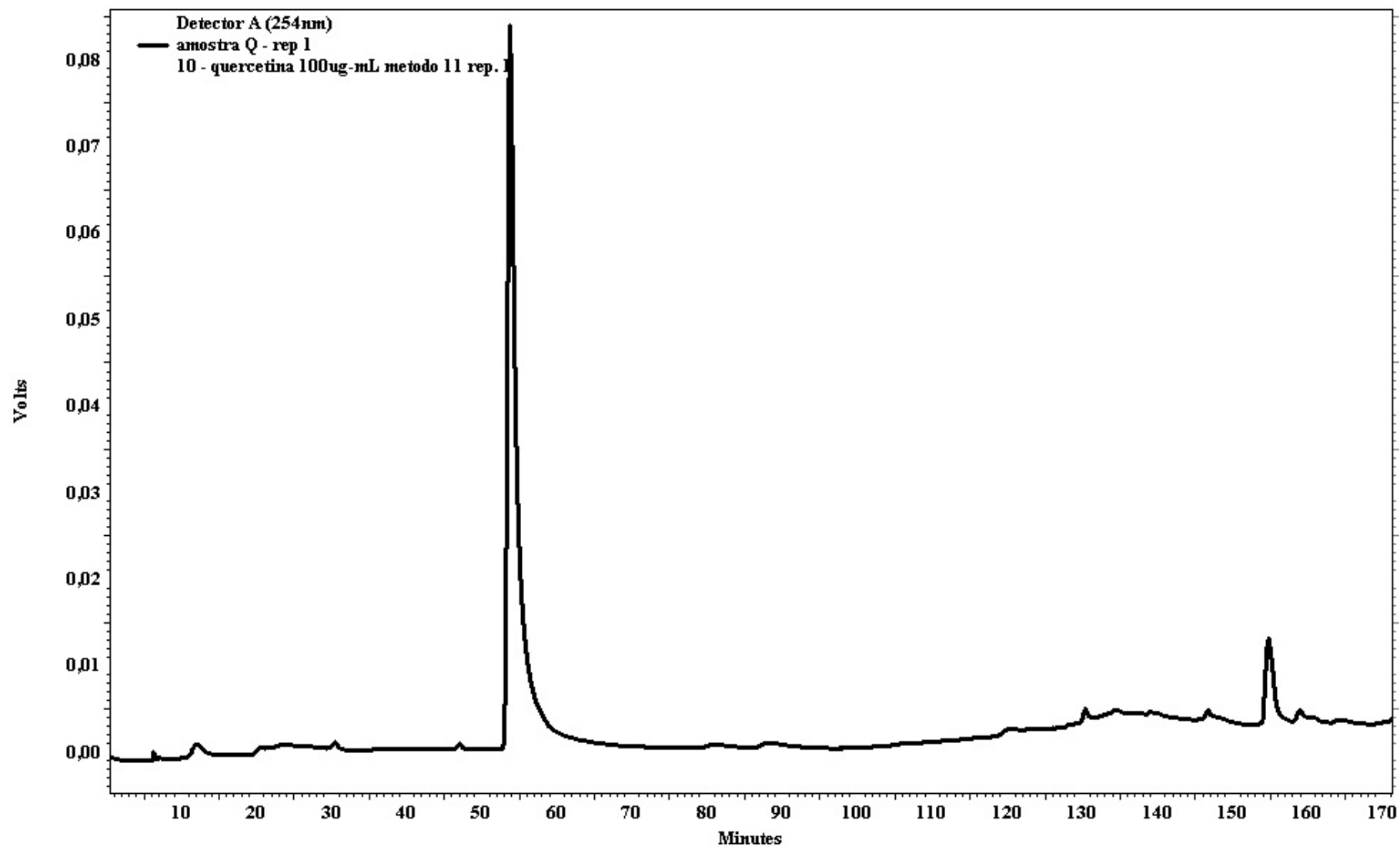


Figura 51 – Perfil cromatográfico da quercetina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

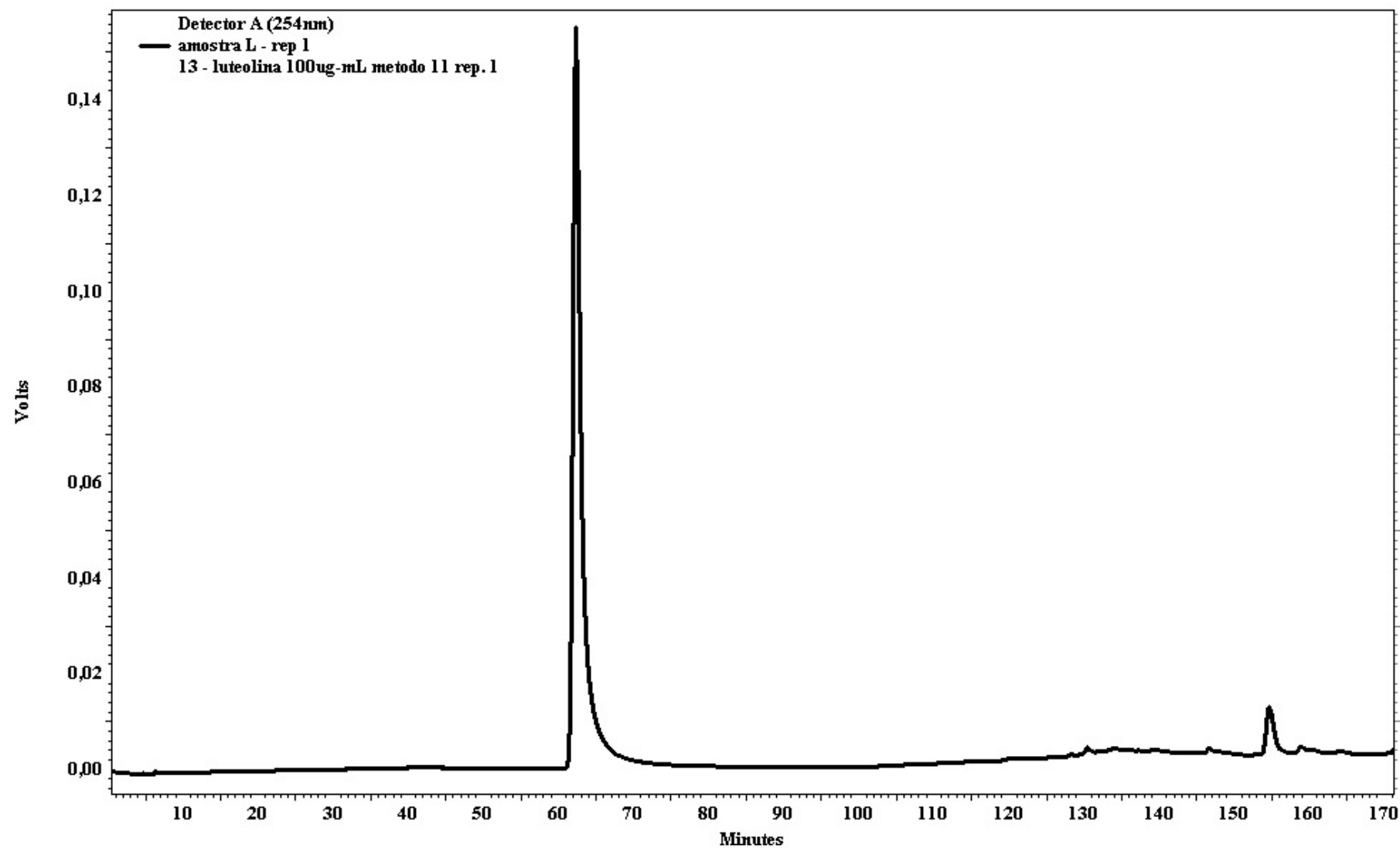


Figura 52 – Perfil cromatográfico da luteolina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

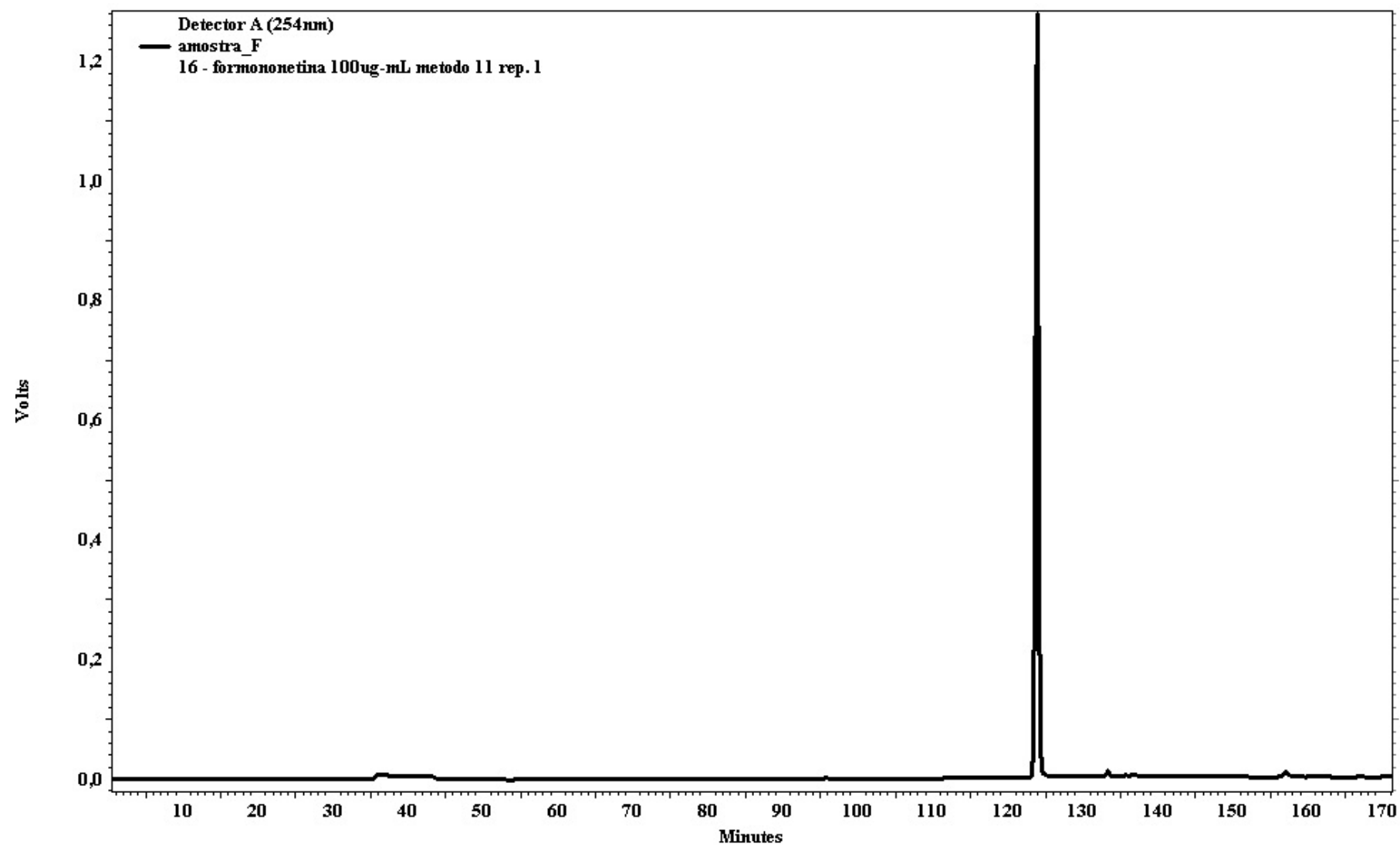


Figura 53 – Perfil cromatográfico da formononetina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

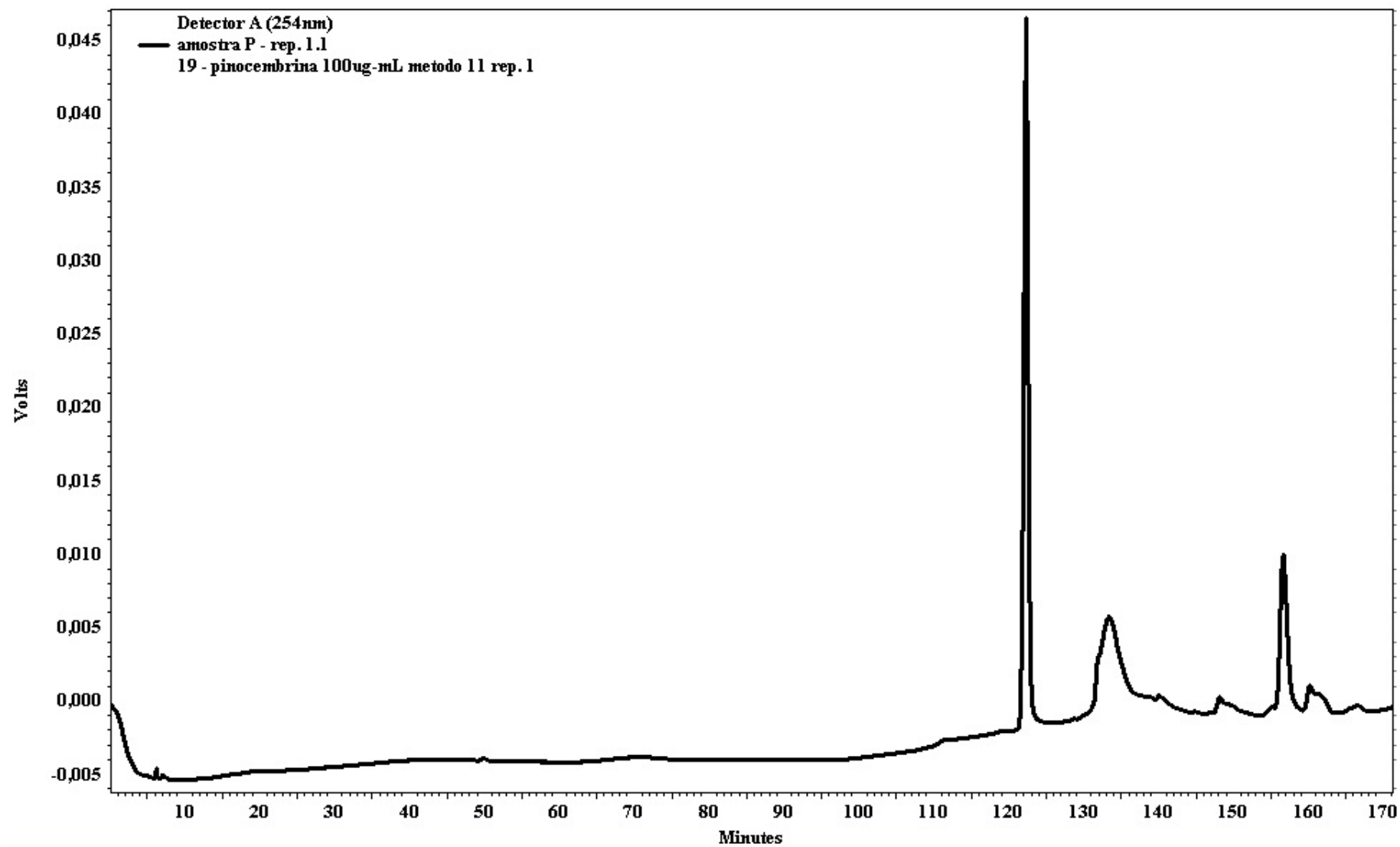


Figura 54 – Perfil cromatográfico da pinocembrina na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

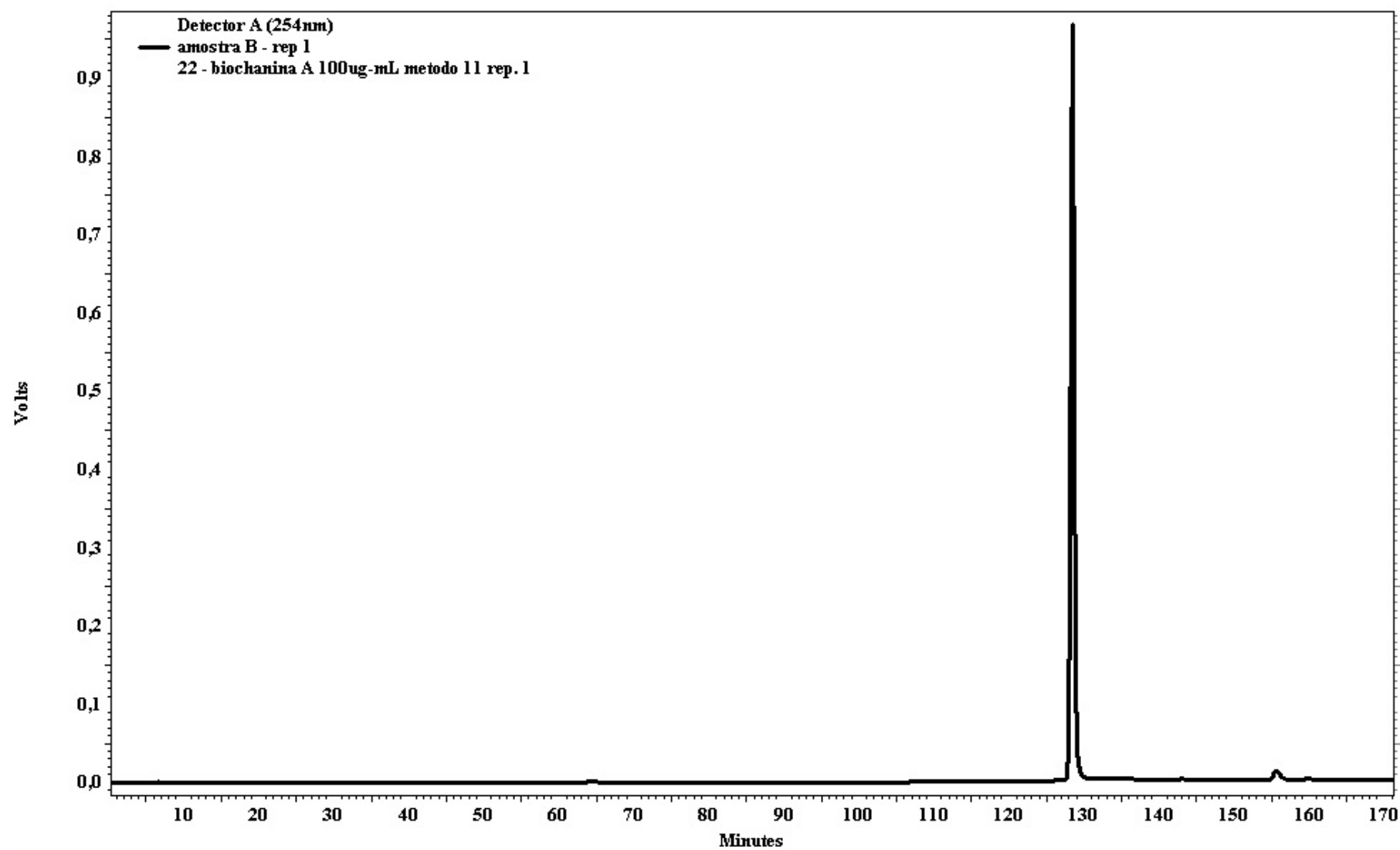


Figura 55 – Perfil cromatográfico da biochanina A na concentração de 100 µg/mL obtido por CLAE.

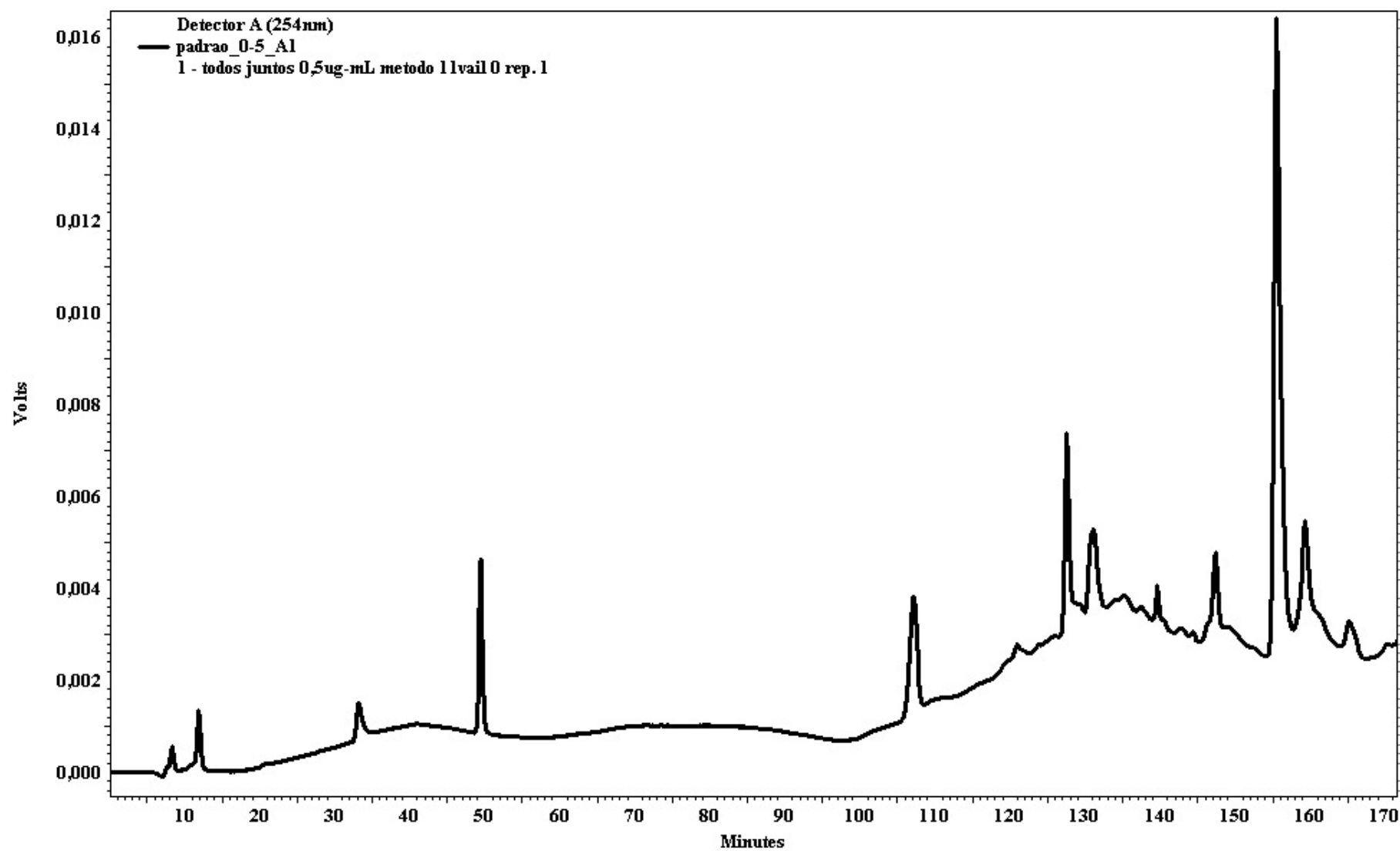


Figura 56 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 0,5 µg/mL obtido por CLAE.

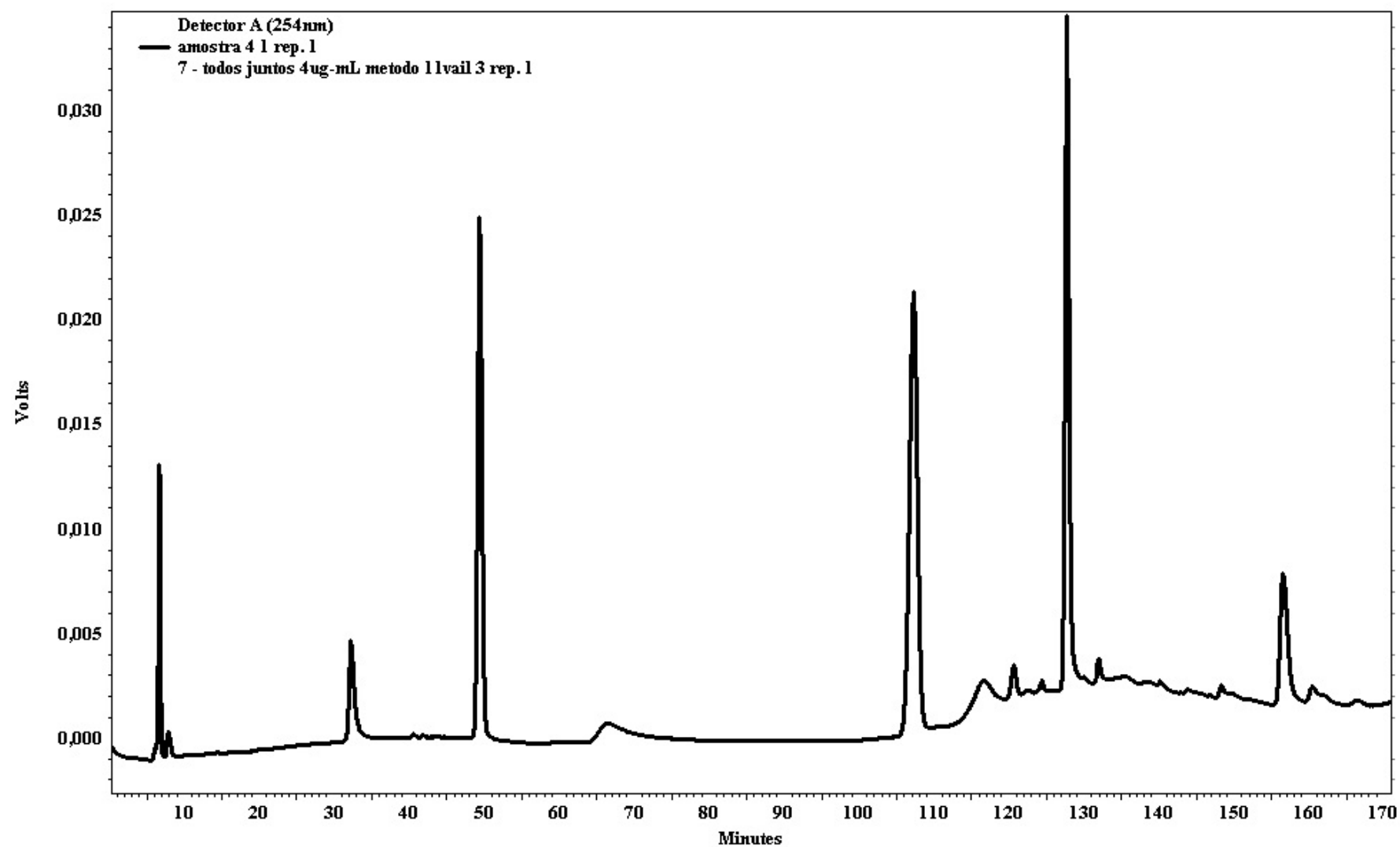


Figura 57 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ obtido por CLAE.

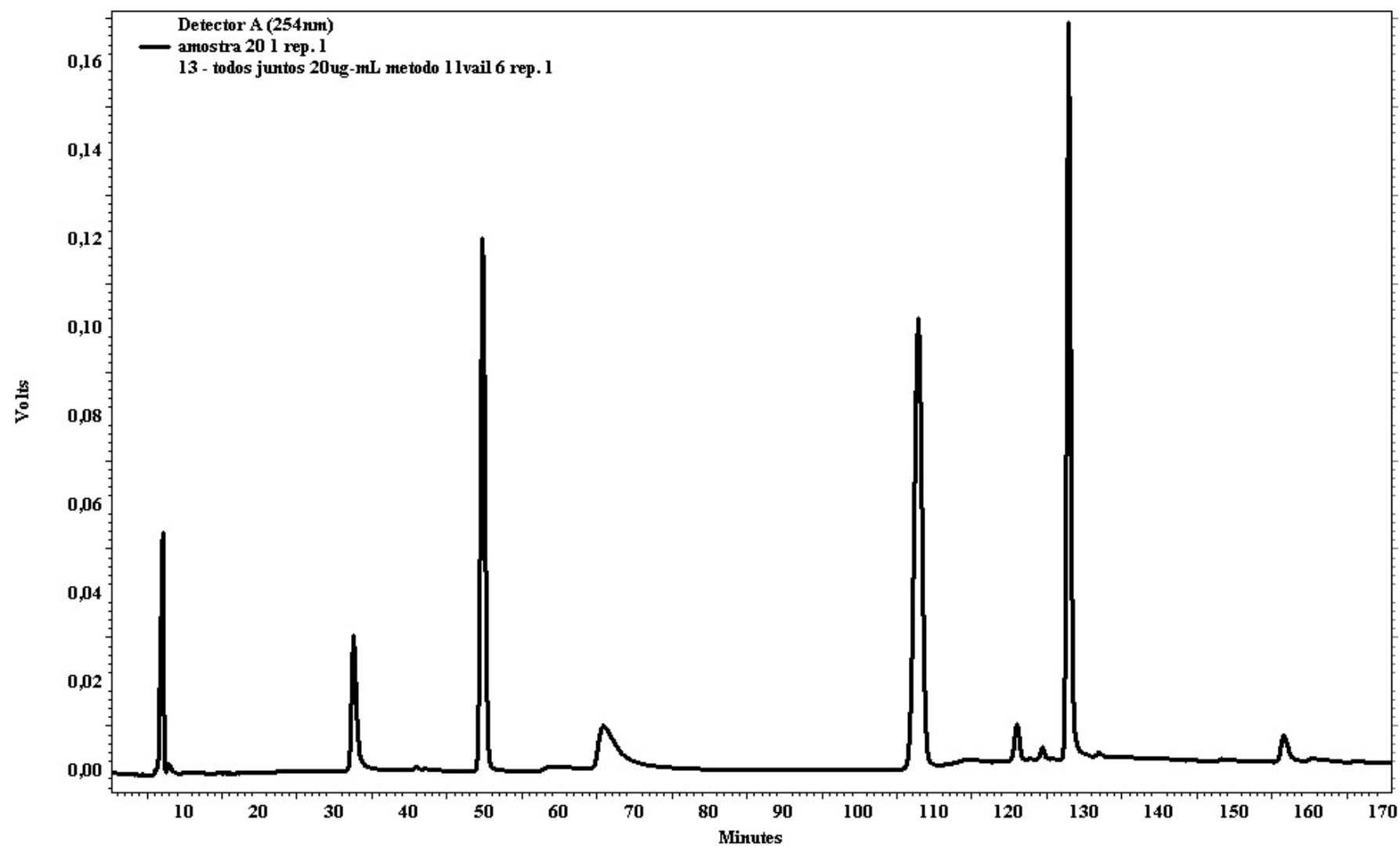


Figura 58 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ obtido por CLAE.

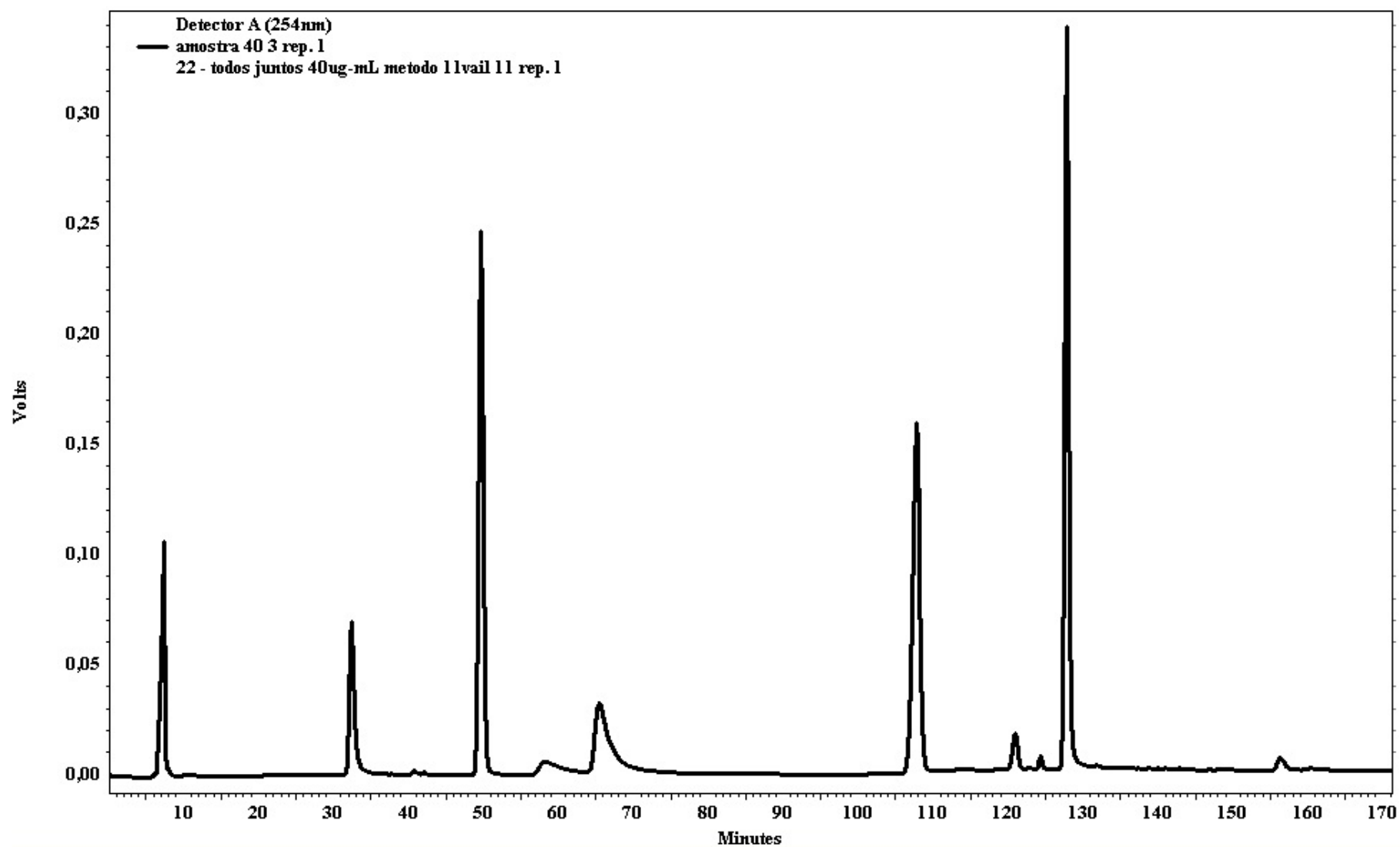


Figura 59 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ obtido por CLAE.

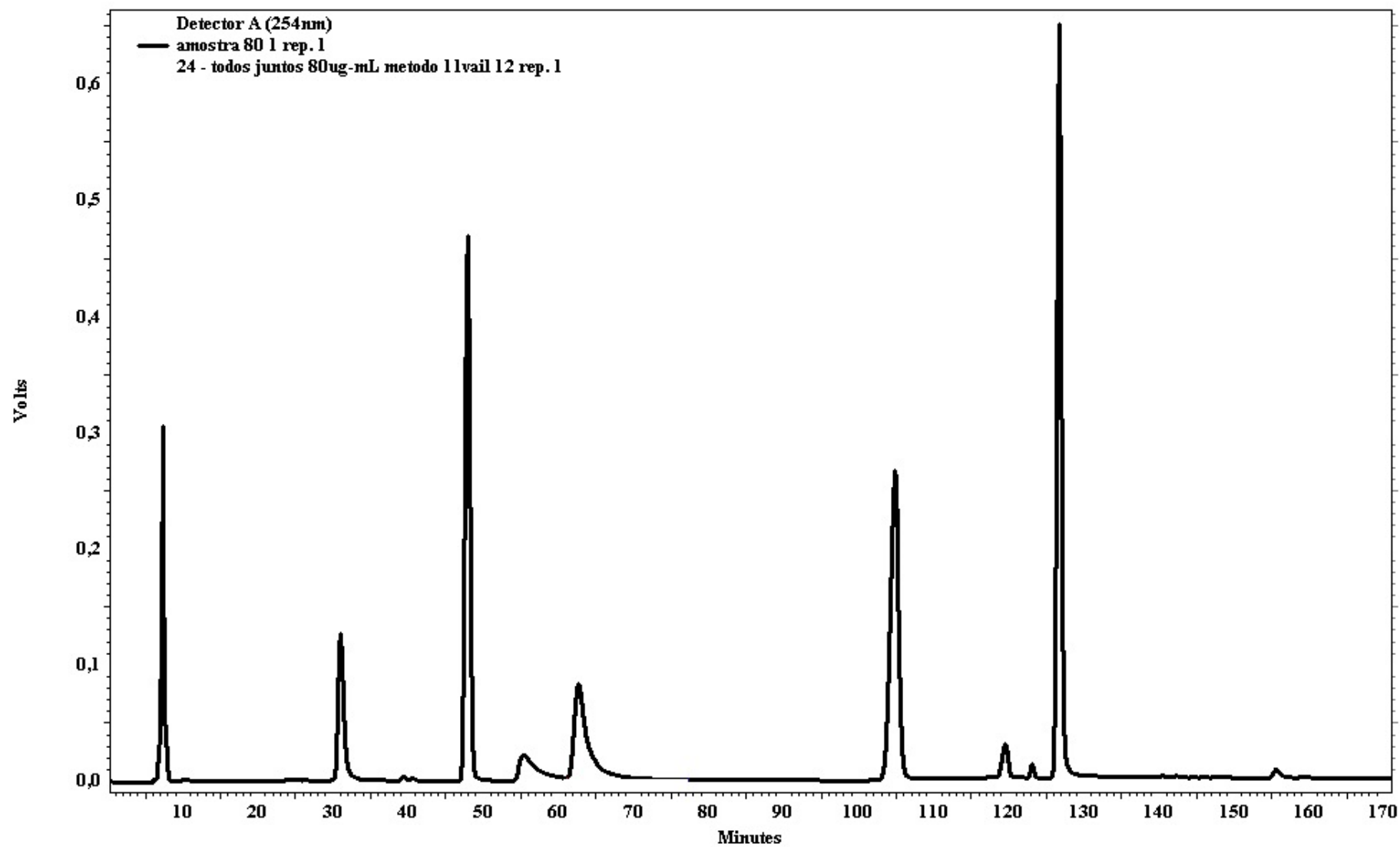


Figura 60 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ obtido por CLAE.

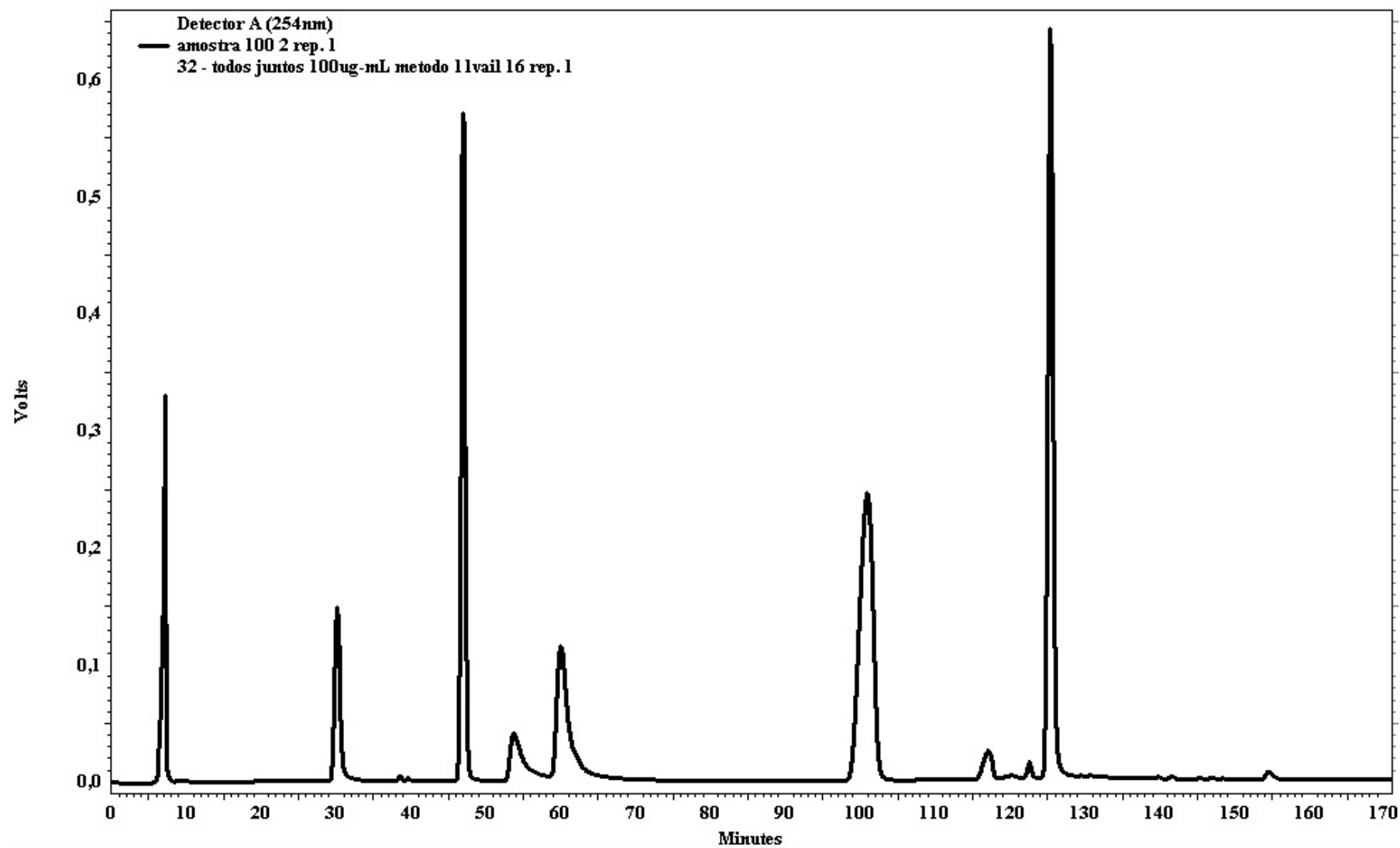


Figura 61 – Perfil cromatográfico dos padrões juntos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ obtido por CLAE.

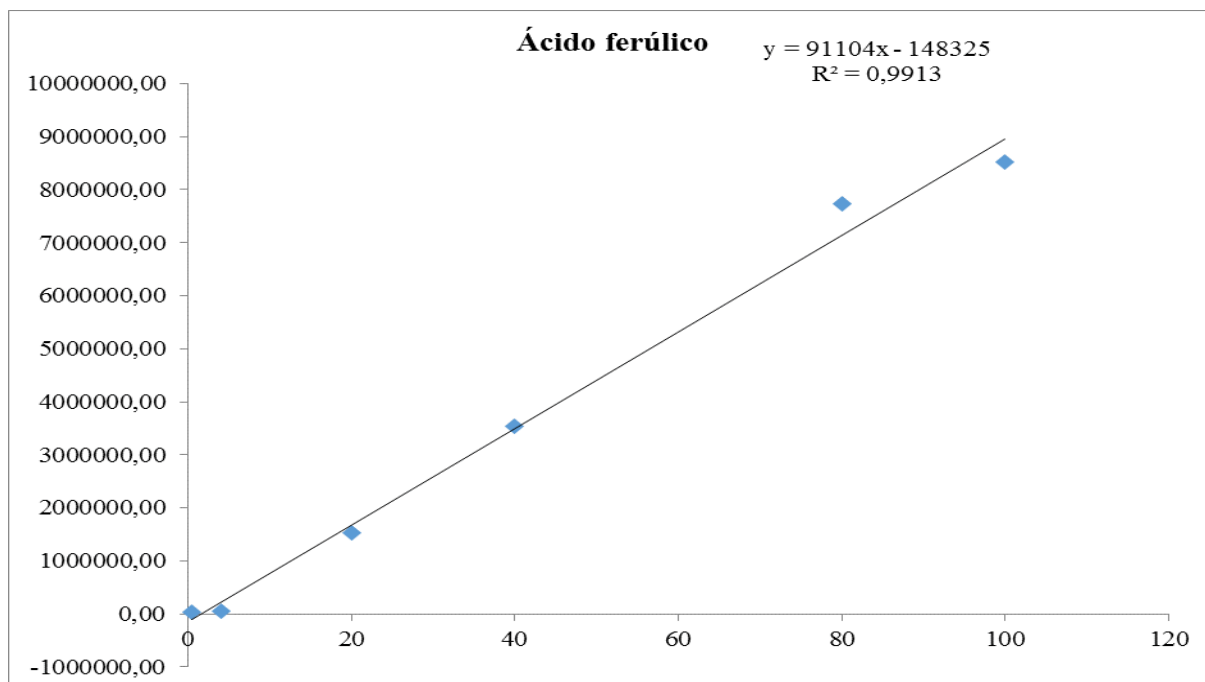


Figura 62 - Curva de calibração do ácido ferúlico criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

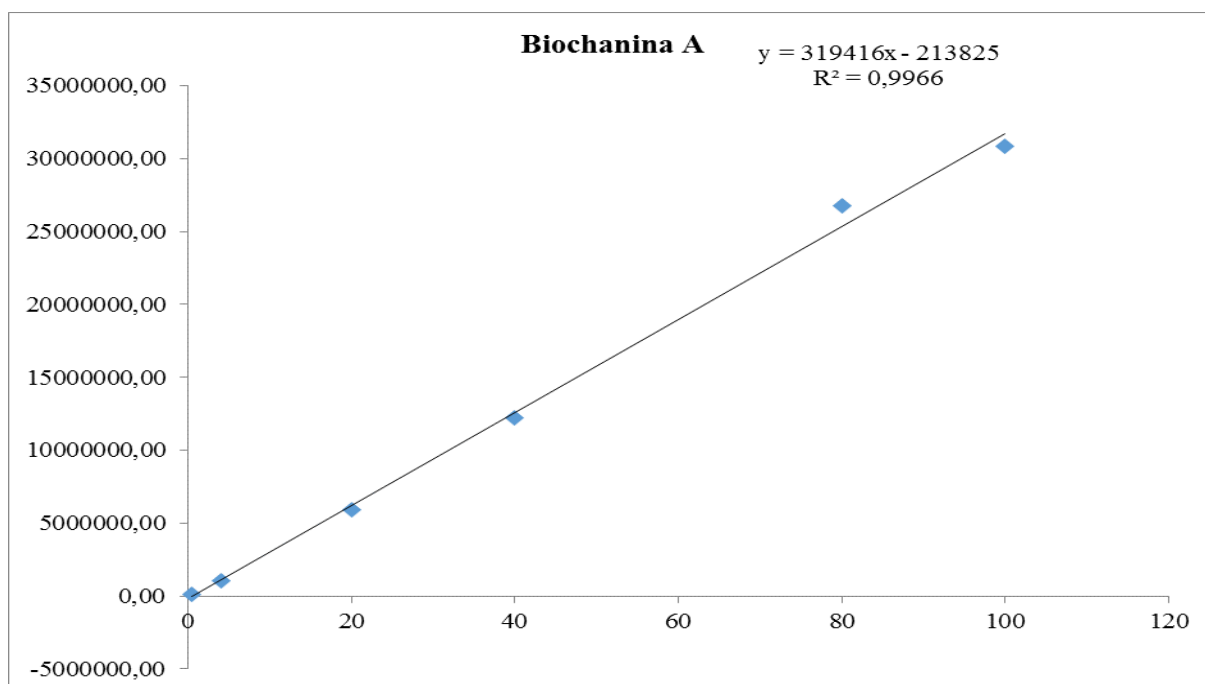


Figura 63 – Curva de calibração da biochanina A criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

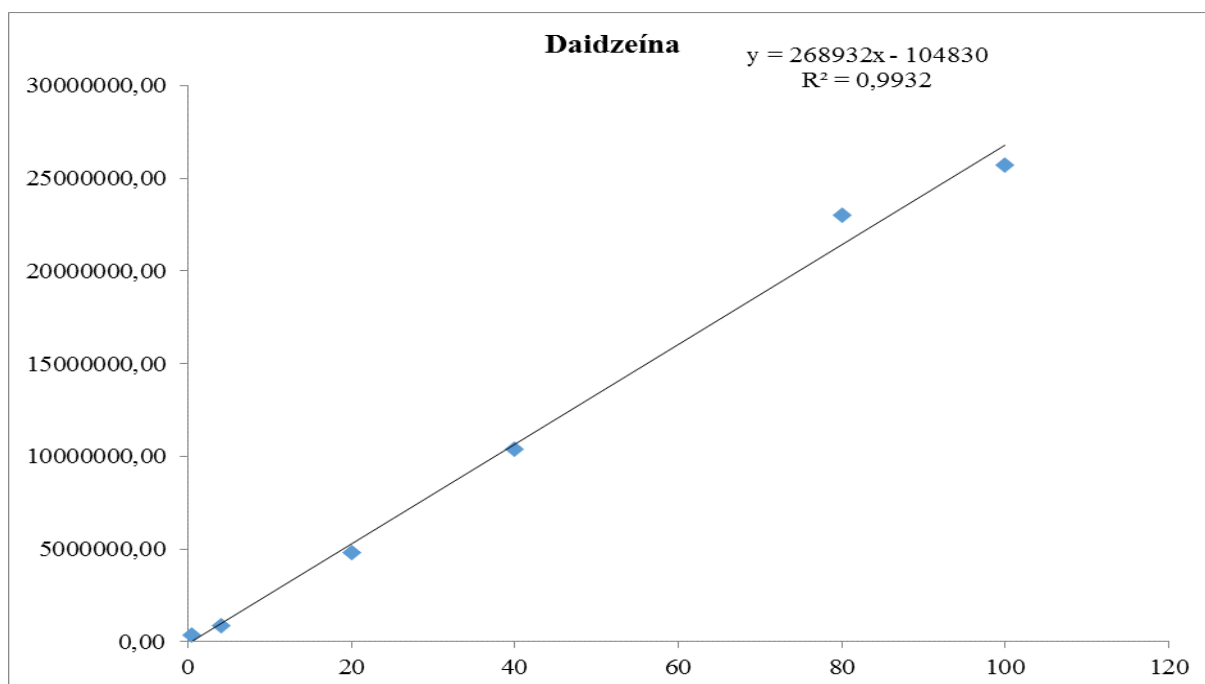


Figura 64 – Curva de calibração da daidzeína criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

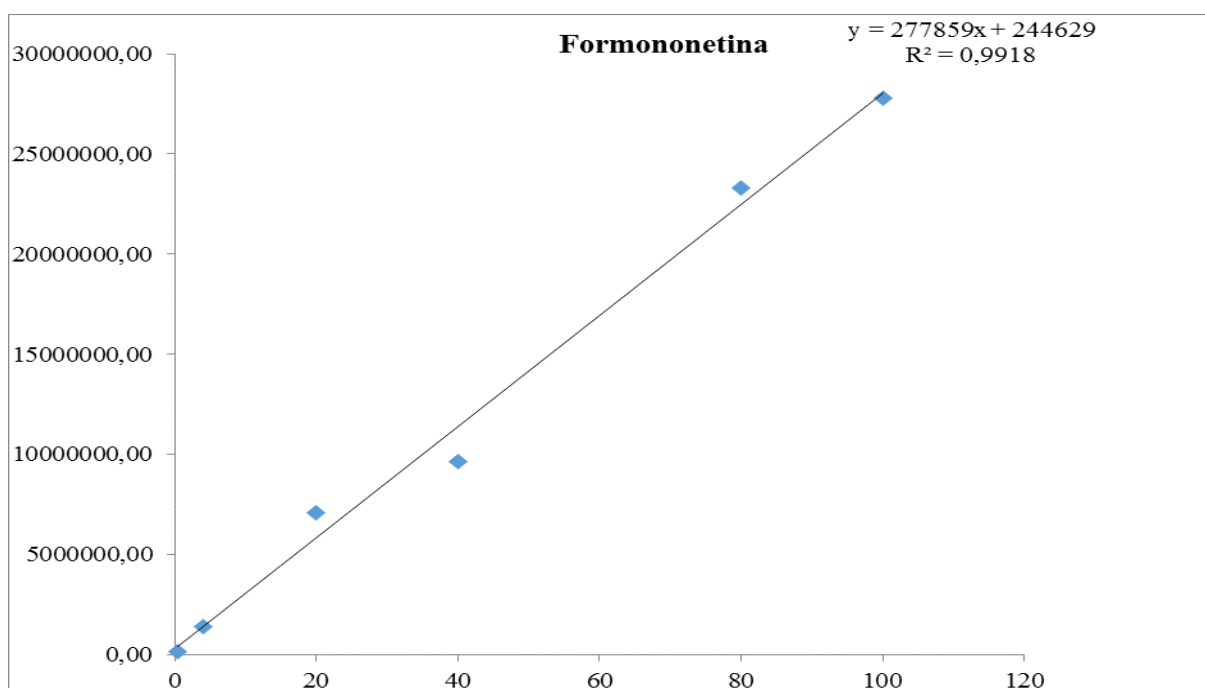


Figura 65 – Curva de calibração da formononetina criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

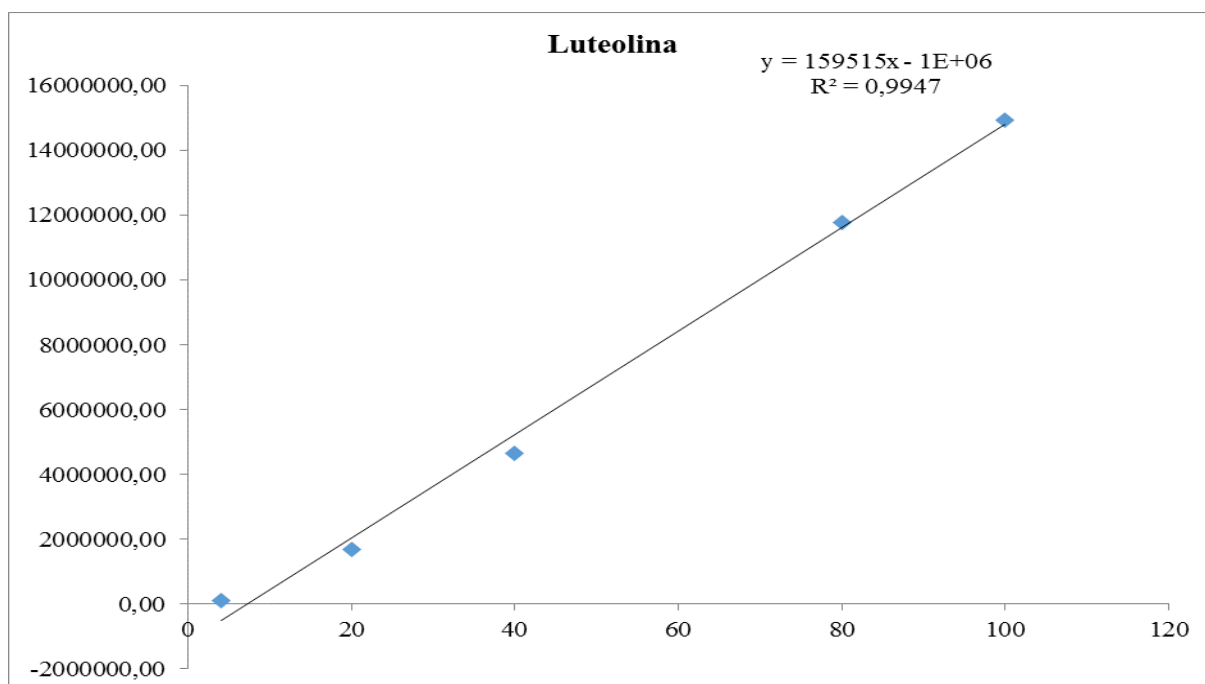


Figura 66 – Curva de calibração da luteolina criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

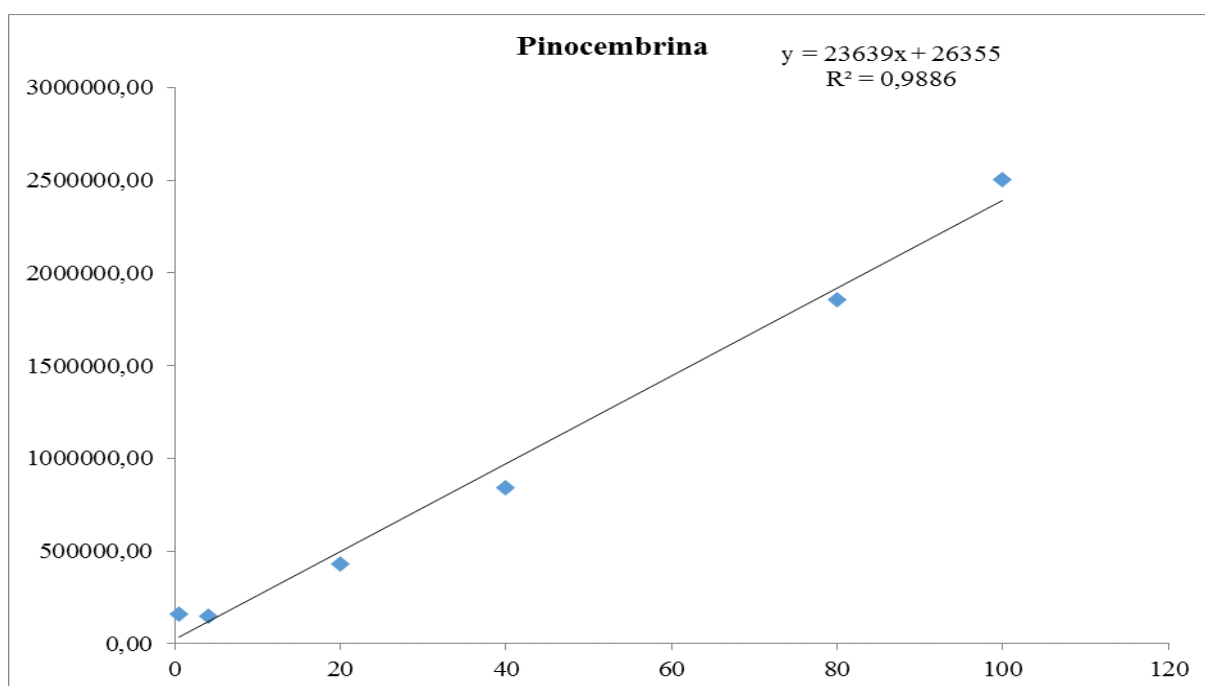


Figura 67 – Curva de calibração da pinocembrina criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

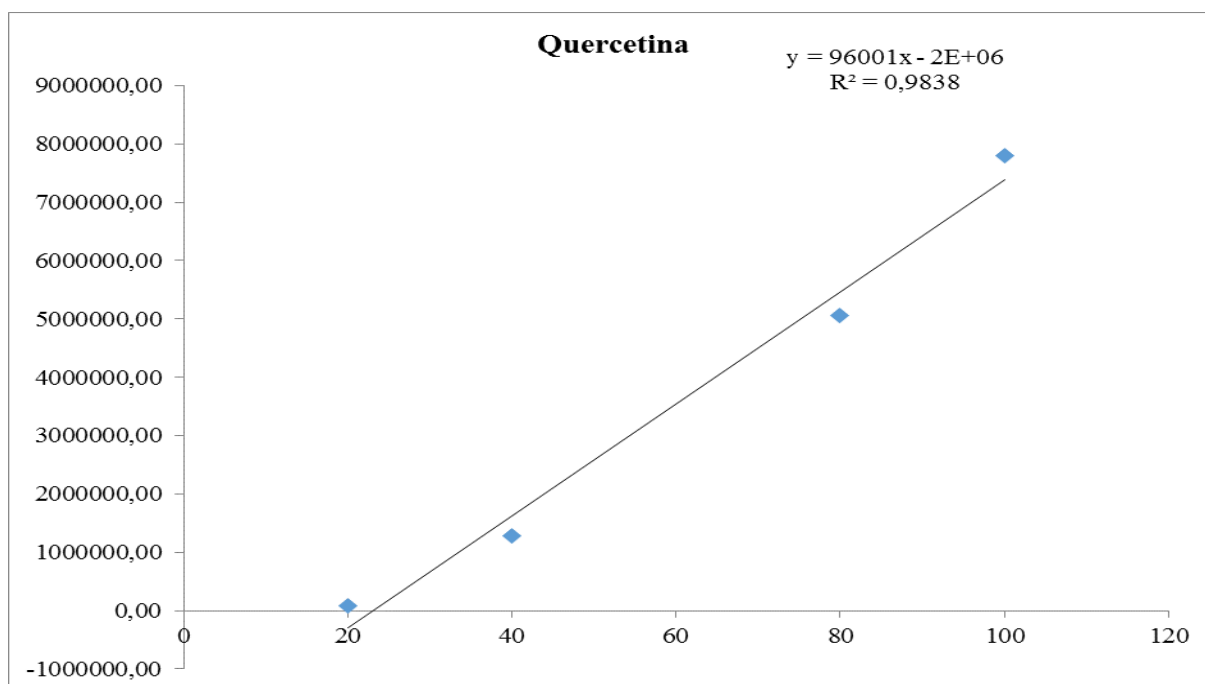


Figura 68 – Curva de calibração da quercetina criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

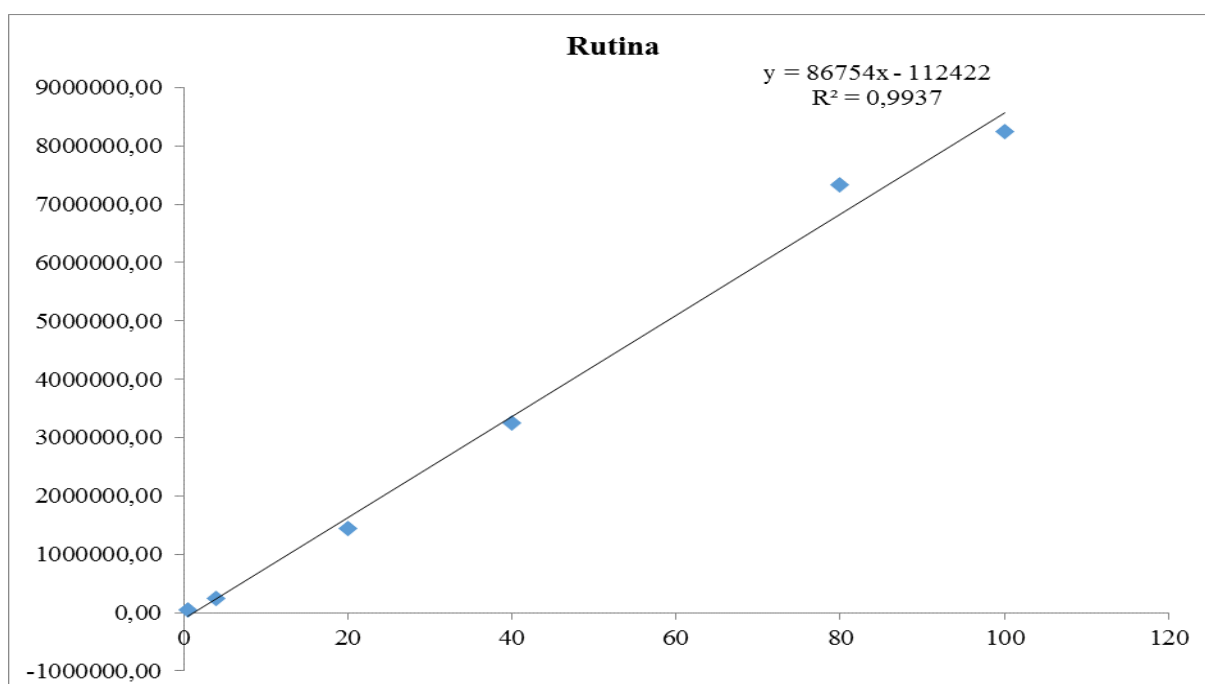


Figura 69 – Curva de calibração da rutina criada a partir das concentrações 0,5, 4, 20, 40, 80 e 100 µg/mL previamente produzida contendo todos os padrões juntos.

Tabela 8 – Tempo de retenção (min.) e área dos padrões de compostos fenólicos injetados separadamente em triplicata na concentração de 100 µg/mL.

Pico	Compostos fenólicos	Tempo de retenção (min.)	Área
1	Ácido ferúlico	8,801	9048267
2	Rutina	31,978	89771415
3	Daidzeína	49,023	26745235
4	Quercetina	57,038	7726581
5	Luteolina	65,689	16298561
6	Formononetina	107,981	37258225
7	Pinocembrina	121,485	2274975
8	Biochanina A	127,907	33632454

Tabela 9 – Tempo de retenção (min.) e área dos padrões de compostos fenólicos injetados juntos em triplicata na concentração de 100 µg/mL.

Pico	Compostos fenólicos	Tempo de retenção (min.)	Área
1	Ácido ferúlico	8,824	7991307
2	Rutina	33,005	8224770
3	Daidzeína	49,245	21630396
4	Quercetina	54,121	8647318
5	Luteolina	61,499	13382839
6	Formononetina	113,687	36001216
7	Pinocembrina	121,850	1982773
8	Biochanina A	128,403	31744260

Tabela 10 – Conteúdo dos compostos fenólicos nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha (µg/mg de amostra).

Compostos	Amostra 1					Amostra 2				
	<i>in natura</i>	Extrato	Fr. Hex	Fr-AcOEt	Fr. HA	<i>in natura</i>	Extrato	Fr.Hex	Fr-AcOEt	Fr. HA
Ácido ferúlico	1,53	0,95	0,29	2,37	1,46	0,81	0,12	0,21	4,36	20,47
Biochanina A	1,02	0,55	0,08	2,68	0,07	0,05	0,16	0,54	0,10	0,05
Daidzeína	0,36	0,02	0,07	0,60	0,04	0,02	0,01	0,00	0,92	0,07
Formononetina	12,37	2,86	3,83	44,14	2,13	2,03	1,70	1,11	16,12	0,18
Luteolina	0,24	1,04	nd	0,49	1,05	1,07	1,08	1,19	0,21	1,22
Pinocembrina	4,85	2,07	1,63	7,31	5,65	1,78	2,31	3,03	14,50	0,36
Rutina	0,53	0,21	0,20	0,84	0,13	0,20	0,01	0,19	3,27	0,41
Quercetina	1,87	0,37	0,37	1,29	0,39	0,39	0,39	0,41	1,81	0,37
Total:	22,41	8,07	6,47	59,72	10,92	6,35	5,78	6,68	41,29	23,13

Fr. Hex: fração hexânica

Fr. AcEOt: fração acetato de etila

Fr. HA: fração hidroalcoólica

nd: não detectado.

5.9 - Análise do perfil fenólico da própolis *in natura*, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica

5.9.1 - Determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides totais

O teor de compostos fenólicos totais é frequentemente usado para explicar a atividade antioxidante, entretanto o seu significado é diferente de capacidade e/ou atividade antioxidante. Para se medir a capacidade antioxidante é necessário a extração de compostos fenólicos de efetiva atividade. Em geral, soluções de etanol:água ou metanol:água são mais eficientes na extração de compostos fenólicos do que água, etanol ou metanol puros (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1997).

A tabela 11 (Página 148) apresenta os resultados dos teores de fenólicos e flavonoides totais na própolis vermelha *in natura* triturada, extrato etanólico bruto, frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica das amostras 1 e 2. Na amostra 1 de própolis vermelha, o conteúdo de flavonoides totais que variaram de 17,2 – 65,0 mg QE 100g⁻¹ foi inferior ao conteúdo de fenólicos totais que variaram de 65,2 – 142,8 mg QAE 100g⁻¹ (Tabela 11). A maior quantidade de fenólicos totais foi encontrada na própolis *in natura* triturada (142,8 mg/g), seguida da fração acetato de etila (136,0 mg/g), fração hidroalcoólica (83,2 mg/g), extrato etanólico bruto seco (73,6 mg/g) e fração hexânica (65,2 mg/g).

Na amostra 2 de própolis vermelha, o conteúdo de flavonoides totais que variaram de 10,2 – 54,8 mg QE 100g⁻¹ foi inferior ao conteúdo de fenólicos totais que variaram de 53,4 – 191,4 mg QAE 100g⁻¹ (Tabela 11). A maior quantidade de fenólicos totais foi encontrada na fração acetato de etila (191,4 mg/g), seguida da fração hidroalcoólica (72,9 mg/g), fração hexânica (59,6 mg/g), *in natura* triturada (54,6 mg/g) e extrato etanólico bruto (53,4 mg/g).

Entretanto quando se observa os resultados do extrato etanólico bruto da amostra 1 (73,6 mg/g - 65,0 mg/g), fração hexânica da amostra 1 (65,2 mg/g – 62,5 mg/g) e própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 (54,6 mg/g – 45,7 mg/g), verifica-se que a quase totalidade dos compostos fenólicos presentes são compostos da classe dos flavonoides, possivelmente da classe dos flavonóis ou das flavonas, pois formaram complexos estáveis com o cátion alumínio e puderam ser determinados a 425 nm (MIHAI et al., 2012).

Tabela 11 - Fenólicos totais e flavonoides totais nas amostras 1 e 2 de própolis vermelha.

Amostras		Testes	
Amostra 1	Fenólicos totais	Flavonoides totais	
<i>In natura</i> triturada	142,8 ± 0,03	37,4 ± 0,03	
Extrato etanólico bruto	73,6 ± 0,00	65,0 ± 0,00	
Fração hexânica	65,2 ± 0,08	62,5 ± 0,01	
Fração acetato de etila	136,0 ± 0,06	54,3 ± 0,00	
Fração hidroalcoólica	83,2 ± 0,00	17,2 ± 0,03	
Amostra 2	Fenólicos totais	Flavonoides totais	
<i>In natura</i> triturada	54,6 ± 0,01	45,7 ± 0,00	
Extrato etanólico bruto	53,4 ± 0,00	28,8 ± 0,00	
Fração hexânica	59,6 ± 0,02	32,6 ± 0,02	
Fração acetato de etila	191,4 ± 0,07	54,8 ± 0,01	
Fração hidroalcoólica	72,9 ± 0,02	10,2 ± 0,01	

Fenólicos Totais: mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra.

Flavonoides Totais: mg de equivalentes de quercetina por g de amostra.

Os dados representam a média ± desvio padrão (n = 3).

Apesar do método colorimétrico para a determinação de flavonoides totais, através do cloreto de alumínio, ser rápido e prático, ele não é um método preciso, pois o efeito batocrômico da absorção causado pelo complexo com alumínio não é uniforme para todos os flavonoides. Isto porque, a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonoides ocorrem de forma diferente, dependendo do flavonoide. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (JURD, GEISSMAN, 1956). Desta forma, dependendo do padrão de substituição dos radicais de flavonoides os resultados podem ser sub ou super estimados.

Alencar et al. (2007) quantificou os compostos fenólicos totais de própolis vermelha do estado de Alagoas e mostrou que essa própolis possui o maior valor de compostos fenólicos totais encontrados (232 mg GAE/g), em comparação com os outros tipos de própolis brasileira e valor equivalente à própolis originária de *Populus sp.* Além disso, foi demonstrado que a fração clorofórmica da própolis vermelha apresentou duas vezes mais a quantidade de compostos fenólicos totais que a fração hexânica, mostrando a existência de compostos fenólicos de diferentes polaridades. E valores de flavonoides totais de 43 e 158 mg

QE/g, para o extrato etanólico e fração hexânica, respectivamente. Os valores de fenólicos totais foram superiores aos encontrados no nosso estudo, com exceção da fração acetato da amostra 2 que apresentou valor de fenólicos totais de 191,4 mg GAE/g. Porém, os nossos valores de flavonoides totais foram superiores aos encontrados pelos autores para algumas amostras: extrato etanólico (65,0 mg QE/g), fração hexânica (62,5 mg QE/g) e fração acetato (54,3 mg QE/g) da amostra 1, *in natura* (45,7 mg QE/g) e fração acetato (54,8 mg QE/g) da amostra 2 (Tabela 11).

Daugusch (2007) encontrou valor de flavonoides totais de 25 mg QE/g para o extrato etanólico de própolis vermelha. Valor inferior aos encontrados para 8 das 10 amostras avaliadas no nosso trabalho: própolis vermelha *in natura* (37,4 mg QE/g), extrato etanólico (65,0 mg QE/g), fração hexânica (62,5 mg QE/g) e fração acetato (54,3 mg QE/g) da amostra 1 e para a própolis vermelha *in natura* (45,7 mg QE/g), extrato etanólico (28,8 mg QE/g), fração hexânica (32,6 mg QE/g) e fração acetato (54,8 mg QE/g) da amostra 2 (Tabela 11).

Moraes (2007) encontrou valor de fenólicos totais de 99,7 mg GAE/g e valor de flavonoides totais de 25 mg QE/g para o extrato etanólico de própolis vermelha. O valor de fenólicos totais foi superior aos encontrados para o extrato etanólico (73,6 mg GAE/g) da amostra 1 e para o extrato etanólico (53,4 mg GAE/g) da amostra 2 de própolis vermelha estudada no presente trabalho (Tabela 11). Porém, foram inferiores aos encontrados para a própolis vermelha *in natura* (142,8 mg GAE/g), fração acetato (136,0 mg GAE/g) da amostra 1 e fração acetato (191,4 mg GAE/g) da amostra 2 estudada no presente trabalho (Tabela 11). No entanto, o valor de flavonoides totais foram inferiores aos encontrados para 8 das 10 amostras avaliadas no nosso trabalho, conforme citado acima (Tabela 11).

Cabral et al. (2009) quantificaram no extrato etanólico e na fração hexânica de própolis vermelha de Alagoas, para os fenólicos totais, valores de 257,98 e 154,83 mg GAE/100 g, respectivamente. Valores estes que são superiores aos encontrados no presente estudo tanto para o extrato etanólico assim como para a fração hexânica das amostras 1 e 2 de própolis vermelha de Igarassu - PE.

Moraes (2009) encontraram valores de fenólicos totais que variaram de 91 – 183 mg GAE/g e valores de flavonoides totais que variaram de 9 – 62 mg QE/g para o extrato etanólico de cinco amostras de própolis vermelha coletadas em diferentes épocas do ano. No nosso estudo foram encontrados valores de fenólicos totais que variaram de 53,4 – 191,4 mg GAE/g e valores de flavonoides totais que variaram de 10,2 – 65,0 mg QE/g.

Frozza et al. (2013) encontraram valor de fenólicos totais de 151,55 mg GAE/g para o extrato etanólico de própolis vermelha. Valor superior ao encontrado para o extrato etanólico da amostra 1 e 2 de própolis vermelha estudada no presente trabalho.

5.10 – Atividades Farmacológicas

5.10.1 Atividade Antimicrobiana

5.10.1.1 - Concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na tabela 12. A própolis vermelha *in natura* triturada e o extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2, apresentaram atividade inibitória sobre os doze microrganismos utilizados nos ensaios biológicos com CIM's de 256 µg/mL, que segundo Sartoratto et al. (2004) é considerada uma elevada atividade. As frações hexânica e acetato de etila de ambas as amostras, juntamente com a fração hidroalcoólica da amostra 1, apresentaram atividade inibitória sobre todos os microrganismos testados, com valores de CIM's que variaram entre 32 µg/mL e 1024 µg/mL. Estas frações apresentaram uma forte atividade fungistática, com todas elas exibindo um valor de CIM de 32 µg/mL para as seis leveduras testadas, exceto a fração hidroalcoólica da amostra 1 com CIM de 128 µg/mL sobre *C. tropicalis* ATCC 13803 e a fração acetato de etila da amostra 1 com CIM de 1.024 µg/mL sobre *C. tropicalis* LM 6. A fração hidroalcoólica da amostra 1 com CIM de 64 µg/mL sobre *C. tropicalis* LM 6 e a fração hidroalcoólica da amostra 2 que não apresentou atividade sobre nenhuma bactéria testada e foi ativa contra cinco das seis leveduras testadas com CIM de 32 µg/mL. A isoflavona formononetina, isolada da fração acetato de etila da amostra 1, foi ativa contra todos os microrganismos testados, com uma CIM de 200 µg/mL para as seis bactérias e uma CIM de 25 µg/mL para as seis leveduras, que segundo Sartoratto et al. (2004) é considerada uma elevada atividade.

Em relação a amostra 1 e 2 observa-se que ao longo do fracionamento houve um aumento no poder fungistático. Onde, a própolis *in natura* e extrato etanólico apresentou CIM de 256 µg/mL e as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica com CIM de 32 µg/mL para as seis leveduras testadas. Porém, o mesmo não foi observado em relação a atividade bacteriostática. Em relação a substância isolada, a formononetina apresentou uma maior atividade fungistática (CIM de 25 µg/mL) que bacteriostática (CIM de 200 µg/mL).

Embora, a literatura afirme que todas as pesquisas realizadas demonstraram que nenhum componente isolado tem uma atividade maior do que o extrato total inicial (MARCUCCI, 1996; KUJUMGIEV et al., 2000), foi observado no nosso estudo que a substância isolada formononetina demonstrou uma atividade maior.

Tabela 12 - Concentração inibitória mínima – CIM (µg/mL) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha.

Microrganismos	Amostra 1						Amostra 2				
Gram - Positivos	<i>In</i> <i>natura</i>	Extrato	Fr. Hex	Fr. AcOEt	Fr. HA	<i>In</i> <i>natura</i>	Extrato	Fr. Hex	Fr. AcOEt	Fr. HA	Formono netina
<i>S. aureus</i> ATCC 13150	256	256	512	512	1024	256	256	512	512	+	200
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	256	256	256	512	1024	256	256	512	512	+	200
<i>S. epidermides</i> ATCC 12228	256	256	128	512	1024	256	256	512	512	+	200
Gram - Negativos											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	256	256	128	512	1024	256	256	512	512	+	200
<i>P. aeruginosa</i> ATCC P-12	256	256	512	512	1024	256	256	512	512	+	200
<i>P. aeruginosa</i> ATCC P -03	256	256	256	128	1024	256	256	512	512	+	200
Leveduras											
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	256	256	32	32	32	256	256	32	32	32	25
<i>C. albicans</i> LM P-20	256	256	32	32	32	256	256	32	32	32	25
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	256	256	32	32	128	256	256	32	32	+	25
<i>C. tropicalis</i> LM 6	256	256	32	1024	64	256	256	32	32	32	25
<i>C. neoformans</i> ICB 59	256	256	32	32	32	256	256	32	32	32	25
<i>C. neoformans</i> LM 2601	256	256	32	32	32	256	256	32	32	32	25

(+): houve crescimento microbiano; (-): ausência de crescimento microbiana

Cabral (2008) ao estudarem a fração hexânica de própolis vermelha de Alagoas obtiveram uma CIM de 50 - 100 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, enquanto no nosso estudo obtivemos uma CIM maior que a encontrada pelos autores, CIM de 256 µg/mL para a fração hexânica da amostra 1 e uma CIM de 512 µg/mL para a fração hexânica da amostra 2 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cabral et al. (2009) observaram que o extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas apresentou atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com uma CIM de 62,5 – 125 µg/mL. Enquanto que a formononetina isolada no nosso trabalho, apresentou uma CIM de 200 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Mendonça et al. (2011) avaliou a influência da coloração de frações cromatográficas de própolis vermelha de Sergipe na atividade antimicrobiana de própolis vermelha de Brejo Grande – SE e observaram que dos 10 grupos de própolis estudados, apenas os grupos 1, 2 e 3 tiveram atividade sobre *Staphylococcus aureus*. Enquanto no nosso trabalho foi observado que duas amostras (1 e 2) de própolis vermelha estudadas tiveram atividade sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13150 e ATCC 25923.

Junior et al. (2012) ao avaliarem a atividade antimicrobiana da própolis vermelha de Alagoas, verificaram que o extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas (100%), gram-negativas (62,5%) e fúngicas (100%), com eficiência em 76,9% de todas as espécies testadas. Enquanto no presente trabalho, observou-se que a própolis vermelha *in natura* triturada e o extrato etanólico bruto da amostra 1 e 2 de Igarassu – PE apresentou 100% de atividade antimicrobiana contra todas as cepas gram-positivas, gram-negativas e fúngicas. Os autores ao analisarem as frações clorofórmica, acetanólica e hexânica observaram a atividade antimicrobiana em face de 92,3%, 100% e 76,9%, respectivamente, das espécies analisadas. Enquanto no nosso estudo observou-se que as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica da amostra 1 tiveram uma atividade antimicrobiana em face de 100%, 100% e 100%, respectivamente, das espécies analisadas. E as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica da amostra 2 tiveram uma atividade antimicrobiana em face de 100%, 100% e 41,6%, respectivamente, das espécies analisadas.

Finger et al. (2013) observaram que o extrato oleoso de própolis e as suas seis frações apresentaram uma CIM de 50-3.200 µg/mL sobre seis cepas de *Candida albicans*, enquanto as seis subfrações da fração 4 apresentaram uma CIM de 30 - 2.300 µg/mL sobre quatro cepas de *Candida albicans*. Os valores de CIM do extrato, das frações e das subfrações, obtidos pelos autores foram muito superiores aos valores de CIM encontrados no nosso estudo tanto para a própolis *in natura*, extrato, frações e substância isolada.

5.10.1.2 - Concentração bactericida mínima (CBM)

Apenas a fração acetato de etila da amostra 2 apresentou atividade bactericida, com uma CBM de 1.024 µg/mL contra quatro das seis bactérias testadas, não apresentando atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 13150 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cabral (2008) ao estudar o extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas – SE obtiveram uma CBM de 200 - 400 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Vitti et al. (2011) em seu estudo da atividade antimicrobiana da própolis vermelha contra patógenos endodônticos obtiveram uma CBM de 200 - 400 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Enquanto no nosso estudo a fração acetato de etila da amostra 2 apresentou atividade sobre quatro bactérias com uma CBM de 1.024 µg/mL, mas, não apresentou atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5.10.1.3 - Concentração fungicida mínima (CFM)

Os resultados da determinação da CFM são apresentados na tabela 13 (Página 156). Observa-se que apenas algumas amostras apresentaram atividade fungicida sobre as leveduras testadas. Destacando-se o extrato etanólico bruto e a fração acetato de etila da amostra 2 que foram ativos contra todas as leveduras testadas, com uma CFM de 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente. E a formononetina que apresentou atividade fungicida sobre cinco das seis leveduras, com uma CFM de 200 µg/mL, não apresentando atividade fungicida apenas sobre *C. neoformans* ICB 59.

A atividade antifúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por Ota et al. (2001) e Uzel et al. (2005). Diferentes métodos *in vitro* são usados para análise de extratos de própolis contra espécies de *Candida* (SAWAYA et al., 2002). A atividade antifúngica de extratos de própolis foram testadas *in vitro* usando-se *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (CHEE, 2002). A pinocembrina é conhecida por ter alta atividade antifúngica. Outros compostos ativos são ésteres de ácido cumárico e ácido caféico (DOBROWOLSKI et al., 1991).

Em relação aos controles utilizados nos testes de CIM, CBM e CFM, pode-se observar que: houve crescimento microbiano nos controles feitos com DMSO e micro-organismo e não houve crescimento nos controles feitos com clorafenicol (100 µg/mL) usado para bactérias e nistatina (100 UI/mL) usado para leveduras.

Tabela 13 - Concentração fungicida mínima – CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha.

Microrganismos		Amostra 1					Amostra 2				
Leveduras	<i>In natura</i>	Extrato	Fr. Hex	Fr. AcOEt	Fr. HA	<i>In natura</i>	Extrato	Fr. Hex	Fr. AcOEt	Fr. HA	Formononetina
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	+	+	1.024	1.024	+	+	256	1.024	512	+	200
<i>C. albicans</i> LM P-20	+	+	+	64	+	+	256	1.024	512	+	200
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	+	+	1.024	1.024	1.024	+	256	256	128	+	200
<i>C. tropicalis</i> LM 6	+	+	+	+	+	+	256	+	512	+	+
<i>C. neoformans</i> ICB 59	+	+	256	+	+	+	256	1.024	512	+	200
<i>C. neoformans</i> LM 2601	+	+	+	+	+	+	256	+	512	+	200

(+): houve crescimento microbiano (-): ausência de crescimento microbiano

5.10.2 – Atividade Antioxidante

5.10.2.1 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) - Determinação da CE₅₀

O radical DPPH^{*} é muito usado para se avaliar a capacidade sequestradora de produtos apícolas (LIANDA et al., 2012). O radical livre DPPH^{*} é um cromóforo extremamente estável que apresenta uma banda de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio alcoólico e possui uma coloração violeta intensa. Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron torna-se emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995). Diferenças entre os resultados da atividade antioxidante podem acontecer por diversas causas, como concentração da amostra e método de determinação (sequestro de radicais ou oxidação lipídica, tempo de reação e solvente utilizado) (MOURE et al., 2001). A determinação da atividade antioxidante também poder ser influenciada pela afinidade dos antioxidantes e o método do DPPH tem se mostrado vantajoso, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato (KOLEVA et al., 2002).

As atividades de radicais livres das amostras 1 e 2 de própolis vermelha estão resumidas na tabela 14, expressas em DPPH - CE₅₀, variou de 17,61 – muito superior a 200 µg/mL⁻¹. A capacidade antioxidante foi alta e amplamente diferiu entre as amostras estudadas. A menor atividade de sequestro foi encontrada para a substância isolada, a isoflavona formononetina (muito superior a 200 µg/mL⁻¹), enquanto que a maior atividade de sequestro foi encontrada para a fração hexânica da amostra 2 (17,61 µg/mL⁻¹).

Em ordem decrescente, em relação ao poder antioxidante, conforme mostra a tabela 13, as amostras se comportaram da seguinte maneira: fração hexânica da amostra 2 (17,61 µg/mL⁻¹), fração hexânica da amostra 1 (19,70 µg/mL⁻¹), fração acetato da amostra 2 (21,29 µg/mL⁻¹), fração acetato da amostra 1 (24,33 µg/mL⁻¹), *in natura* bruta triturada da amostra 1 (25,18 µg/mL⁻¹), *in natura* bruta triturada da amostra 2 (26,87 µg/mL⁻¹), extrato etanólico bruto da amostra 1 (32,91 µg/mL⁻¹), extrato etanólico bruto da amostra 2 (52,91 µg/mL⁻¹), fração hidroalcoólica da amostra 2 (60,22 µg/mL⁻¹), fração hidroalcoólica da amostra 1 (61,08 µg/mL⁻¹), substância isolada formononetina (muito superior a 200 µg/mL⁻¹).

Alencar et al. (2007) verificaram em seu estudo com própolis vermelha, que a fração hexânica apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres, pelo método DPPH, em relação ao extrato etanólico e a fração clorofórmica. Cabral et al. (2009) demonstraram que a própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e que o fracionamento

produziu sub frações biologicamente mais ativas que as frações e o extrato etanólico de própolis. A fração hexânica apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres (74,4%) em relação ao extrato etanólico de própolis e a fração clorofórmica, o que pode ser explicado pelo alto potencial das substâncias antioxidantes presentes. Foi demonstrada que a atividade antioxidante da própolis vermelha não é função de um efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto. Estes resultados encontrados pelos dois autores, corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde a fração hexânica da amostra 1 e 2 apresentaram a maior atividade antioxidante, pelo método DPPH, em relação a própolis *in natura*, extrato etanólico, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica.

A CE_{50} do extrato etanólico bruto da amostra 1 ($32,91 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e extrato etanólico bruto seco da amostra 2 ($52,91 \mu\text{g/mL}^{-1}$) apresentada no presente estudo, foram superiores a CE_{50} do extrato etanólico de própolis vermelha, encontrada por Pinheiro et al. (2009) e Frozza et al. (2013), $294 \mu\text{g/mL}$ e $270 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5.10.2.2 – Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical-cátion ABTS $^{*+}$ [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamónio] e pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

As capacidades de radicais livres das amostras 1 e 2 de própolis vermelha também foram avaliadas em sistemas de reações ABTS $^{*+}$ e FRAP. Todas as amostras exibiram potencial de sequestro para ambos os radicais, com exceção da formononetina que para o teste de ABTS $^{*+}$ apresentou-se abaixo do limite de detecção.

O intervalo de valores observado para o radical ABTS $^{*+}$ foi de 45,59 - abaixo do limite de detecção mmol de Trolox por 100 mg. A menor atividade de limpeza foi encontrada para a substância isolada, a isoflavona formononetina (abaixo do limite de detecção), enquanto que a maior atividade de limpeza foi encontrada para extrato etanólico bruto da amostra 2 (45,59 mmol de Trolox/100 mg).

O intervalo de valores do radical FRAP foi de 81,68 - 380,26 mmol de Fe (II) por 100 mg. A menor atividade de limpeza foi encontrada para o extrato etanólico bruto da amostra 2 (380,26 mmol de Fe (II) / 100 mg), enquanto que a maior atividade de limpeza foi encontrada para a fração hidroalcoólica da amostra 1 (81,68 mmol de Fe (II) / 100 mg).

Tabela 14 - Avaliação da atividade antioxidante de própolis vermelha.

Amostras		Testes	
Amostra 1	DPPH	ABTS	FRAP
<i>In natura</i> triturada	25,18 ± 0,35	92,02 ± 0,01	276,09 ± 0,00
Extrato etanólico bruto	32,91 ± 0,01	45,88 ± 0,02	363,59 ± 0,00
Fração hexânica	19,70 ± 0,20	63,88 ± 0,02	292,48 ± 0,01
Fração acetato de etila	24,33 ± 0,30	66,54 ± 0,02	315,71 ± 0,15
Fração hidroalcoólica	61,08 ± 0,10	60,75 ± 0,02	81,68 ± 0,01
Amostra 2			
<i>In natura</i> triturada	26,87 ± 1,07	75,87 ± 0,01	275,07 ± 0,00
Extrato etanólico bruto	52,91 ± 0,00	45,59 ± 0,00	380,26 ± 0,00
Fração hexânica	17,61 ± 0,20	54,53 ± 0,03	272,91 ± 0,05
Fração acetato de etila	21,29 ± 0,13	70,78 ± 0,01	214,01 ± 0,02
Fração hidroalcoólica	60,22 ± 0,13	58,94 ± 0,04	85,70 ± 0,00
Substância isolada			
Formononetina	muito superior a 200	abaixo do limite de detecção	225,52

DPPH (CE₅₀): µg/mL

ABTS: mmol de Trolox por 100 mg de extrato

FRAP: mmol de Fe (II) por 100 mg de extrato

Os dados representam a média ± desvio padrão (n = 3).

5.10.3 – Atividade Antileishmania

A leishmaniose é uma doença causada por várias espécies do parasita *Leishmania*. Estima-se em mais de um milhão o número anual de casos desta parasitose no mundo e em quarenta mil notificações no Brasil. A *Leishmania amazonensis*, espécie utilizada no trabalho, é intracelular, vivendo em macrófagos do hospedeiro, e causa lesões cutâneas de difícil cicatrização que podem evoluir para a leishmaniose cutânea difusa. Esta espécie de *Leishmania* é encontrada principalmente na região norte do Brasil e em vários países da América do Sul. A quimioterapia é a única forma de controle das lesões. Não há vacinas de uso comercial contra leishmanioses. As drogas utilizadas na quimioterapia são os antimoniais pentavalentes tais como glucantime e pentamidina, que causam efeitos colaterais como cardio, nefro e hepatotoxicidade (AYRES, MARCUCCI, GIORGIO, 2007).

Própolis é uma resina produzida pelas abelhas para vedar e esterilizar colmeias e tem sido objeto de estudo há vários anos. Além disso, a própolis é utilizada há séculos na medicina popular e a falta de efeitos colaterais nos diversos tratamentos indica a sua inocuidade. As suas propriedades antissépticas, cicatrizantes e anti-inflamatórias têm sido pesquisadas. A ação da própolis juntamente com sua inocuidade na população em geral que faz uso desta como preventivo de doenças e a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose são as principais razões que nos levaram a avaliar o efeito da própolis vermelha brasileira no modelo *in vitro* da leishmaniose.

As amostras 1 e 2 de própolis vermelha *in natura* triturada e extrato etanólico bruto apresentaram atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* PH8 (IFLA//BR/67/PH8) em todas as concentrações avaliadas (Gráficos 1 e 2). Analisando os dados da taxa de inibição de crescimento, foi observado que, a partir da menor concentração avaliada (6,25 µg/mL) existiu uma redução significativa no crescimento dessa cultura quando comparados ao controle (0% inibição) conforme apresentados na tabela 15. O aumento das concentrações induziu um aumento na inibição do crescimento das culturas, de forma dose dependente, tanto na própolis *in natura* quanto no extrato e em ambas as amostras testadas.

Em relação à amostra 1 de própolis vermelha, pode-se observar que a própolis *in natura* triturada apresentou maior atividade antipromastigota em todas as concentrações testadas quando comparada com o extrato etanólico bruto (Gráfico 1). A própolis *in natura* triturada e o extrato etanólico bruto apresentaram uma CI_{50} de 9,00 µg/mL e 12,65 µg/mL, respectivamente (Tabela 16). A própolis *in natura* triturada teve maior taxa de inibição de crescimento quando comparada com o extrato à medida que a concentração avaliada era aumentada (Tabela 15). Foi observado que a amostra *in natura* triturada apresentou atividade antipromastigota sobre a espécie de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações testadas de 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, de maneira dose dependente, apresentando uma taxa de inibição de crescimento de 39,41%; 63,73%; 90,20%; 91,47%; 95,77% e 99,56%, respectivamente, quando comparados ao controle (0% de inibição).

O extrato etanólico bruto também apresentou atividade antipromastigota sobre a espécie de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações testadas de 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, de maneira dose dependente, apresentando uma taxa de inibição de crescimento menor que a da própolis *in natura* triturada, de 21,87%;

62,00%; 80,87%; 83,10%; 88,10%; 96,18% respectivamente, quando comparados ao controle (0% de inibição).

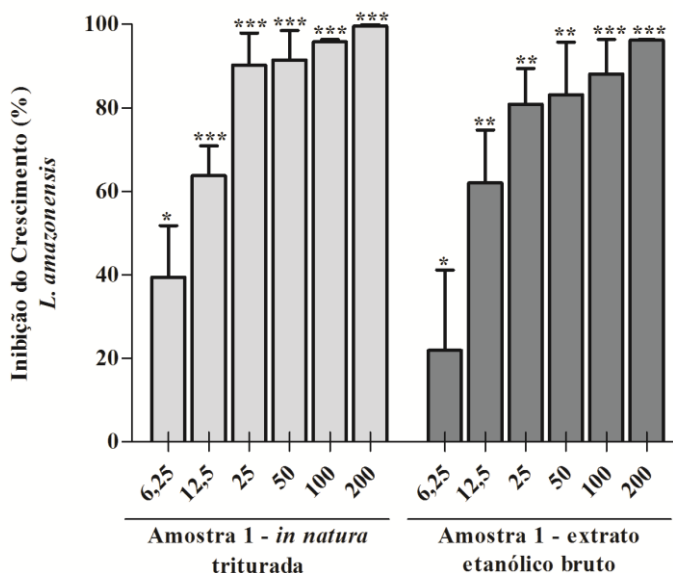


Figura 70 - Inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações (µg/mL) da própolis vermelha *in natura* triturada e do extrato etanólico bruto da amostra 1. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a $25^\circ\text{C} \pm 1$ na presença da amostra avaliada. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0,005$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle).

Enquanto em relação a amostra 2 de própolis vermelha, pode-se observar que o extrato etanólico bruto apresentou maior atividade antipromastigota em todas as concentrações testadas quando comparada com a própolis *in natura* triturada, exceto na concentração de 12,5 µg/mL (Gráfico 2). A própolis *in natura* triturada e o extrato etanólico bruto apresentaram uma CI_{50} de 6,43 µg/mL e 10,86 µg/mL, respectivamente (Tabela 16). O extrato etanólico bruto teve maior taxa de inibição de crescimento quando comparada com a própolis *in natura* bruta triturada à medida que a concentração avaliada era aumentada, exceto na concentração de 12,5 µg/mL (Tabela 15).

Foi observado que o extrato etanólico bruto apresentou atividade antipromastigota sobre a espécie de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações testadas de 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, de maneira dose dependente,

apresentando uma taxa de inibição de crescimento de 49,51%; 68,00%; 89,21%; 92,55%; 98,52% e 100% respectivamente, quando comparados ao controle (0% de inibição). A própolis *in natura* também apresentou atividade antipromastigota sobre a espécie de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações testadas de 6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL e 200 µg/mL, de maneira dose dependente, apresentando uma taxa de inibição de crescimento menor que a do extrato, de 23,01%; 71,16%; 86,39%; 87,58%; 97,02% e 100%, respectivamente, quando comparados ao controle (0% de inibição).

Os medicamentos Glucantime® e Anfotericina B® foram utilizados com drogas de referência neste ensaio, visto que são os medicamentos de primeira e segunda escolha no tratamento das leishmanioses no Brasil, respectivamente (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). Foi observado que a Anfotericina B® apresentou atividade antipromastigota sobre a espécie *L. amazonensis*, nas concentrações testadas de 0,1; 0,2 e 0,3 µg/mL, de maneira dose dependente, apresentando uma taxa de inibição de crescimento de $35,76 \pm 5,01$; $81,01 \pm 9,8$ e $93,71 \pm 5,72\%$, respectivamente, quando comparados ao controle. No entanto, a análise do medicamento Glucantime® revelou que existiu inibição significativa de $38,05 \pm 13,76$ µg/mL apenas na maior concentração testada, de 8000 µg/mL, quando comparadas ao controle.

Ayres, Marcucci e Giorgio (2007) investigaram o efeito do extrato de própolis coletado no Estado de Alagoas (própolis vermelha) sobre formas promastigotas e formas amastigotas *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesão da espécie. As formas promastigotas e amastigotas, foram incubadas com 25 µg/mL de própolis e o número de parasitas e a morfologia foram avaliados. Até o período de 96 horas, os autores não observaram alteração na proliferação tanto das formas promastigotas como das formas amastigotas, portanto este extrato não se mostrou eficiente diretamente contra tais formas. Contudo, quando os autores utilizaram este extrato em culturas de macrófagos murinos (camundongos BALB-c) infectados com *L. amazonensis*, houve diminuição tanto na porcentagem de macrófagos infectados como no número de amastigotas no interior dos macrófagos.

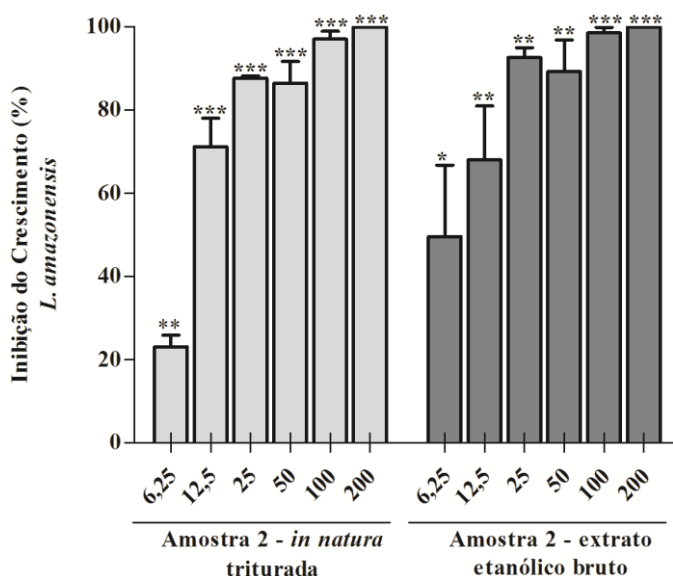


Figura 71 - Inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da própolis vermelha *in natura* triturada e do extrato etanólico bruto da amostra 2. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a $25^\circ\text{C} \pm 1$ na presença da amostra avaliada. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0,005$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle).

Tabela 15 - Taxa de inibição (%) da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Amostras	Concentrações (µg/mL)					
Amostra 1	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>In natura</i> triturada	39,41%	63,73%	90,20%	91,47%	95,77%	99,56%
Extrato etanólico bruto	21,87%	62,00%	80,87%	83,10%	88,10%	96,18%
Amostra 2						
<i>In natura</i> triturada	23,01%	71,16%	86,39%	87,58%	97,02%	100%
Extrato etanólico bruto	49,51%	68,00%	89,21%	92,55%	98,52%	100%

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a $25^\circ\text{C} \pm 1$ na presença da amostra avaliada. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Tabela 16 - Concentração inibitória ($\mu\text{g/mL}$) de 50% do crescimento (CI_{50}) das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença da amostra 1, 2 e da formononetina de própolis vermelha.

Amostra 1	<i>Leishmania amazonensis</i> CI_{50} ($\text{M} \pm \text{e.p.m.}$)
<i>In natura</i> triturada	9,00 $\mu\text{g/mL}$
Extrato etanólico bruto	12,65 $\mu\text{g/mL}$
Amostra 2	
<i>In natura</i> triturada	10,86 $\mu\text{g/mL}$
Extrato etanólico bruto	6,43 $\mu\text{g/mL}$
Drogas de referência	
Anfotericina B [®]	0,13 $\mu\text{g/mL}$
Glucantime [®]	> 8,0 mg/mL

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a $25^\circ\text{C} \pm 1$ na presença da amostra avaliada. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados.

5.10.4 – Atividade Antileucêmica

A citotoxicidade da própolis foi comprovada tanto em animais quanto em estudos *in vitro*. Foi observado que a atividade anti-tumoral da própolis de *Baccharis dracunculifolia* está intimamente relacionado com a substância Artepillin C, e a atividade citotóxica que resultaram em apoptose de células cancerosas por fragmentação de DNA (KIMOTO et al., 1998). Outras hipóteses do mecanismo antitumoral da própolis sugerem que essa atividade pode estar associada com a ativação na produção de linfócitos e a subsequente estimulação do sistema imune associado com a inibição da peroxidação lipídica (KIMOTO et al., 2001).

A cultura celular foi tratada e mantida com as amostras durante 24 e 72 horas. A citotoxicidade de cada amostra de própolis foi medida através de 3 repetições para cada uma das 2 leucemias testadas (Leucemia mielóide crônica humana - K562 e Leucemia promielocítica aguda - HL60). O experimento foi realizado com 7 concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$).

As amostras 1 e 2 de própolis vermelha apresentaram atividade sobre as duas leucemias testadas, em todas as concentrações avaliadas. Analisando os valores da CI_{50} (Tabela 17), observa-se que, a longo do fracionamento existiu um aumento significativo na atividade, com exceção da fração hidroalcoólica tanto da amostra 1 quanto da amostra 2, que

não apresentou atividade para as duas linhagens celulares testadas, no tempo de 24 horas. Observa-se também, que com o aumento do tempo de tratamento, de 24 para 72 horas, houve um aumento na atividade em todas as amostras testadas para as duas linhagens avaliadas.

As própolis verde (grupo 12) de *Baccharis dracunculifolia* e própolis vermelha (grupo 13) de *Dalbergia ecastaphyllum* apresentaram atividade antiproliferativa em tumor maligno primário (RC-58T/h/SA#4) derivados de células de câncer prostático humano e células epiteliais prostáticas humanas. A inibição mais forte de células RC-58T/h/SA#4 foi observada no extrato de própolis de *Dalbergia ecastaphyllum*, enquanto que foi observada inibição de crescimento moderado em células epiteliais prostáticas humanas utilizando-se a própolis de *Baccharis dracunculifolia* (MORAES et al., 2010).

Tabela 17 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células HL-60 e K562 com a amostra 1, 2 e a formononetina de própolis vermelha por um período de 24 h e 72 h.

Amostra 1	HL-60		K562	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<i>In natura</i> triturada	176,3 \pm 1,3	50,19 \pm 1,4	116,4 \pm 1,1	68,80 \pm 1,2
Extrato etanólico bruto	108,2 \pm 1,4	59,32 \pm 1,7	178,9 \pm 1,3	92,26 \pm 1,5
Fração hexânica	30,08 \pm 3,4	21,29 \pm 3,3	94,64 \pm 3,3	76,60 \pm 3,5
Fração acetato de etila	32,69 \pm 3,5	23,10 \pm 3,5	96,86 \pm 3,2	47,66 \pm 3,2
Fração hidroalcoólica	> 400	> 100	> 400	> 200
Amostra 2				
<i>In natura</i> triturada	149,6 \pm 1,3	72,19 \pm 1,7	170,1 \pm 1,4	60,02 \pm 1,1
Extrato etanólico bruto	167,7 \pm 1,6	36,04 \pm 1,5	69,28 \pm 1,4	56,15 \pm 1,1
Fração hexânica	20,30 \pm 4,2	27,56 \pm 3,2	> 100	67,26 \pm 3,4
Fração acetato de etila	31,32 \pm 3,6	18,41 \pm 3,3	93,56 \pm 3,4	43,41 \pm 3,2
Fração hidroalcoólica	> 400	> 200	> 400	> 200
Substância isolada				
Formononetina	42,25 \pm 3,4	20,67 \pm 3,2	não tem efeito	71,22 \pm 3,2
Droga de referência				
Etoposide	6,5 \pm 4,2	1,8 \pm 3,6	>100	44,56 \pm 3,8

Os dados foram obtidos usando curva de regressão não-linear e representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Franchi Junior et al. (2012) em seu estudo sobre efeitos comparativos de extratos etanólicos de própolis brasileira em células leucêmicas humanas por teste de MTT, concluíram que: a própolis do quimiotipo G13 (própolis vermelha) é mais citotóxica que a própolis G12, mas, que o estudo não tem a pretensão de indicar a própolis G13 para tratamento de leucemias em humanos. E que a própolis G13 é capaz de induzir a apoptose em modelos de leucemias humana após incubação *in vitro*, mostrando resultados importantes para futuros ensaios pré-clínicos em animais com leucemia e reforçando a necessidade de estudos químicos para localizar uma possível substância citotóxica útil presente em própolis G13.

No nosso trabalho, pode-se observar que a substância isolada formononetina, apresentou atividade para as duas leucemias estudadas nos dois tempos em que foi avaliada, só não apresentando efeito sobre K562 no período de 24 horas.

CONCLUSÕES GERAIS

6 – CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- De acordo com a análise palinológica podemos observar que os tipos polínicos que apareceram em maior frequência foram: *Serjania* e *Dalbergia* (amostra 1 – abril de 2011), Fabaceae 1 e *Dalbergia* (amostra 2 – abril de 2011) e *Stigmaphyllon* (amostra 1 e 2 – maio de 2012), o que sugere que há mais de uma espécie de planta como fonte de resina para a própolis vermelha de Igarassu-PE, e a contribuição relativa de cada espécie varia sazonalmente;
- O perfil químico das amostras de própolis vermelha de Igarassu-PE identificados por CLAE-EM são caracterizados como o tipo de própolis vermelha definido pelo seu teor de benzofenonas;
- Observa-se que ao longo do fracionamento, partindo da própolis *in natura* triturada até a substância isolada formononetina, há uma atividade bacteriostática e fungistática. Além disso, a formononetina apresentou atividade fungicida;
- Em relação a atividade antioxidante, medida pelo método de DPPH, observou-se que as amostras mais apolares tiveram maior atividade que as amostras polares;
- Tanto a própolis *in natura* triturada quanto o extrato etanólico bruto apresentaram forte atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- A atividade antileucêmica também aumentou ao longo do fracionamento, sobre a linhagem celular HL-60.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABSY, M. L.; KERR, W. E. Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de *Melípona seminigra* em Manaus. **Acta Amazônica**, v. 16/17, p. 145 - 156, 1977.
2. ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. 2005. 186 p.
3. AHN, M.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of china. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1400 – 1409, 2007.
4. ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Tese de Doutorado. Faculdade de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2002.
5. ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUZMÁN, J. P.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909 – 915, 2005.
6. ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA – NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278 – 283, 2007.
7. ALLIGIANAIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168 - 4170, 2001.
8. ANDRADE, N. P. C.; DA SILVA, E. M. S.; MOTA, R. A.; VESCHI, J. L. A.; RIBEIRO, M. F.; KREWER, C. C.; DA COSTA, M. M. atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arq. Inst. Biol.**, v.79, n.1, p. 9-15, 2012.
9. AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEKUZA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC – 1 cancer cell line in nutrient – deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 181 – 189, 2008.
10. AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 215 - 220, 2007.

11. AYRES, D. C.; FEDELE, T. A.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 53, n. 6, p. 329-334, 2011.
12. BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S., PUREB, O. e BOCARI, G. Volatile constituents of propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 6-10, 1994.
13. BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
14. BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114 – 117, 2005 (a).
15. BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (ECAM)**, v. 2, n. 1, p. 29 - 32, 2005 (b).
16. BANSKOTA, A.H., NAGAOKA, T., SUMIOKA, L.Y., TEZUKA, Y., AWALE, S., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 67-73, 2002.
17. BARTH, O. M. Pollen analysis of Brazilian propolis. **Grana**, v. 37, p. 97 - 101, 1998.
18. BARTH, O. M., DUTRA, V. M. L.; JUSTO, R. L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, v. 29, p. 663 - 667, 1999.
19. BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Sci. Agri**, v. 61, p. 342 – 350, 2004.
20. BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TTURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, P. 493 - 496, 1966.
21. BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822–828, 2007.
22. BOSIO, K., AVANZINI, C., D'AVOLIO, A., OZINO, O. e SAVOIA, D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.
23. BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, v. 28, 1995.

24. Boletim Agronegócio SEBRAE, acessado em 27/08/2014 em http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf.
25. BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.
26. CABRAL, I S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 95p. (Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”). 2008.
27. CABRAL, I S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante de própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p.1523 - 1527, 2009.
28. CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição química fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, 2007.
29. CASTALDO, S. e CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. suppl. 1, p. S1-S6, 2002.
30. CHECHINEL, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, 1998.
31. CHEE, H.Y. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus Neoformans* and *Candida albicans*. **Mycobiology**, v. 30, p. 93-95, 2002.
32. CHEN, Y.-J., SHIAO, M.-S., HSU, M.-L., TSAI, T.-H. e WANG, S.-Y. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human Leukemic HL-60 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615-5619, 2001.
33. CHOI, Y.M., NOH, D.O., CHO, S.Y., SUH, H.J., KIM, K.M. e KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food Science and Technology Research**, v. 39, n. 7, p. 756-761, 2006.
34. CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
35. COLINVAUX, P.; DE OLIVEIRA, P. E.; PATIÑO, J. E. M. **Manual e atlas palinológico da Amazônia**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 1999.

36. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279 p.
37. CUSTÓDIO, A. R.; CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C.; MORAIS, L. A. Extração líquido-líquido de compostos presentes na própolis. **LECTA: Revista de Farmácia e Biologia**, v. 18, n. 2, p. 55 – 64, 2000.
38. DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 144p. 2007.
39. DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (ECAM)**, p. 1 -7, 2007.
40. DA SILVA, J. F. M.; SOUXA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431 – 435, 2006.
41. DASTIDAR, S.G., MANNA, A., KUMAR, K.A., MAZUMDAR, K., DUTTA, N.K., CHAKRABARTY, A.N., MOTOHASHI, N. e SHIRATAKI, Y. Studies on the antibacterial potenciality of isoflavones. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 99-102, 2004.
42. DEWIC, P. M. The biosynthesis os shikimate etabolites. **Natural products Report**, v. 15, n. 1, p. 15 – 58, 1998.
43. DOBROWOLSKI, J. W., VOHORA, S. B., SHARMA, K., SHAH, S. A., NAQVI, S. A. H.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.
44. DOS SANTOS, L. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 supl., p. 71 – 74, 2003.
45. DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions glucosyltransferases and on growth and adherence of mutan streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527 – 531, 2003.
46. DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P. RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

- da Baixa maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557 - 562, 2008.
47. ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1978.
 48. ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskr**, v. 54, p. 561 – 564, 1960.
 49. EVANS, W. C. Farmacognosia Trease y Evans. Mexico: Interamericana McGraw-Hill, 1989.
 50. FINGER, D.; MACHADO, C. S.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P.; THOMAZ, A. C. G.; GOBBO, A. R.; MONTEIRO, M. C.; FERREIRA, A. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. **Journal of Food Quality**, v. 36, p. 291-301, 2013.
 51. FRANCHI JR, G. C.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of Effects of the ethanolic Extracts f Brazilian Propolis n Human Leukemic Cells as Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complemetary and Alternative Medicine (ECAM)**, 2012.
 52. FRANCO, S. L.; BRUSCH, M. L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. P. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, p. 1 - 10, 2000.
 53. FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 343 - 354, 2010.
 54. FREITAS, A. da S. de; BARTH, O. M.; SALES, E. de O.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. A palynological analysis of Brazilian propolis samples. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n. 2, p. 67 – 74, 2011.
 55. FROZZA, C. O. da S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O. de; 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 própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.
 56. FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C. A.; DE E LANÇAS, F. M. **Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity**. In: New Jersey: Humana press, p. 203-218, 2004.

57. FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171 – 178, 2006.
58. FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 153 – 159, 1981.
59. GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histologie normale et pathologique**. Paris: Gauthier – Villaris. v. I e II, 1969/1970.
60. GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59 - 84, 1979.
61. HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAZI, M.; CURY, J. A. In vitro and in vivo of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 110-115, 2005.
62. HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.
63. HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. New Delhi: Springer (India) Pvt.Ltd, 2005. HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
64. HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.
65. HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 276 – 283, 2005.
66. JIN, U. H. CHUNG, T. W.; KANG, S. K.; SUH, S. J.; KIM, J. K.; CHUNG, K. H.; GU, Y. H.; SUZUKI, I.; KIM, C. H. Caffeic acid pheyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase – 9 and invasion inhibitor: isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, p. 57 – 64, 2005.
67. JHA, H. C.; ZILLIKEN, F.; BREITMAIER, E. Carbon – 13 chemical shift assignments of chromones and isoflavones. **Journal Chemistry**, v. 58, p. 1211, 1980.
68. JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. Bombay: Tata McGraw-Hill Book Company. 1940.

69. JONES, G. D.; BRYANT, JR. V. M. Melissopalynology. In Jansonius, J.; McGregor, D. C. (Ed.) **Palynology: principles and applications** (pp. 933-938). American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation. 1996.
70. JUNIOR, W. B.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.
71. JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395 – 1401, 1956.
72. KAMINSKI, A. C.; ABSY, M. L. Bee visitors of three species of *Clusia* (Clusiaceae) flowers in Central Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 259 – 264, 2006.
73. KIMOTO, T.; CHAEN, H.; KURIMOTO, M. **Apoptosis – controlling agente. US Patent, 5.830.914**, 1998.
74. KIMOTO, T., KOYA-MIYATA, S., HINO, K., MICALLEF, M.J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M. e KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin C. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 438, n. 3, p. 259- 270, 2001.
75. KHAMSAN, S.; LIAWRUANGRATH, S.; TEERAWUTKULRAG, A.; PYNE, S. G.; GARSON, M. J.; LIAWRUANGRATH, B. The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. ssp. *rhombifolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. **Acta Pharm.**, v. 62, p. 181 – 190, 2012.
76. KOLEVA, T. A.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. **Phytochemistry Anal**, v. 13, p. 8 – 17, 2002.
77. KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997.
78. KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302 – 1309, 2002.
79. KOKATE, C. K. **Practical Pharmacognosy**. New Delhi: Vallabh Prakashan Publication, 1999.
80. KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R. e POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.

81. KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329 – 339, 2004.
82. LEE, K. W.; LEE, H. J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress – mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 5, p. 424 – 431, 2006.
83. LI, F.; AWALE, S.; TEKUZA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure – activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 181 – 189, 2008.
84. LIANDA, R. L. P.; SANT'ANA, L. D'O.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R. N. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 618 - 627, 2012.
85. LÓPEZ, B., G-C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174 – 180, 2014.
86. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. vol.1, 4.ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2002 a.
87. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. vol.2, 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002b.
88. LUSTOSA, S. R.; NETO, P. J. R.; GALINDO, A. B.; LÍVIO, C. C.; RANDAU, K. P. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 447 - 454, 2008.
89. LUZ, C. F. P.; BARTH, O. M.; CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; CRUZBARROS, M. A. V.; GUIMARÃES, M. I. T. M.; CORREA, M. A. S. Origem botânica do mel e derivados apícolas e o controle de qualidade. In: Barbosa, L.M. & Santos Junior, N.A. (orgs). *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas ambientais*. Sociedade Botânica do Brasil, São Paulo, pp.1680, 2007.
90. LUZ, C. F. P., BARTH, O. M., BACHA-JÚNIOR, G. L. Análise palinológica de propolis vermelha do Brasil: Subsidio da certificação da sua origem botânica e geográfica. **Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Europeias (APACAME)**, v. 102, p. 10 - 15, 2009.
91. MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in root of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, p. 2423-2436, 1974.

92. MACHADO, G. M.; LEON, L. L.; DE CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of leishmania. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 73–77, 2007.
93. MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538–544, 1998.
94. MATOS, V. R. **Caracterização química e palinológica da própolis produzida no litoral norte do estado da Bahia**. Dissertação De Mestrado. Universidade estadual de feira de santana. 63 p. 2012.
95. MACIEJEWICZ, W. Isolation of flavonoids aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC – MS and TLC methods. **Journal of Liquid Chromatography and related Technologies**, v. 24, n. 8, p. 1171 – 1179, 2001.
96. MANI, F.; DAMASCENO, H. C. R.; NOVELLI, E. L. B.; SFORCIN, J. M. Propolis: effect of diferente concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal Ethnopharmacology**, v. 105, p. 95 – 98, 2006.
97. MATSUDA, A. H.; MACHADO, L. B.; MASTRO, N. L. DEL. Thermal analysis applied to irradiated própolis. **Radiation physics and chemistry**, v. 63, p. 353 – 355, 2002.
98. MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 1, p. 83 – 89, 1995.
99. MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-535, 1996.
100. MARCUCCI, M.C., WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias (APACAME)**, v. 46, p. 3-8, 1998.
101. MELLIU, E.; STRATIS, E.; CHINOU, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 103, p. 375 – 380, 2007.
102. MENDONÇA, L. S.; MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; S. C. ORELLANA; J. C. CARDOSO; E. D. ARAÚJO. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 10, p. 1 – 6, 2011.
103. MENEZES, L. F. T.; ARAÚJO, D. S. D. Regeneração e riqueza da formação arbustiva de Palmae em uma cronosequência pós-fogo na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Act. bot. bras.**, v. 18, p. 771 – 780, 2004.

104. MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 72, n. 3, p. 405 – 411, 2005.
105. MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
106. MIHAI, C. M.; MĂRGHITAȘ, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; CHIRILĂ, F.; MORITZ, R. F.; SCHLÜNS, H. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 68–72, 2012.
107. MILITAO, G. C. G.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; PESSOA, C.; FALCAO, M. J. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antimitotic properties of pterocarpanes isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 683 – 685, 2005.
108. MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; WU, N. W.; BEAL, J. L.; WHITW, R. Antibacterial agents from higher plants I: Introduction, rationale and methodology. **Llodya**, v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972.
109. MORAES, C. S. **Estudo comparativo de diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 131p. 2007.
110. 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 de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 188p. 2009.
111. MORAES, C. S., DAUGSCH, A., LI, H., RHIM, J. S. e PARK, Y. K. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 539 – 543, 2010.
112. MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 2001, 72, 145.
113. NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ – VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim – do – Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379 – 386, 2008.

114. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.
115. NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DE DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. C.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; NETO, P. J. R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2B, p. 524 – 529, 2009.
116. ODA, J. M. M.; FUJITA, T. C.; PITZ, A. DE F.; AMARANTE, M. K.; FELIPE, I.; SARIDAKIS, H. O.; SFORIN, J. M.; WATANABE, M. A. E.; COSTA, I. C. Propolis extract action in *Leishmaniasis*, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 111-121, 2011.
117. OLIVEIRA, P. P. **Análise palinológica de amostras de mel de *Apis mellifera* L. produzida no estado da Bahia**. Feira de Santana, BA: UEFS Grad. Progr. Bot., PhD. Diss. 2009.
118. OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelha a espécie *Apis mellifera***. 2007, 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
119. ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005.
120. ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Peroral application of watersoluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. **Veterinary research communications**, v. 29, n. 7, p. 575-593, 2005.
121. OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, p.375-378, 2001.
122. OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742 – 747, 2005.
123. PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720 - 2722, 2002.

124. PARK, Y.K., KOO, H., IKEGARI, M. e CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 40, p. 97-106, 1997.
125. PARK, Y. K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of própolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, p. 24 – 29, 1998.
126. PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. ; ALENCAR, S. M. Classificação da própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias (APACAME)**, v. 58, p. 2-7, 2000.
127. PARK, K. Y.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian prpopolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502 – 2506, 2002.
128. PAPOTTI, G., BERTELLI, D., ROSSI, M.C., PLESSI, M. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1610–1618, 2010.
129. PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321 - 326, 2002.
130. PEREIRA, A. S.; PEREIRA, A. F. M.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 590 - 593, 2003.
131. PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 55, p. 360-365, 2007.
132. PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 8, n. 12, p. 1995 – 2018, 1998.
133. PICCINELLI, A. N.; FERNANDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I. M.; SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 9010 – 9016, 2005.
134. PINHEIRO, M. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes. 71 p. 2009.
135. RAAMAN, N. **Phytochemical Techniques**. 1. New Delhi: New India Publishing Agency, 2006.

136. RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152 – 159, 1997.
137. RIGHI, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileira**. Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2008.
138. ROE, K. Terminology of hairs in the genus *Solanum*. **Taxon**, v. 20, n. 4, p. 501-508, 1971.
139. RUFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2926 – 2931, 2006.
140. RUFINO, M, S, M.; ALVES, R, E.; BRITO, E, S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. **Comunicado técnico online 128** ISSN 1679-6535. 2007.
141. SANTOS, F. A. R. Identificação botânica do pólen apícola. **Magistra**, v. 23, p. 5 - 9, 2011.
142. SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, N. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
143. SAWAYA, A.C.H.F., SOUZA, K.S., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S. e SHIMIZU, M.T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.
144. SILICI, S., KOC, N.A., AYANGIL, D. e CANKAYA, S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.
145. SILVA, M. S. S.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVE, M. H.; LOPES, J. A. D. Triterpenoides tipo cicloartano de própolis de Teresina – PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, 2005.
146. SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1842-1848, 2006.
147. SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis,

a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (ECAM)**, v. 4, n. 1, p. 1 – 4, 2007.

148. SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 84 – 89, 2008.

149. SOBY, S.; BATES, R.; VANETTEN, H. Oxidation of the phytoalexin Maackiain to 6,6a-dihydroxy-Maackiain by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 925 – 929, 1997.

150. SODRE, G. S., MARCHINNI, L. C., MORETI, A. G. C. C.; CARVALHO, C. A. L. C. Tipos polínicos encontrados em amostras de méis de *Apis mellifera* em Picos, Estado do Piauí. **Ciência Rural**, v. 38, p. 839 - 842, 2008.

151. SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

152. SMITH, F. H.; SMITH, E. C. Anatomy of the inferior ovary of *Darbia*. **Am. J. Bot.**, v. 29, p. 464 – 471, 1942.

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

154. TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Bauer-7-em-3 β -yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 245 – 246, 2006.

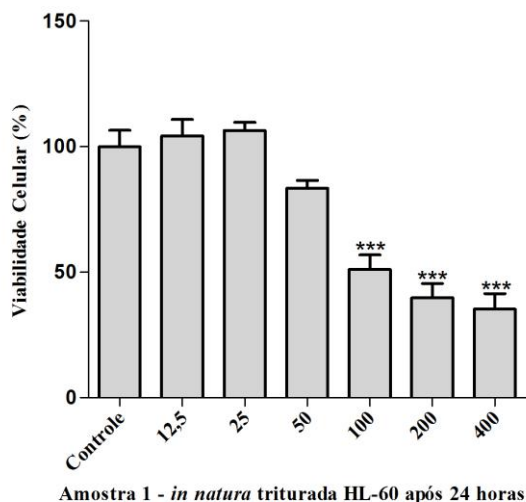
155. TRUSCHEVA, B.; POPOVA, B.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J. G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 683 – 689, 2004.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (ECAM)**, v. 3, n. 2, p. 249 – 254, 2006.

156. UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

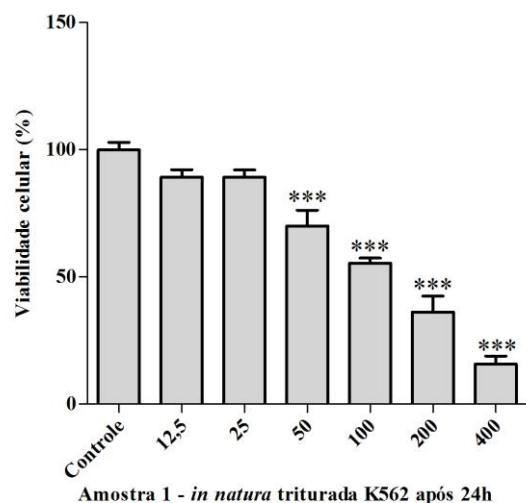
157. YANG, G.; WANG, R. A. The supercritical fluid extractive fractionation and the characterization of heavy oils and petroleum residua. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 22, n. 1 – 3, p. 47 – 52, 1999.
158. WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, p. 237 – 243, 2004.
159. WALDI, D. **Spray reagents for thin-layer chromatography – a laboratory handbook**. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1965.
160. WARAKOMSKA, Z.; MACIEJEWICZ, W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. **Apidologie**, v. 23, p. 277 – 283, 1992.

Gráfico 1 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



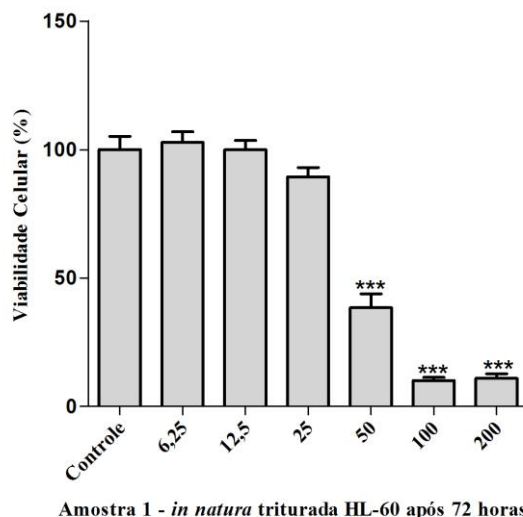
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 3 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



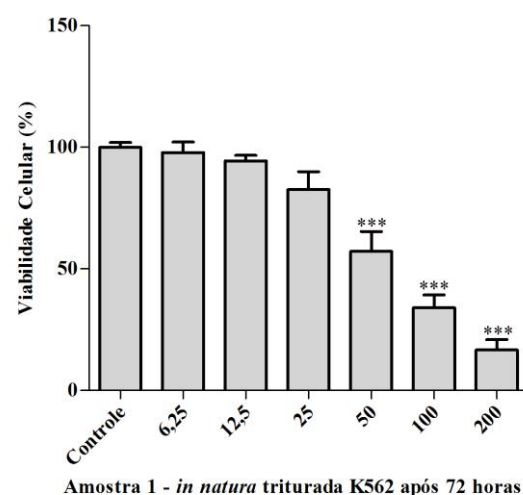
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 2 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



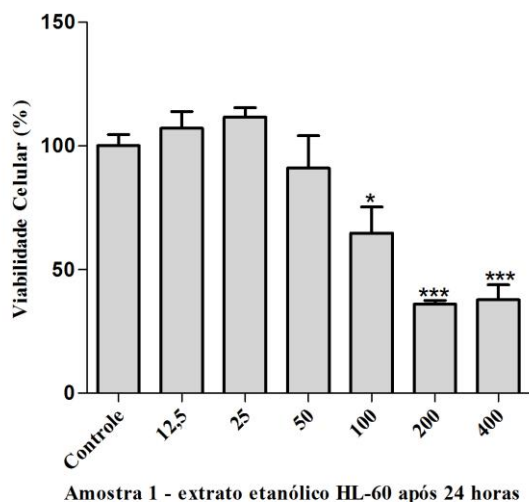
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 4 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



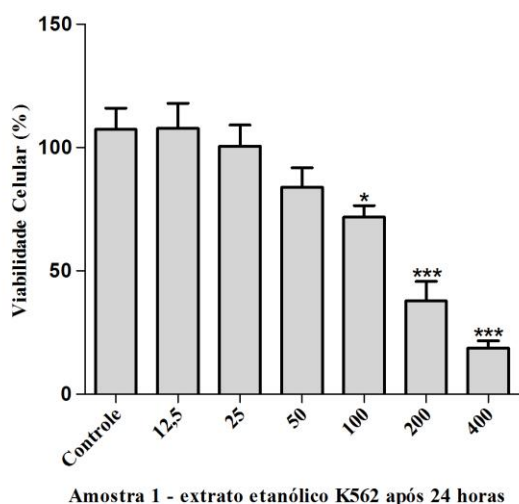
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 5 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



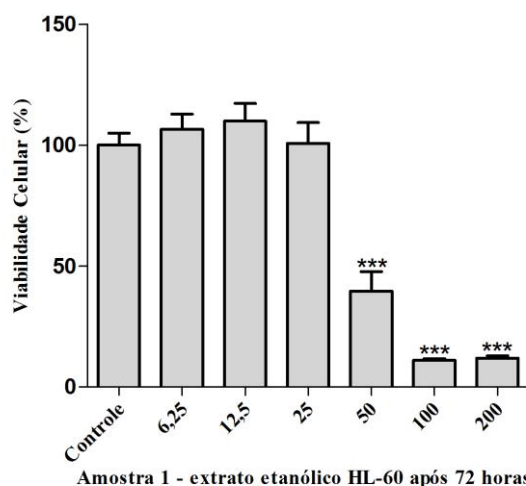
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 7 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



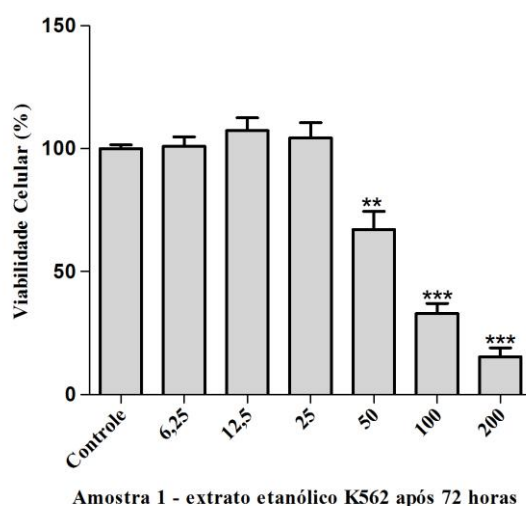
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 6 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



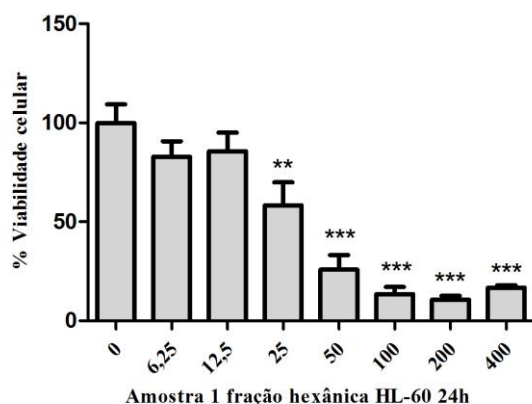
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 8 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



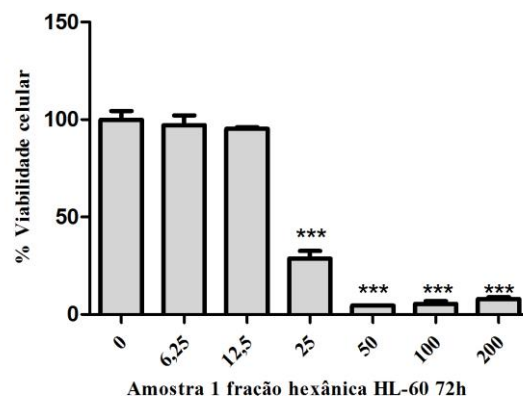
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 9 - Efeito da fração hexânica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



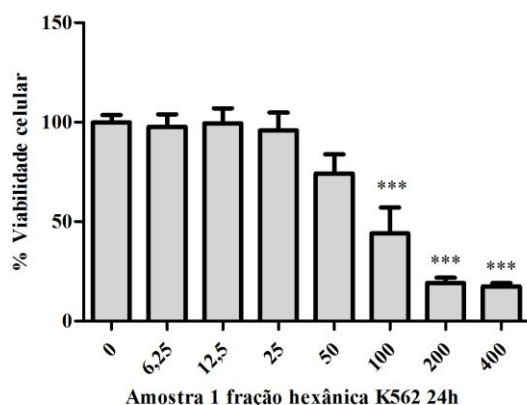
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 10 - Efeito da fração hexânica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



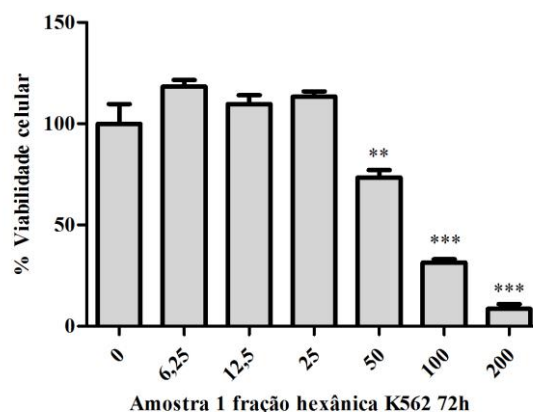
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 11 - Efeito da fração hexânica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



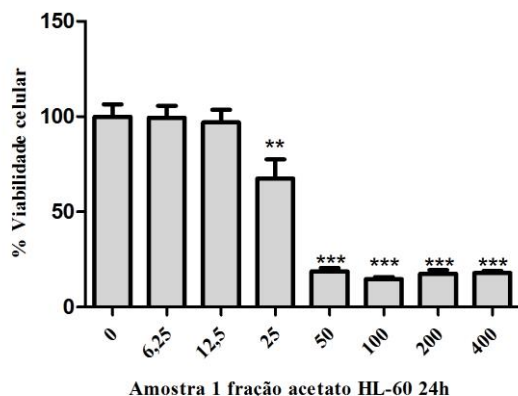
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 12 - Efeito da fração hexânica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



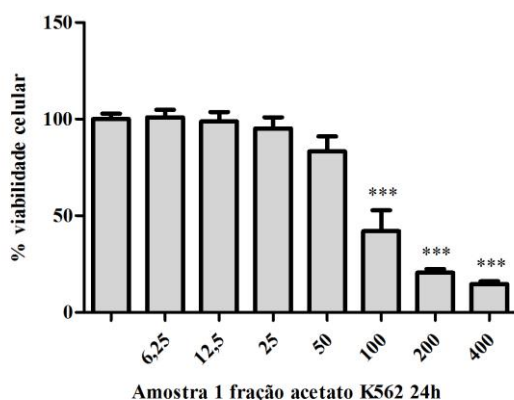
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 13 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



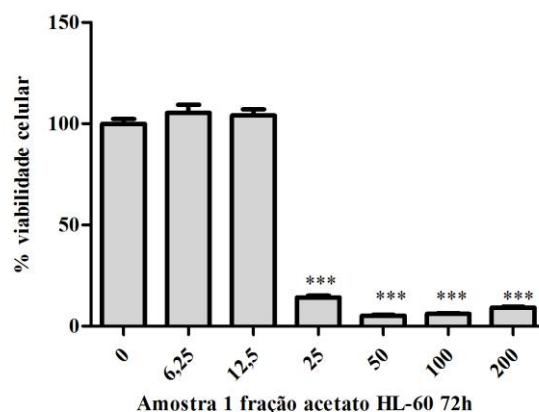
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 15 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



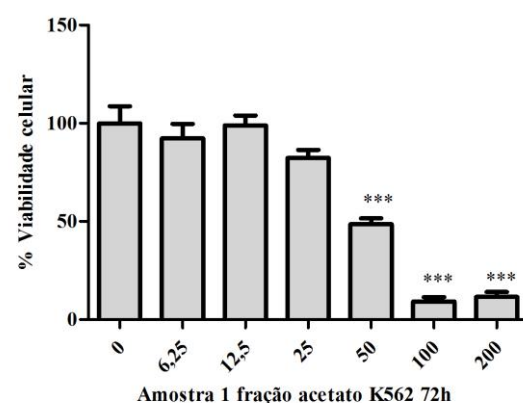
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 14 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



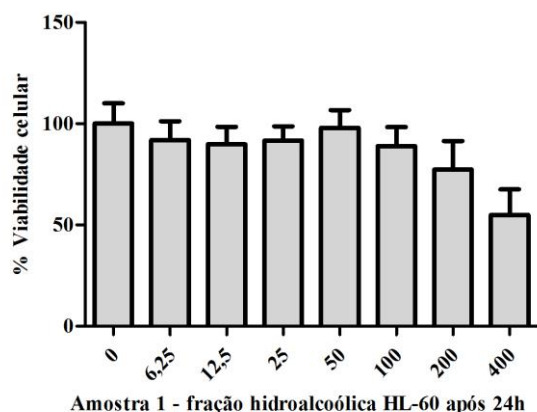
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 16 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



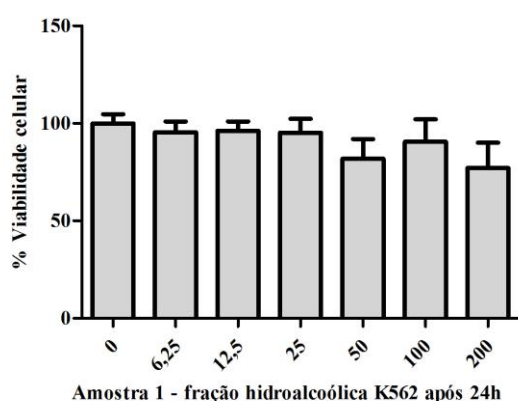
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 17 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



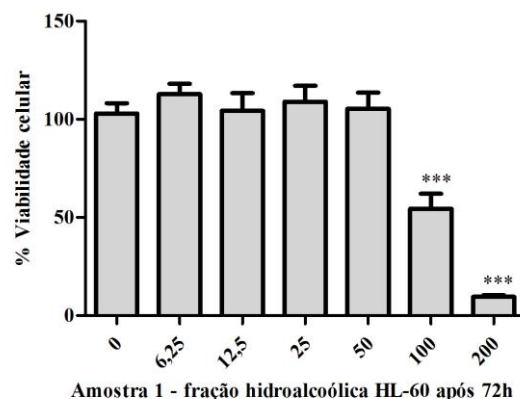
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 19 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



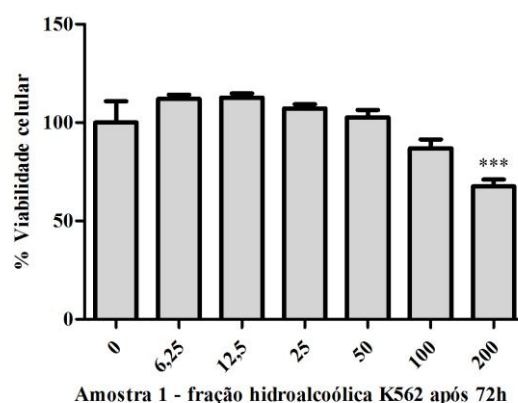
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 18 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



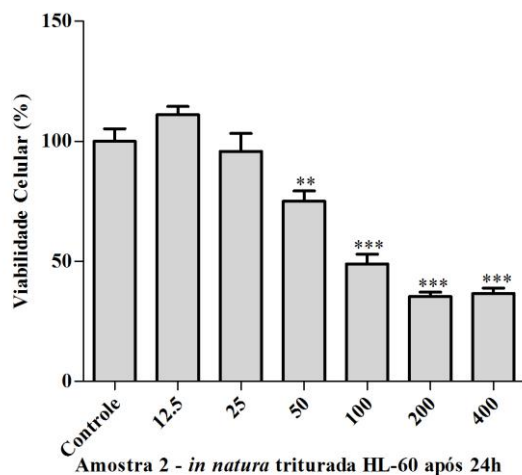
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 20 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 1 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



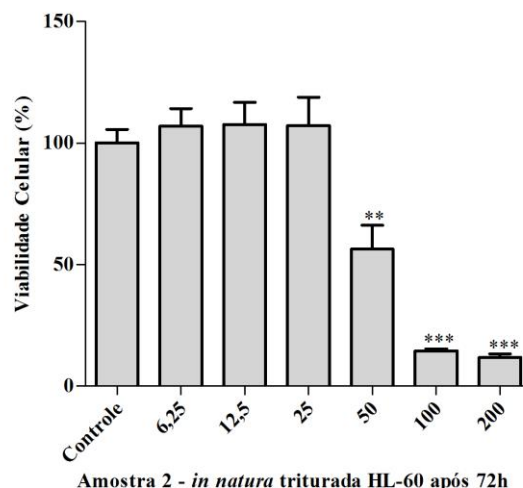
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 21 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



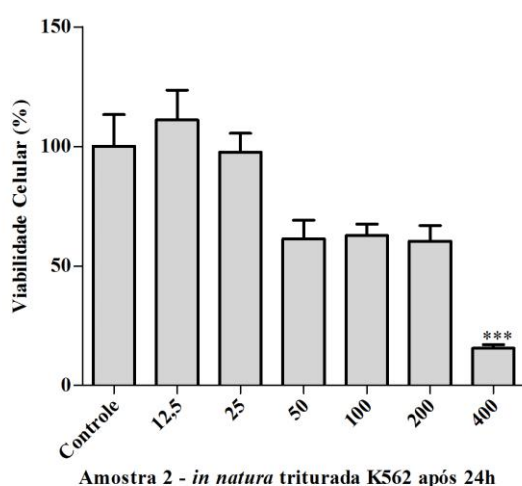
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 22 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



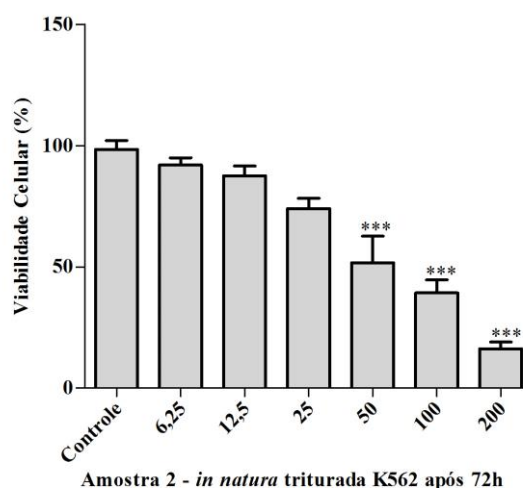
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 23 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



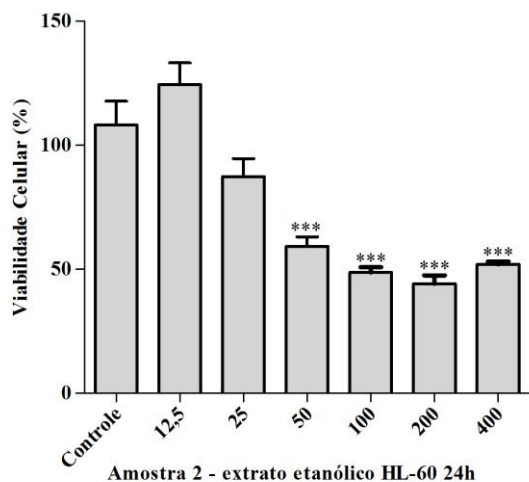
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 24 - Efeito da própolis vermelha *in natura* triturada da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



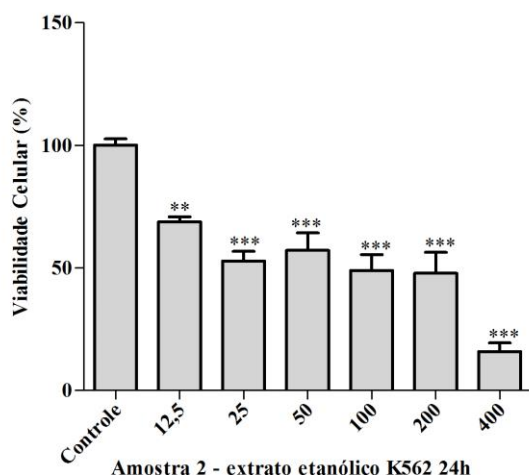
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 25 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



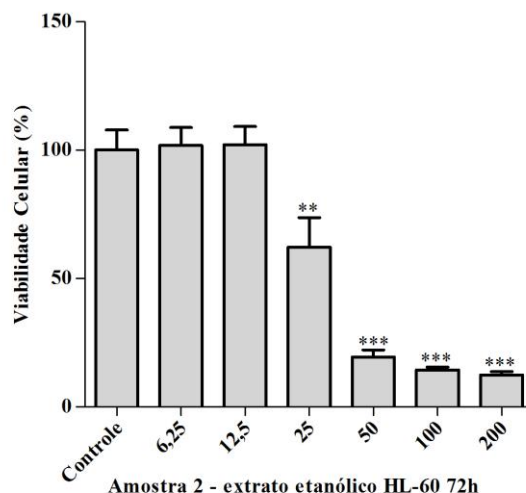
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 27 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



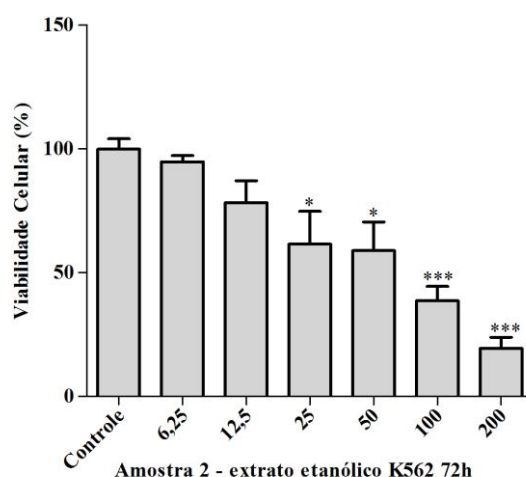
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 26 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



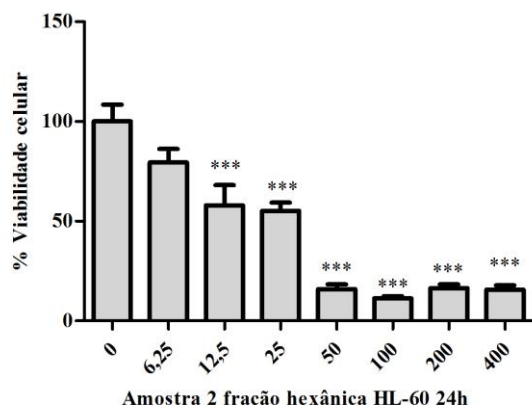
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 28 - Efeito do extrato etanólico bruto da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



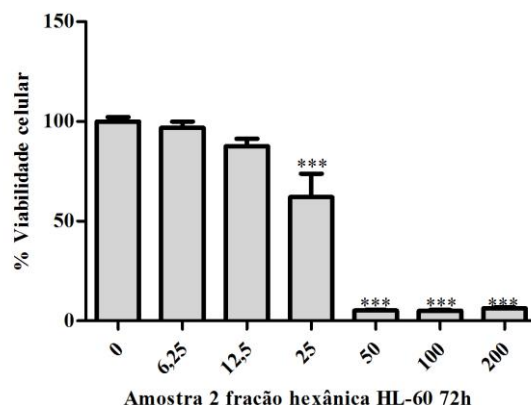
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 29 - Efeito da fração hexânica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



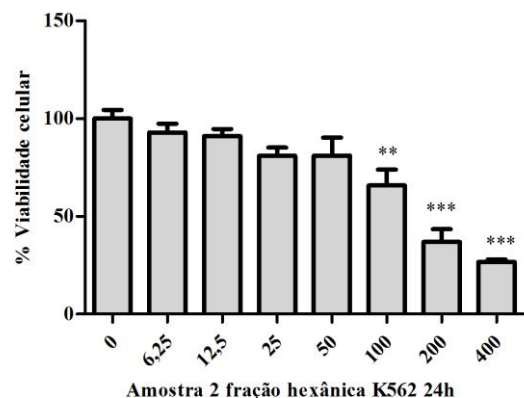
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 30 - Efeito da fração hexânica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



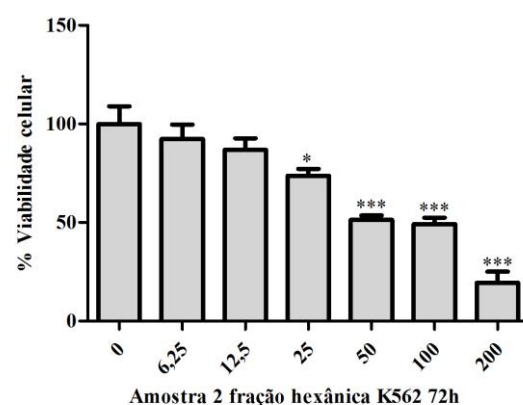
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 31 - Efeito da fração hexânica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



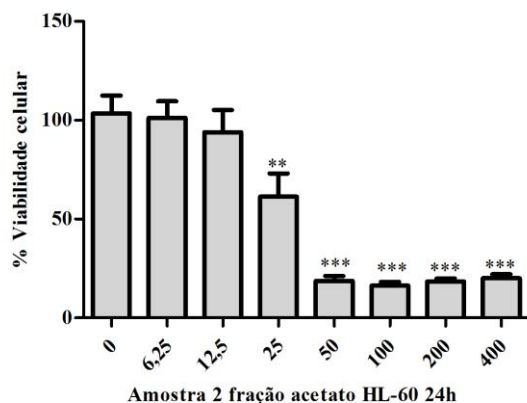
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 32 - Efeito da fração hexânica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



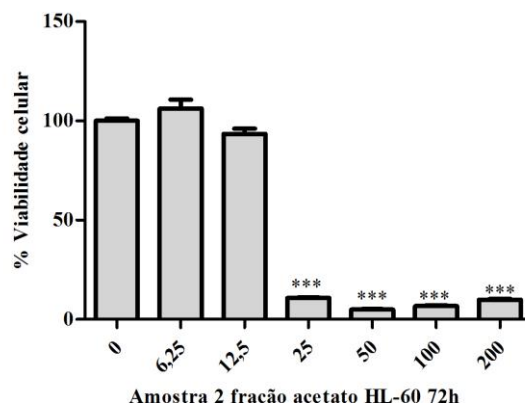
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 33 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



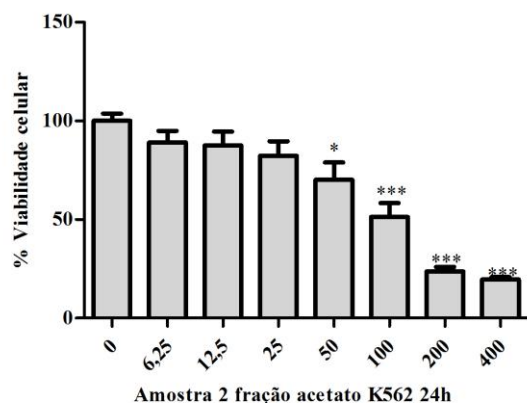
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 34 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



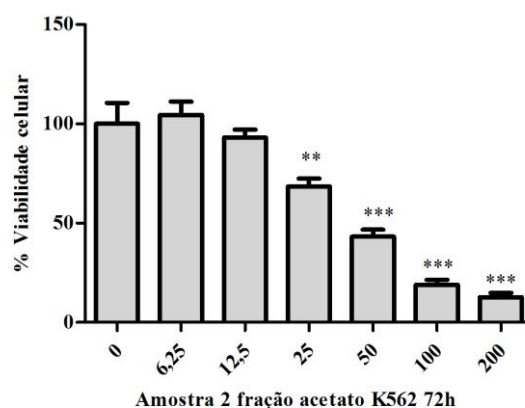
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 35 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



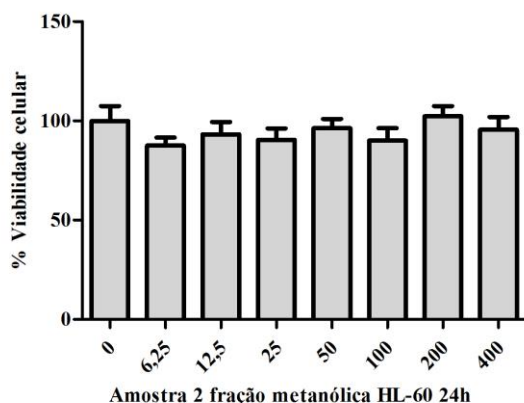
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 36 - Efeito da fração acetato de etila da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



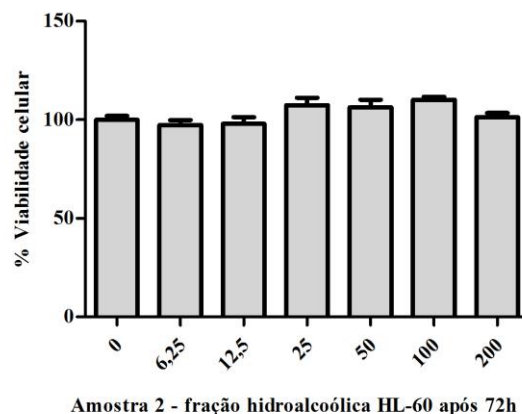
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 37 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



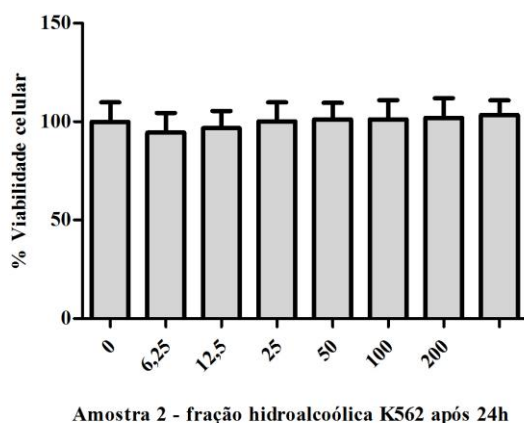
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. $***P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 38 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



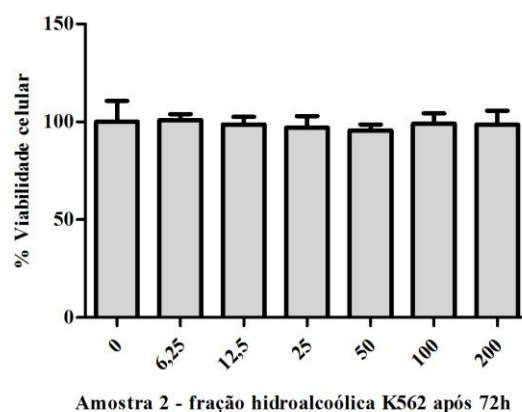
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. $***P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 39 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



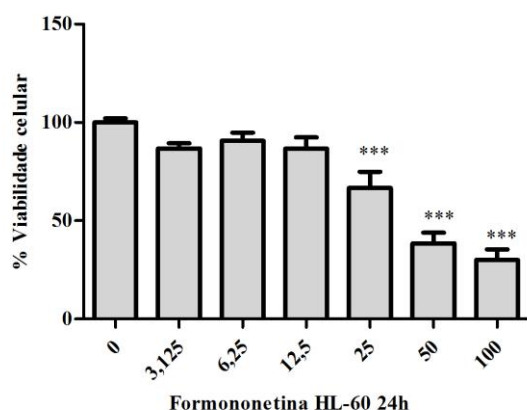
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. $***P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 40 - Efeito da fração hidroalcoólica da amostra 2 sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



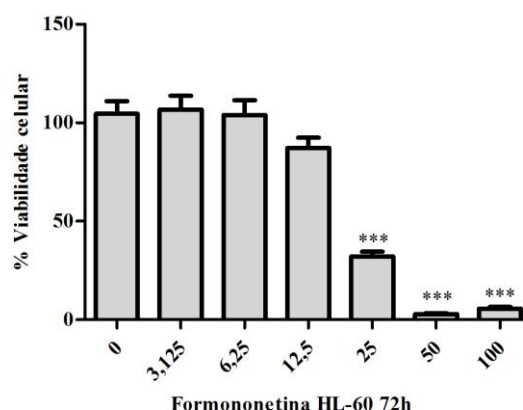
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. $***P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 41 - Efeito da formononetina sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



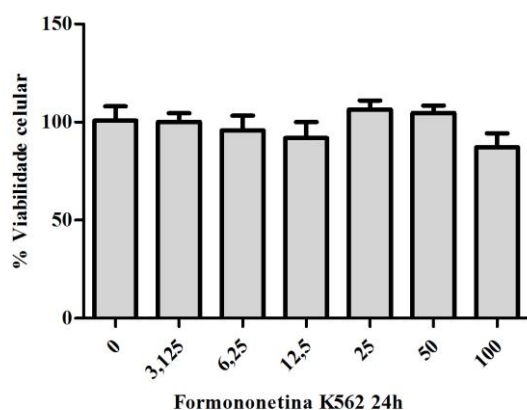
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 42 - Efeito da formononetina sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



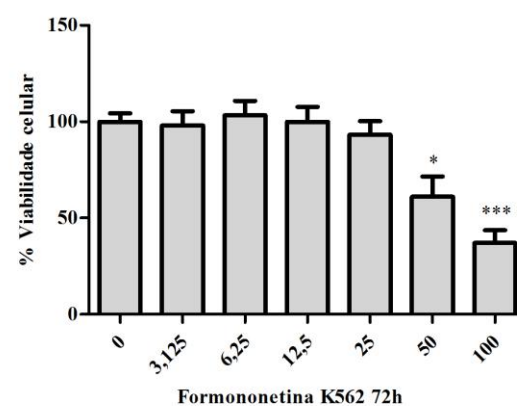
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 43 - Efeito da formononetina sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



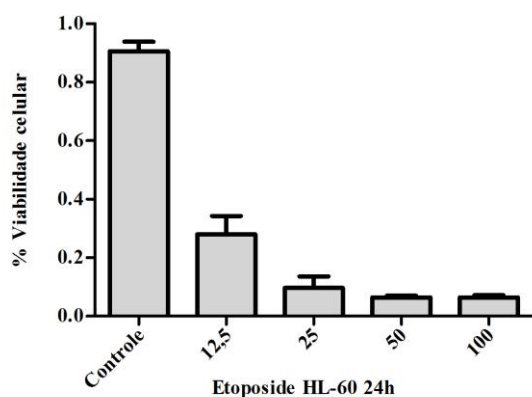
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 44 - Efeito da formononetina sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



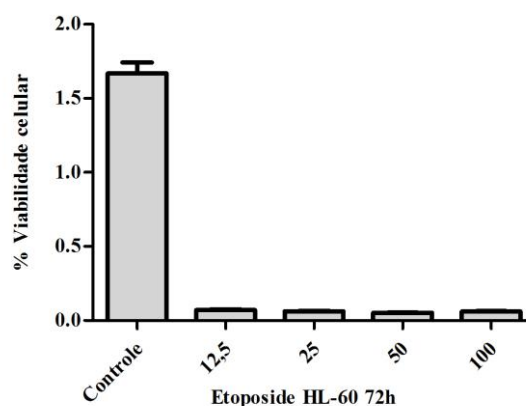
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 45 - Efeito do etoposide sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



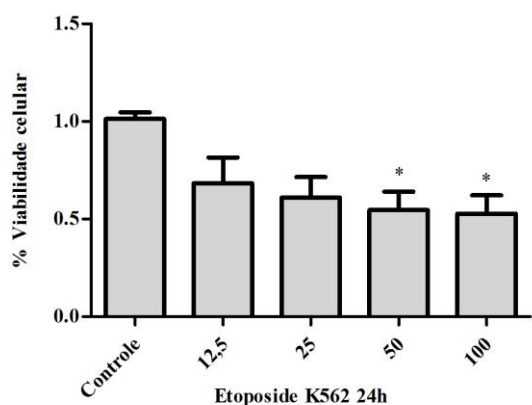
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 46 - Efeito do etoposide sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



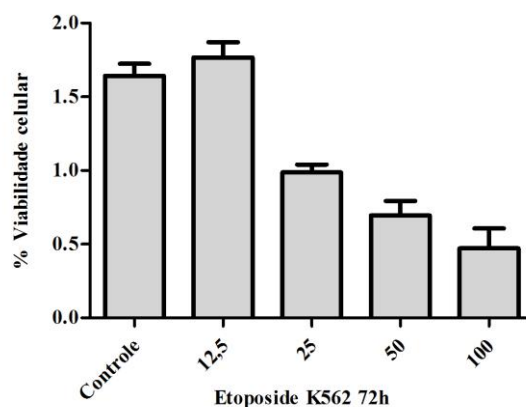
Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 47 - Efeito do etoposide sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 24h analisado pela técnica de MTT.



Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Gráfico 48 - Efeito do etoposide sobre a viabilidade da linhagem tumoral K562 por um período de 72h analisado pela técnica de MTT.



Os dados representam à média de três experimentos independentes, em triplicata, e são expressos como média \pm desvio padrão da média. *** $P \leq 0,001$ (significância em relação ao controle). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.