

**CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ  
FARMÁCIA**

**DAIANY LAINY CAU  
MARCO ANTÔNIO ABRANTES PINHEIRO  
TATIANE RODRIGUES DE SOUZA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS MARCADORES BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
VERDE, VERMELHA E MARROM EMPREGADAS NA APITERAPIA**

**Ribeirão Preto  
2022**

**DAIANY LAINY CAU  
MARCO ANTÔNIO ABRANTES PINHEIRO  
TATIANE RODRIGUES DE SOUZA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS MARCADORES BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
VERDE, VERMELHA E MARROM EMPREGADAS NA APITERAPIA**

Trabalho de conclusão do curso de Farmácia do Centro Universitário Barão de Mauá para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borella

**Ribeirão Preto**

**2022**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A532

Análise comparativa dos marcadores bioativos da própolis verde, vermelha e marrom empregadas na apiterapia/ Daiany Lainy Cau; Marco Antônio Abrantes Pinheiro; Tatiane Rodrigues de Souza - Ribeirão Preto, 2022.

65p.il

Trabalho de conclusão do curso de Farmácia do Centro Universitário Barão de Mauá

Orientador: Dr. Júlio César Borella

1. Própolis verde 2. Própolis vermelha 3. Própolis marrom I. Cau, Daiany Lainy II. Pinheiro, Marco Antônio Abrantes III. Souza, Tatiane Rodrigues de IV. Borella, Júlio César V. Título

CDU 638.1

Bibliotecária Responsável: Iandra M. H. Fernandes CRB<sup>8</sup> 9878

**DAIANY LAINY CAU**  
**MARCO ANTÔNIO ABRANTES PINHEIRO**  
**TATIANE RODRIGUES DE SOUZA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS MARCADORES BIOATIVOS DA PRÓPOLIS  
VERDE, VERMELHA E MARROM EMPREGADAS NA APITERAPIA**

Trabalho de conclusão do curso de  
Farmácia do Centro Universitário Barão  
de Mauá para obtenção do título de  
bacharel.

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Josinete Salvador Alves  
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

---

Prof. Me. José Norberto Bazon  
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

---

Prof. Dr. Júlio Cezar Borella  
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

**Ribeirão Preto**

**2022**

## RESUMO

A própolis é um material produzido pelas abelhas através da coleta de exsudatos de ramos, flores, pólen e brotos de diferentes espécies de plantas, apresenta características resinosa e balsâmica. Diante das diversidades de própolis existentes, deparamos com uma variedade de marcadores bioativos resultante da vegetação botânica que são alocadas nas colmeias. O presente trabalho tem por objetivo identificar, comparar e quantificar os principais marcadores bioativos presentes na própolis verde, vermelha e marrom através das análises de autenticidade: aspecto, cor, aroma, sabor, consistência e granulometria; obtenção de extratos das própolis vermelha, marrom e verde a partir do material in natura, por método extrativo a quente, usando o soxhlet; execução de ensaios físico-químicos e sensoriais usando as amostras produzidas; identificação e quantificação dos marcadores bioativos (quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides totais) da própolis vermelha, verde e marrom através de espectrometria de UV; separar e identificar os compostos da própolis vermelha, verde e marrom por método cromatográfico (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE/HPLC). Por meio destas avaliações pode-se concluir que todas estavam dentro dos parâmetros físico-químicos e sensoriais. Conclui-se também, avaliando o aspecto químico, que a variedade de própolis verde apresentou maior concentração de compostos fenólicos, entre eles, os compostos isoprenilados artepelin-C e bacharina. Ao comparar a variedade de própolis vermelha pode-se concluir que ela é singular, pois não apresenta nenhum dos compostos fenólicos encontrados nas outras variedades, ao passo que foi encontrada na sua composição a isoflavona formononetina, que é um marcador para esta variedade de própolis, que é encontrada exclusivamente no Brasil, o que lhe característica singular.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*. Própolis verde. Própolis vermelha. Própolis marrom. Apiterapia.

## ABSTRACT

Propolis is a material produced by bees through the collection of exudates from branches, flowers, pollen and buds of different species of plants, it presents resinous and balsamic characteristics. Faced with the diversity of existing propolis, we are faced with a variety of bioactive markers resulting from the botanical vegetation that are allocated in the hives. This work aims to identify, compare and quantify the main bioactive markers present in green, red and brown propolis through authenticity analysis: appearance, color, aroma, flavor, consistency and granulometry; obtaining extracts of red, brown and green propolis from the in natura material, by hot extractive method, using soxhlet; execution of physical-chemical and sensory tests using the samples produced; identification and quantification of bioactive markers (quantification of total phenolic acids and flavonoids) of red, green and brown propolis through UV spectrometry; separate and identify the compounds of red, green and brown propolis by chromatographic method (High Performance Liquid Chromatography – HPLC/HPLC). Through these evaluations it can be concluded that all were within the physical-chemical and sensory parameters. It is also concluded, evaluating the chemical aspect, that the variety of green propolis presented a higher concentration of phenolic compounds, among them, the isoprenylated compounds artepelin-C and bichararin. When comparing the variety of red propolis, it can be concluded that it is unique, as it does not have any of the phenolic compounds found in other varieties, while the isoflavone formononetin was found in its composition, which is a marker for this variety of propolis, which is found exclusively in Brazil, which makes it unique.

**Keywords:** *Apis mellifera*. Green propolis. Red propolis. Brown propolis. Apitherapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos compostos encontrados na própolis.....	18
Figura 2 - Abelha coletando resina da <i>B. dracunculifolia</i> . ....	20
Figura 3 - Vegetação de eucalipto.....	21
Figura 4 - Vegetação de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> .....	22
Figura 5 - Extração de própolis verde, marrom e vermelha. ....	26
Figura 6 - Representação do funcionamento interno do espectrofotômetro.....	29
Figura 7 - Representação do espectro de absorção dos padrões de ácidos fenólicos entre 200 a 600 nm.....	31
Figura 8 - Cromatograma da amostra de própolis verde.....	46

## LISTA DE TABELAS

tabela 1 - Condições cromatográficas para análise por HPLC/CLAE.....	42
Tabela 2 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas da própolis verde.....	43
Tabela 3 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas da própolis marrom. ....	44
Tabela 4 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas da própolis vermelha .....	45
Tabela 5 – Relação dos principais marcadores encontrados na própolis e seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda máximos absorvidos no UV-VIS.....	48
Tabela 6 - Relação dos marcadores presentes na própolis verde e marrom com os seus respectivos coeficientes angular e linear .....	49
Tabela 7 - Relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração dos compostos presentes na amostra de própolis verde .....	50
Tabela 8 - relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração dos compostos presentes na amostra de própolis marrom .....	50
Tabela 9 - relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração do composto presente na amostra de própolis vermelha .....	51

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Tipos de própolis.....	19
-----------------------------------	----

## **LISTA DE SIGLAS**

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

RITC - Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1	História do uso de própolis .....	13
2.2	Apiterapia.....	14
2.3	<i>Apis mellifera</i> .....	15
2.4	Composição química da própolis .....	16
2.5	Tipos de própolis .....	19
2.6	Usos terapêuticos da própolis.....	23
2.7	Aspectos técnicos para análise da própolis.....	25
2.8	Método extrativo da própolis (soxhlet) .....	26
2.9	Análise espectrofotométrica .....	27
2.10	Espectrometria UV-VIS .....	30
2.11	Análise por HPLC/CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ...	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1	Objetivo geral .....	Erro! Indicador não definido.
3.2	Objetivos específicos .....	Erro! Indicador não definido.
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	Análises organolépticas .....	35
4.2	Obtenção dos extratos de própolis .....	35
4.3	Análises físico-químicas .....	36
4.3.1	Porcentagem de substâncias solúveis em etanol .....	36
4.3.2	Porcentagem de cera .....	36
4.3.3	Porcentagem de massa mecânica .....	37
4.3.4	Porcentagem de umidade .....	37
4.3.5	Porcentagem de flavonoides totais .....	38
4.3.6	Porcentagem de fenóis totais.....	39
4.3.7	Atividade de oxidação.....	40
4.3.8	Porcentagem de cinzas.....	41
4.4	Análise por HPLC/CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) ..	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As práticas integrativas e complementares (PIC) é uma técnica de tratamento que utilizam recursos baseados em conhecimentos terapêuticos (CRF-CE, 2019).

O principal foco desta prática é o tratamento voltado somente ao paciente e não nos sintomas da doença. A apiterapia é uma das práticas integrativas e complementares, onde se busca uma forma inovadora de tratamento.

Para esse tipo de tratamento é utilizado o veneno de abelhas, mais conhecido como apitoxina, onde auxilia na cura de doenças e nos problemas de saúde (MOREIRA, 2012). Essa forma de tratamento começou a ser utilizada no século XV, para tratar várias patologias (PROKIPCHUK, 2016). Estudos realizados revelam que o veneno da abelha contém ação anti-inflamatória, que traz o alívio de dores crônicas (KUNITZ, 2015).

A palavra própolis é de origem grega, onde *pro* significa defesa e *polis* significa comunidade ou cidade, ou seja, defesa da cidade (MOREIRA; ROGÃO; ESTEVINHO, 2020). Na antiguidade a própolis era utilizada para conservar as vísceras dos cadáveres, por conta das suas propriedades terapêuticas. No período se desenvolveu a Civilização Inca, a própolis era usada como tratamento de doenças infecciosas e para aliviar a febre. Na Europa, por volta do século XIX, utilizavam a própolis para tratamento de chagas e para cicatrizar feridas. Desde então, a própolis vem se tornando um produto cada vez mais procurado, despertando interesses e sendo estudadas as suas ações terapêuticas (MOREIRA; ROGÃO; ESTEVINHO, 2020).

A própolis é uma substância produzida pelas abelhas através da coleta de exsudatos de ramos, flores, pólen e brotos de diferentes espécies de plantas, apresenta características balsâmica e resinosa. A própolis é utilizada pelas abelhas como proteção contra a invasão de insetos e microrganismos em sua colmeia (LUSTOSA *et al.*, 2008).

Ela é composta, por cerca de, 10% de óleos essenciais, 30% de ceras, 50% de resinas e bálsamos aromáticos, 5% de pólen e até 5% de outras substâncias.

Na sua composição química, a própolis compõem-se de flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, terpenoides, ácidos graxos e entre outros componentes (SHIMIZU *et al.*, 2004).

A própolis apresenta benefícios para doenças como tumores, bronquite, tuberculose, feridas, infecções, inflamação de garganta, aftas, antigripal, anestésico, analgésico, entre outras doenças. Ainda pode ter uso veterinário, ajudando na cicatrização de feridas, cortes e hemorroidas. Na agricultura tem benefícios no cultivo de frutas, hortaliças e legumes, para minimizar a contaminação de fungos e parasitas (COSTA, 2003).

Diante dos diversos tipos de própolis, as principais utilizadas são a própolis verde, vermelha e marrom. A própolis verde relação com a planta *Baccharis dracunculifolia*, cujo o nome popular é Alecrim-do-Campo, pertence a região sudeste do Brasil, o estado de Minas Gerais (SHIMIZU *et al.*, 2004).

O extrato de própolis vermelha tem relação com a planta *Dalbergia ecastophyllum*, é localizada na região nordeste do Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

A própolis marrom derivada de várias plantas, como os tipos polínicos *Eucalyptus* e *Eupatorium*, que tem origem do estado de Rio de Janeiro (FREITAS; BARTH; LUZ, 2010).

Recentemente o mundo inteiro sofreu uma pandemia causada pelo Coronavírus (COVID-19), que infelizmente ainda está presente, porém, vem sendo controlada diante das vacinas e cuidados pessoais. O extrato de própolis, nessas circunstâncias, teve um grande destaque, pois, através de estudos foram relatados os benefícios que trouxe a população. Um dos seus maiores benefícios é reforçar o sistema imunológico, ajudando tanto os pacientes em tratamento da COVID-19, quanto os que não estavam com a doença, mas queriam aumentar a imunidade para prevenir ou diminuir a chance de adquirir o vírus (MATOSO; MATOSO, 2021).

Diante da diversidade existente de própolis, deparamos com uma variedade de marcadores bioativos, resultante da vegetação botânica que é alocada para colmeias.

A utilização de produtos classificados como naturais, sendo alternativa para o tratamento de diversas enfermidades, vem se destacando nos últimos tempos. Estudos comprovam que alguns destes produtos apresentam segurança no uso (MOURÃO, 2011).

Dentro desse atual cenário, a própolis é que mais se destaca por apresentar propriedades farmacológicas de interesse médico e farmacêutico, trazendo em sua

composição substâncias bioativas que contém propriedades fungistática, fungicida, bacteriostática, bactericida, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e anti-inflamatória antitumoral, cicatrizante, virustática, virucida, reparadora tissular e anestésica (FONTANA *et al.*, 2004).

O presente trabalho tem por intuito avaliar, por meio de análises qualitativas e quantitativas, a qualidade dos bioativos presentes em amostras de própolis verde, vermelha e marrom disponíveis no mercado brasileiro.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Para o desenvolvimento do trabalho de revisão bibliográfica sobre o tema foi adotada a metodologia de revisão em livros e artigos publicados entre 1986 a 2022.

Foram utilizadas as bases de dados SciElo, Teses, Pubmed, Google Acadêmico e BVS com a busca das palavras-chave: *Apis mellifera*, Própolis Verde, Própolis Vermelha, Própolis Marrom, Apiterapia.

### **2.1 História do uso de própolis**

A própolis pode ser considerada um dos remédios naturais mais eficaz descoberto no ocidente. Alguns acreditam que seu uso na medicina popular é anterior aos tempos egípcios.

Na antiga Assíria, o pó de própolis era usado para tratar infecções e inchaço, e deve ter sido usado para acelerar o crescimento do cabelo.

Aristóteles, em seu “Catálogo de Animais”, descreveu a própolis como um remédio para abscessos e feridas, ou seja, para a prevenção de infecções.

O médico grego Dióclides, que viveu no século I D.C., mencionou em seu “Catálogo de remédios” que a própolis era usada para eliminar substâncias estranhas que invadiam o corpo, como por exemplo, “um espinho” e “para acalmar a tosse” (MATSUNO, 1997).

Na África do Sul, foi amplamente utilizada por suas propriedades curativas durante as guerras do final do século XIX e durante a Segunda Guerra Mundial, foi usado em várias clínicas soviéticas (BARBOSA *et al.*, 2009).

A própolis é um dos produtos naturais que vem se destacando nos dias atuais por apresentar propriedades bacteriostática e bactericida, fungistática e fungicida, virustática e virucida, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, reparadora tissular, anestésica, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias que são interesse de profissionais da saúde (FONTANA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2004).

Essas propriedades estão relacionadas à sua composição química, portanto, a eficácia para cada atividade varia de acordo com a composição da própolis, pois sua composição ativa depende de vários fatores, como, por exemplo, a flora que as abelhas estão expostas, a estação do ano, a tecnologia e o tipo de abelhas utilizadas (CHAN; CHEUNG; SZE, 2013; SAWICKA *et al.*, 2012).

## 2.2 Apiterapia

Cerca de 5.000 anos atrás, a apiterapia se desenvolveu na China como um método medicinal com uso de produtos apícolas para tratar e curar doenças em seres humanos e animais, como pólen, geleia real, mel, veneno de abelhas, própolis, cera e larvas de zangão (ALMEIDA, 2017).

Existem várias referências das práticas integrativas e complementares que são considerados ineficazes pela medicina oficial, entretanto, os resultados são promissores, sendo as principais: fitoterapia, apiterapia, acupuntura, quiropraxia, aromaterapia, homeopatia, entre outros. A apiterapia sendo uma prática integrativa e complementar que apresenta uma forma de tratamento que utiliza produtos apícolas, neste caso, veneno de abelha (apitoxina), geleia real, pólen, própolis, mel e outros para o tratamento de problemas de saúde (MOREIRA, 2012).

Existem várias técnicas para a aplicação da apitoxina, contudo a mais comum é industrializar uma dose de veneno de abelha, é a formulação de pomada ou gel, que

reduz a atividade de toxina ou aplicar a picada de abelha diretamente na área dolorida (MOREIRA, 2012).

De acordo com estudos realizados sobre a apiterapia, o veneno de abelha apresenta ação anti-inflamatória, que leva ao alívio da dor crônica (KUNITZ, 2015).

A demanda por essa nova terapia é muito alta em outros países, mas no Brasil, a aplicação desse tratamento ainda é pouco utilizada, principalmente pela falta de evidências sobre as reações alérgicas que pode causar (MOREIRA, 2012).

Ainda não há como assegurar a segurança ou eficácia deste método, pois não possui uma forma de realizar a esterilização dos ferrões das abelhas, o que conflita com as normas de fiscalização da vigilância sanitária e, pelo fato de que muitas pessoas são alérgicas a picada de abelhas (NASCIMENTO; SILVA; BONACHELA, 2021).

### **2.3 *Apis mellifera***

As abelhas são animais que habitam em grupos, existem há mais de quarenta mil anos e são os insetos mais úteis na polinização, fabricação de mel, agricultura, própolis, cera e geleia real. Abelha é um nome comum para vários insetos que pertence à ordem Hymenoptera, e a família dos Apídeos, um subgrupo relacionado à classe de insetos como vespas e formigas (CARVALHO, 2010).

*Apis mellifera*, originária do Velho Mundo, era produzida em massa para a fabricação de própolis, mel e cera. É uma espécie nativa da Europa, onde a abelha possui somente um ferrão, que é utilizado para proteger sua colmeia de outros animais. Existiam outras espécies no Brasil que não possuem ferrão, como as da tribo *Meliponini* (CARVALHO, 2010), que também fazem a produção de mel e própolis. São mais de 200 espécies sem ferrão que fazem a polinização natural de diversas plantas no Brasil (HEARD, 1999). Essas abelhas que não possuem ferrão realizam a polinização natural de muitas plantas que fazem parte da flora brasileira. São abelhas menos agressivas e fáceis de manusear e ajuda manter a biodiversidade com a proliferação de suas colônias. (HEARD, 1999).

Existem mais de 20.000 espécies conhecidas que se ajudam ou vivem separadas, muitas destas espécies vivem sozinhas. As fêmeas fertilizadas constroem

ninhos no chão e colocam seus ovos. Na maioria das vezes, as larvas morrem antes de chegar à forma adulta.

A espécie de abelhas mais conhecida é a *A. mellifera*, que vive em sociedade. Nesta espécie, a sociedade é dividida três castas: rainhas, operárias e zangões. As abelhas rainhas são fêmeas férteis, que podem colocar até mil ovos por dia; as operárias são fêmeas que não conseguem reproduzir; os zangões são machos férteis (CARVALHO, 2010).

Compreender o processo reprodutivo e a produção de mel da abelha (*A. mellifera*) é o ponto de partida para maior compreensão da função, organização e funcionamento da colmeia; produtos elaborados com ingredientes derivados da natureza e modificados pelas abelhas são utilizados no desenvolvimento da colmeia (STORER, 1998).

As abelhas das colônias usam própolis para proteger suas colmeias. *A. mellifera*, trazida para o Brasil pelos colonizadores europeus, produzem mel e própolis.

Todas as abelhas realizam a produção de própolis, (incluindo as sem ferrão) porém, as mais produtivas (e mais fáceis de encontrar no mercado) são as abelhas da espécie *A. mellifera*, que podem fornecer entre 100 e 300 gramas por colmeia por ano (MATSUNO, 1997).

A composição química da própolis de *A. mellifera*, varia muito, quando se trata de própolis bruta, mas geralmente consiste em 30% de cera, 50% de resina solúvel em etanol, e o restante é completado com pólen, minerais, aminoácidos, sais, óleos essenciais, vitaminas e resíduos insolúveis (SAWAYA, 2006). Por exemplo, no sudeste do Brasil, as abelhas desta espécie utilizam com preferência o arbusto *Baccharis dracunculifolia* como fonte botânica de própolis, originando a famosa própolis verde (BANKOVA *et al.*, 1999).

## 2.4 Composição química da própolis

A própolis é o produto de uma composição química complexa, da qual foram identificadas mais de 200 substâncias com potenciais efeitos biológicos. É constituída de materiais resinosos e balsâmicos coletados pelas abelhas de galhos, flores, pólen, botões

de flores, secreções de árvores e secreções de salivares das abelhas (LUSTOSA *et al.* 2008).

As abelhas usam própolis para selar rachaduras e cavidades e há grande depósito de própolis na entrada do ninho (MARCUCCI, 1996).

As substâncias presentes na própolis variam conforme sua origem geográfica (PARK *et al.*, 2001) e as diferenças genéticas das abelhas responsáveis pela coleta (MOREIRA, 1986; BANKOVA, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

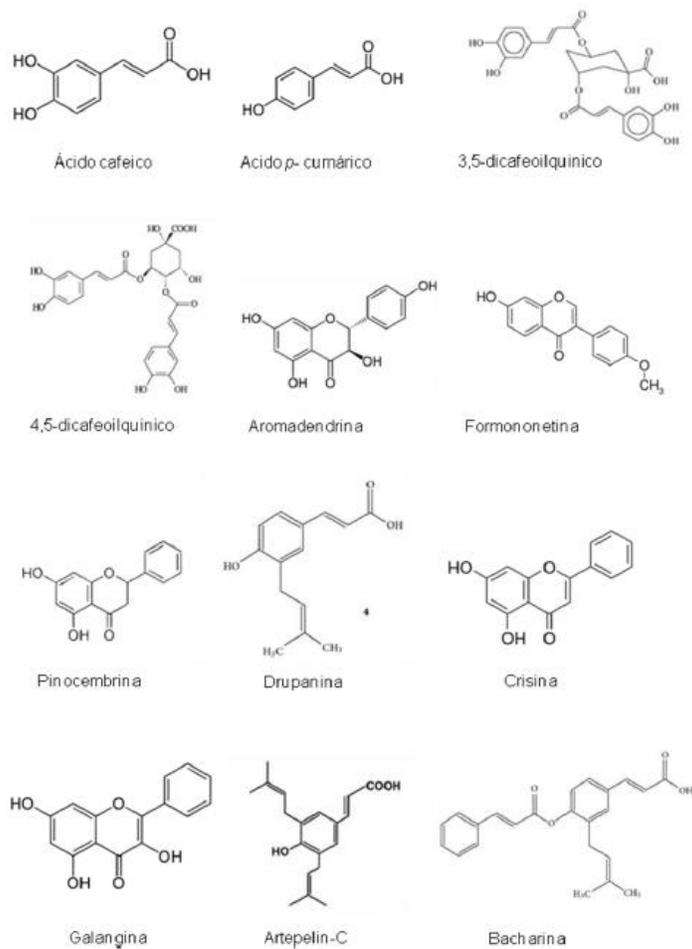
Não há uma constância na sua composição química para a própolis, pois variam de acordo com a flora utilizada para prepará-la, o período de coleta e as espécies de abelhas. Esses fatores levam a modificações em suas características farmacológicas, que visam ser superiores em regiões tropicais e inferiores em regiões temperadas, devido à diversidade de plantas presentes (BARBOSA *et al.*, 2009). O período que é realizado a coleta é outro motivo que impacta diretamente na determinação da composição química. No Brasil, essa coleta ocorre ao longo do ano, o que resulta nas possíveis variações sazonais (SANTOS; VIANNA; GAMBA, 2007). Isso possibilita obter diversos tipos de própolis, como ouro, amarelo, verde, vermelho e marrom.

Graças à rica biodiversidade do Brasil, vários tipos de própolis foram encontrados em todo o país e, embora a padronização seja difícil, a própolis de origem brasileira é atualmente dividida em 13 categorias baseado no ponto de coleta e composição química (MACHADO *et al.*, 2016).

A composição da própolis é basicamente 5% de grão de pólen, 5 - 10% de óleos essenciais, bálsamos, 30 - 40% de ceras, 50 - 60% de resinas e bálsamos, além de microelementos como manganês, cobre, ferro, estrôncio, cálcio, alumínio e baixas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (PARK *et al.*, 2001; BURDOCK, 1998; FUNARI; FERRO, 2006; MENEZES, 2005).

Na figura 1 são demonstradas as estruturas químicas de alguns componentes químicos presentes na própolis verde, marrom e vermelha. O composto formononetina está presente somente na própolis vermelha. A artepelin-C e a bacharina são típicos da própolis verde (BAPTISTA, 2016).

Figura 1 - Estrutura química dos principais compostos encontrados na própolis.



Fonte: (BAPTISTA, 2016).

## 2.5 Tipos de própolis

No quadro 1 é apresentado o aspecto da própolis verde, vermelha e marrom, conforme a sua região de origem.

Quadro 1 - Tipos de própolis.

Própolis	Aspecto	Região de origem
Verde	 A photograph showing several small, irregular, yellowish-green fragments of propolis, likely collected from the honeycomb.	Minas Gerais
Marrom	 A photograph showing several small, irregular, dark brown to black fragments of propolis.	Sudeste e Sul do Brasil
Vermelha	 A photograph showing two larger, irregular, reddish-brown fragments of propolis.	Nordeste

Fonte: Autores.

A própolis verde encontrada no cerrado é abundante em derivados prenilados do ácido p-cumárico, cuja principal fonte vegetal é o alecrim (*Baccharis dracunculifolia*). Isso foi confirmado por observações de produção de colmeias e caracterização química de extratos produzidos pelas folhas de *B. dracunculifolia* e própolis verde, onde puderam ser identificados os derivados prenilados do ácido p-cumárico, desta própolis (SHIGENORI *et al.*, 2006). A figura 2 mostra o momento em que a *Apis mellifera* realiza a coleta de resina em uma vegetação com *B. dracunculifolia*. Ela tem característica de arbusto podendo atingir até três metros de altura. Sua resina é coletada pelas abelhas, que irá produzir a própolis verde. Estudos concluíram que essa espécie vegetal possui grande quantidade de artemisinina e derivados do ácido cinâmico (SANTOS *et al.*, 2012).

**Figura 2 - Abelha coletando resina da *B. dracunculifolia***



Fonte: (RODRIGUES, 2017).

Entre os compostos presentes na própolis verde, pode ser obtidos artepillin-C, bacharina, crisina, ácido p-cumárico e drupanina.

Diversas atividades biológicas estão associadas à própolis verde, como, por exemplo, imunomoduladora, antiúlcera, antitumoral, antioxidante e antibacteriana (TORETI *et al.*, 2013).

O extrato de própolis marrom encontrado na região Sul do Brasil, possui coloração desde ao amarelo claro, marrom esverdeado, podendo chegar até a coloração negra. Possui atividade antiviral, antifúngica, antimicrobiana, antibacteriana, cicatrizante, antioxidante entre outras, sendo a antimicrobiana que mais se destaca (PICOLI *et al.*, 2016). A espécie vegetal mais usada pelas abelhas para produzir a própolis marrom é o eucalipto, que pertence a um gênero de plantas da família *Myrtaceae*. Estimasse que existam mais de 800 espécies, que são originárias, na sua maioria, da Austrália. Elas foram disseminadas para diferentes países do mundo, inclusive no Brasil, onde elas são muito comuns. Podem ser muito utilizadas na indústria, como matéria prima na fabricação de papel e também na construção civil, como estacas. O eucalipto possui um alto valor terapêutico graças aos seus óleos essenciais (PARK *et al.*, 2001).

As espécies de *Eucalyptus* são caracterizadas pela formação de um exsudato espesso, rico em ácidos fenólicos, encontrado nas cavidades dos caules. Estas

substâncias são produzidas pela planta em resposta ao ataque de alguns insetos, fungos ou algum tipo de lesão (MARTIUS; HAMMER; LOCHER, 2012).

É uma planta de crescimento rápido, bastante adaptada a qualquer tipo de clima e de variações climáticas. No Brasil existe uma extensa área plantada destas espécies. Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de eucalipto, grande parte destinada a produção de celulose.

Além das formas de utilização citadas, no Brasil, é possível também a produção de própolis marrom pelas abelhas, a partir dos exsudatos do eucalipto (REMADE, 2001). Na figura 3 mostra vegetal do gênero *Eucaliptus*.

**Figura 3 - vegetação de eucalipto**



Fonte: (WOLF, L.; SCHUHLI, G.; 2021).

A própolis vermelha é encontrada na região nordeste do Brasil, em colmeias situadas nos caules dos arbustos de manguezais, principalmente nos estados de Sergipe, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Alagoas. Região que apresenta a vegetação de *Dalbergia ecastophyllum* (BATISTA *et al.*, 2012; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). A própolis apresenta marcadores químicos como biocharnina A, quercetina e formononetina (composto que é utilizado para identificar e caracterizar a própolis vermelha) (SILVA *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2016).

O gênero *Dalbergia* possui várias espécies de árvores, arbustos e cipós e trepadeiras. No Brasil existem várias espécies distribuídas por todas as regiões (CARVALHO, 1997)

As mais importantes são as árvores tropicais de madeira de lei, que são valorizadas pelas suas madeiras, que são usadas na fabricação de móveis, como é o caso do jacarandá de alto valor econômico e pela sua durabilidade (MENDES *et al.*, 2012).

No gênero *Dalbergia*, a espécie *D. ecastophyllum*, conhecida como rabo de bugio, comum na região nordeste do Brasil, está relacionada com origem da própolis vermelha, onde as abelhas se utilizam da sua resina para produzi-la (FRANCIS, 2004; TAROLA *et al.*, 2007; PICCINELLI *et al.*, 2011). Na figura 4 se observa indivíduos da espécie *Dalbergia ecastophyllum*.

**Figura 4 - Vegetação de *Dalbergia ecastophyllum***



Fonte: (ULIAN *et al.*, 2012).

São associadas a este tipo de própolis as atividades antioxidantes, antitumoral e antimicrobiana, devido à rica presença de flavonoides (ALENCAR *et al.*, 2007).

## 2.6 Usos terapêuticos da própolis

Muitas são as propriedades biológicas da própolis utilizadas na medicina popular. Somente nas últimas décadas houve interesse em estudar seus constituintes químicos associados às atividades farmacológicas.

No Brasil, há pouca pesquisa ou conhecimento sobre a própolis. No entanto, seus usos são difundidos e seu consumo em remédios populares é antigo (MARCUCCI, 1996).

Atividades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, hepatoprotetora, antifúngica, imunomoduladora, entre outras, vem sendo estudadas farmacologicamente (LUSTOSA *et al.*, 2008). Este material contém propriedades anti-inflamatórias e tem sido descrita principalmente para distúrbios do aparelho muscular-articular e outros tipos infecções, inflamações, torções e reumatismo. Tem se mostrado eficaz contra distúrbios digestivos, apresentando potente atividade hepatoprotetora e agente antiúlcera, além disso, possui efetividade no tratamento de doenças respiratórias. É usada em cremes dentais, preparações para bochechos, no tratamento de gengivite, queilação e após extrações dentárias. Seu uso no tratamento de tumores tem sido estudado e, também são conhecidos por suas ações adstringentes, hipotensivas e citostáticas (MARCUCCI, 1996).

A ação anti-inflamatória da própolis se dá por um de seus compostos químicos principais que são os flavonoides, os quais possuem ação inibitória a ciclo-oxigenase (COX). Apresenta inibição sobre as prostaglandinas, onde irá auxiliar no sistema imune (KOSALEC *et al.*, 2005).

Possui ação antimicrobiana, onde estudos realizados demonstram a inibição da própolis sobre as bactérias de origem gram-negativas e gram-positivas, além de fungos e leveduras que atingem o ser humano e animais com grande patogenicidade. Foi descoberto que essa ação inibitória se dá por conta da sua composição química que possui flavonoides (BARBOSA *et al.*, 2009).

Além dessas atividades terapêuticas, a própolis possui ação cicatrizante, que tem sido usada para cicatrização de feridas, queimaduras, tratamento de dermatofitos, úlceras externas, neurodermatite, hanseníase, dermatite de contato, regeneração de tecidos, eczema, psoríase, herpes simples, herpes zoster e genital e prurido

(MARCUCCI, 1996). Foram realizados estudos experimentais com pacientes que possuíam úlceras, e o tratamento foi realizado com uma pomada de própolis, que demonstrou diminuir o tempo de cicatrização, e agilizou o procedimento de regeneração da pele (BARBOSA *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante apresenta efetividade em usos tópicos para tratar e prevenir danos à pele (MARQUELETE *et al.*, 2006). Para essa ação, os flavonoides têm grande atividade na própolis brasileira, por estar presentes em quantidades adequadas. Estudos mostram que extrato aquoso de própolis apresenta boa ação antioxidante, quando associada aos compostos fenólicos (MANI *et al.*, 2006; VICENTINO; MENEZES, 2007).

Com relação à atividade antiviral, estudos mostram que a própolis demonstra ser efetiva contra estomatite vesicular (VSV) e o vírus herpes simplex (HSV). Para esse tratamento, a própolis é usada na forma de pomada, onde a sua composição, contendo flavonoides, demonstrou ter mais efetividade do que outros tratamentos, ajudando a cicatrizar mais rápido e reduzir os sintomas (VYNOGRAD; VYNOGRAD; SOSNOWSHI, 2000).

Por conta da sua atividade anti-inflamatória estudos demonstram que a própolis associada com quercetina, éster feniletil do ácido caféico e ácido caféico, ajuda a controlar o crescimento tumoral.

A própolis vem demonstrando atividade no sistema imunológico, onde ativa os macrófagos, aumentando os anticorpos no organismo humano, aumentando assim, a imunidade, fazendo com que o paciente tenha melhora no seu tratamento (LUSTOSA *et al.*, 2008).

## 2.7 Aspectos técnicos para análise da própolis

Segundo Brasil (2001), a Instrução Normativa n.º 3, de 19 de janeiro de 2001, registra regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis, que estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis, preconiza que:

Em relação ao teor de flavonoides, a própolis é classificada como baixo teor (até 1 % min.), médio teor (> 1 %- 2 % min.), alto teor (> 2 % min.).

As composições da própolis compõem-se de resinas, produtos balsâmicos, cera essenciais, pólen e microelementos.

A própolis apresenta aroma balsâmico e resinoso; coloração: amarelada, parda, esverdeada, marrom, vermelha entre outras; sabor suave balsâmico a forte e picante; consistência (à temperatura ambiente) maleável a rígida, podendo haver variação conforme a origem botânica. A granulometria é classificada como heterogênea.

Em relação aos requisitos físico-químicos, a própolis deverá apresentar as seguintes especificações: perda por dessecação: máximo de 8 % (mim); cinzas: máximo de 5% (mim); cera: máximo de 25 % (mim); compostos fenólicos: mínimo 5 % (mim); flavonoides: mínimo de 0,5 %(m/m); atividade de oxidação: máximo de 22 segundos; massa mecânica: máximo 40% (mim); solúveis em etanol: mínimo de 35% (m/m).

Em análise qualitativa usando espectrofotométrica de absorção de radiações ultravioleta e visível, a própolis deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonoides entre 200 e 400 nm.

## 2.8 Método extrativo da própolis (soxhlet)

A utilização do soxhlet tem como objetivo o desenvolvimento do processo de extração, para obter os extratos naturais. Compostos biologicamente ativos podem ser extraídos usando técnicas convencionais como a extração com uso do soxhlet (BISCAIA, 2007). Na figura 5 pode-se observar a extração da própolis verde, vermelha e marrom, com utilização do soxhlet.

Figura 5 - Extração de própolis verde, marrom e vermelha.



Fonte: Autores.

Com uso do soxhlet, a matéria prima é extraída com um solvente aquecido, sob refluxo contínuo. Para este tipo de extração, é importante dizer que ocorre uma economia do solvente utilizado para extração, pois necessita uma quantidade pequena de solvente. A utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos é cara e graças a esse método pode-se economizar muito no consumo desses solventes orgânicos (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Sendo assim, a qualidade e composição desses produtos estão relacionadas às técnicas de extração utilizadas para extrair produtos naturais. As indústrias

farmacêutica e alimentícia normalmente extraem compostos biologicamente ativos por meio de procedimentos de extração usando o soxhlet. Esse método denominado como extração tradicional, quando realizado em alta temperatura por muito tempo, pode levar à degradação térmica do composto alvo e ainda podem ocorrer problemas de toxicidade devido à existência de solventes orgânicos residuais no produto (BISCAIA, 2007).

Nessas extrações utilizam-se diversos tipos de solventes, como metanol, acetato de etila, propanol, hexano, clorofórmio, acetona, etanol, entre outros (BISCAIA, 2007).

Alguns fatores podem afetar a produtividade e a composição da própolis verde no sudeste do Brasil foram avaliados por estudos realizados. Na extração usando o soxhlet, utilizou-se etanol e água destilada como solventes e foi colocado a 60°C por 24 horas. O rendimento da própolis cresceu com o aumento do teor de etanol no solvente e esse aumento foi estabilizado com mais de 70% de etanol. Portanto, a extração usando o soxhlet, nas condições detalhadas, tem como benefício diminuir o tempo de extração e aumentar o rendimento do produto (CUNHA *et al.*, 2004).

## **2.9 Análise espectrofotométrica**

A própolis não é empregada como matéria-prima bruta, primeiramente os seus componentes são extraídos com solvente adequado. Este procedimento deve retirar materiais inertes (resinas, ceras e materiais insolúveis) e conservar os compostos biologicamente ativos, principalmente os compostos fenólicos (ZEGGIO, 2016).

A mensuração da concentração do grupo do composto ativo é mais relevante do que a análise dos componentes individualmente, pois até o momento nenhum composto isolado mostrou ser tão eficaz quanto o extrato utilizado em sua totalidade (BANKOVA, 2005).

A variedade química encontrada na própolis torna a comparação de amostras de origem praticamente igual à comparação de extratos de diferentes famílias. Por isso, para que a própolis seja formalmente aceita no sistema de

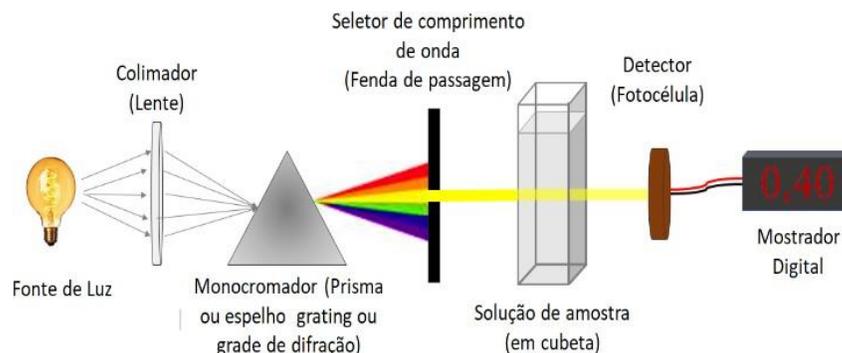
saúde, devem ser criadas ferramentas de caracterização química que garantam sua eficácia, segurança e qualidade (BANKOVA, 2005).

Como a própolis é um material cuja composição química é complexa, é necessário desenvolver métodos analíticos rápidos, robustos e de baixo custo, capazes de diferenciar amostras de várias origens e composição química (WATSON *et al.*, 2006; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Para isso, diversos estudos têm sido realizados para caracterizar a própolis, empregando métodos analíticos não seletivos como a espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014; TOMAZZOLI, *et al.*, 2015), espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

Os métodos espectrofotométricos para realizar análises de extrato de própolis foram projetados especificamente para quantificar as três principais classes de compostos fenólicos encontrados na própolis europeia: compostos fenólicos totais, flavonas e flavonóis (POPOVA *et al.*, 2004).

A espectrofotometria, método aplicado para quantificar flavonoides totais é baseada nas características dos cátions de alumínio de gerar complexos estáveis com flavonoides, com deslocamento para sua absorção aumentada e comprimentos de onda maiores. Assim, pode-se determinar o teor de flavonoides na amostra, impedindo a intervenção de outros componentes fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos (FUNARI; FERRO, 2006). A figura 6 apresenta um esquema do funcionamento interno do espectrofotômetro.

**Figura 6 - Representação do funcionamento interno do espectrofotômetro.**



Fonte: (MARTINEZ, 2014).

A absorvância é calculada pelo equipamento pelo log da razão entre a intensidade de energia fornecida pela intensidade de energia transmitida pela amostra ( $A = \log(I_0/I)$ ).

A linearidade de um procedimento expressa a faixa na qual o sinal analítico, aplicado a variável dependente  $y$ , é linearmente proporcional à sua concentração, aplicado a variável independente  $x$ , e a equação matemática que representa esta dependência é denominada como curva analítica ou curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004).

Matematicamente, a hipótese dos coeficientes de uma curva analítica desde um conjunto de medições experimentais pode ser elaborada utilizando a técnica matemática conhecida como regressão linear (RIBANI *et al.*, 2004). Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é permitido calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação  $r$ . Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é estimado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA orienta um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

Em qualquer método instrumental, a relação linear simples, é descrita pela equação 1:

$$Y = a.x + b$$

Onde:

a – Coeficiente angular

b – Coeficiente linear

y – Variável dependente (absorbância)

x – Variável independente (concentração)

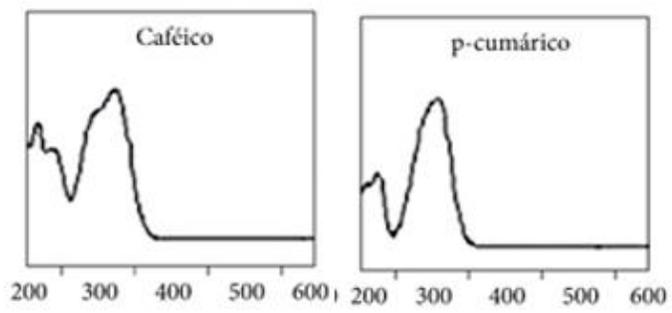
## 2.10 Espectrometria UV-VIS

As moléculas interagem com a luz a partir dos grupos cromóforos (ex: duplas ligações conjugadas) em comprimento de onda específicos. Cada molécula apresenta um espectro de absorção característico. No espectro UV-VIS as moléculas interagem no intervalo de comprimento de onda entre 200-600 nm, essa energia fornecida é suficiente para provocar transição eletrônica de um nível fundamental para o excitado que posteriormente volta ao estado de repouso liberando energia (ROSA *et al.*, 2019).

Lâmbida é o comprimento de onda fornecido pelo equipamento e o lâmbida máximo consiste no comprimento de onda em que a amostra absorve maior quantidade de energia.

A figura 7 apresenta o espectro de absorção dos padrões de ácidos fenólicos entre 200 a 600 nm.

**Figura 7 - Representação do espectro de absorção dos padrões de ácidos fenólicos entre 200 a 600 nm.**



Fonte: (MIRA *et al.*, 2008).

### 2.11 Análise por HPLC/CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/CLAE) é um método utilizado em análises de química analítica, que tem por objetivo separar compostos químicos em solução, a fim de identificar e quantificar os componentes presente em uma mistura. O botânico russo Mikhail S. Tswett definiu a cromatografia líquida no início de 1900, desde então, é considerado o pai da cromatografia. Em seu primeiro artigo publicado abordando a cromatografia líquida, ele usou o processo de separação de compostos extraídos de plantas, no qual foi utilizando solventes em uma coluna empacotada com partículas de carbonato de cálcio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Em 1950, como alternativa foi introduzido a camada fina de sílica, que um tempo mais tarde ficou conhecida como cromatografia de camada delgada. Por volta de 1940, com o avanço de estudos relacionados à cromatografia em coluna, os Martin e Synge, ganharam o prêmio Nobel, elaborando o modelo da cromatografia líquida-líquida (PACHECO; BORGUINI *et al.*, 2015)

A cromatografia tem como princípio básico a separação de misturas, onde os componentes que se deseja ser separados são divididos entre duas fases: fase estacionária e fase móvel. Entre os diversos tipos de cromatografia, a que vem sendo amplamente utilizada na bioquímica e análises de separação,

identificação e quantificação de compostos ativos é a cromatografia líquida de alta eficiência (DOLAN; SNYDER, 1989).

O tempo de retenção é o tempo gasto por uma substância desde o momento em que ela é injetada até o instante em que é detectada no local da saída do sistema. O tempo em que uma substância fica no HPLC/CLAE, seja diluído na fase móvel, seja retido na fase estacionária é denominado o tempo de retenção.

O primeiro sinal do cromatograma indica o tempo gasto pelas moléculas da fase móvel até alcançar o detector. Esse tempo é denominado de tempo morto, e em geral, é determinado por composto que estão presente na mistura que não são retidos na fase estacionária. Para se determinar quais são os tempos de retenção corrigidos, é necessário conhecer o tempo morto, pois a correção pode ser feita subtraindo seu valor do valor do tempo de retenção (DOLAN; SNYDER, 1989).

A bomba é o mecanismo mais importante do equipamento. O tipo de bomba mais comum usa uma câmara com um pistão dentro e é de longe o mais usado em quase 100% dos equipamentos HPLC/CLAE disponíveis comercialmente. O pistão possui um ciclo de enchimento e esvaziamento da câmara, juntamente com a ação de um mecanismo de válvula localizado na entrada e saída da câmara.

A parte mais importante para o funcionamento de um HPLC/CLAE de alta eficiência é a coluna, pois ela irá assegurar a eficácia da análise cromatográfica, a escolha do tipo de coluna depende da natureza das substâncias a ser analisada.

Em um cromatógrafo (HPLC/CLAE) três tipos de colunas podem ser usados: saturação ou pré-colunas, colunas de guarda e colunas de separação.

Uma coluna ou pré-coluna de saturação é colocada entre a bomba e o injetor para condicionar a fase móvel. O FM saturado não ataca o FE quando ele entra na coluna de separação, prolongando assim sua vida útil. A coluna de proteção é colocada entre o injetor e a coluna de separação para proteger a coluna

de separação e aumentar sua vida útil. Deve ser preenchido com a mesma fase estacionária da coluna de separação.

As colunas de separação são os blocos básicos de construção do HPLC/HPLC e são responsáveis por separar os componentes presentes na amostra analisada. Colunas de 2 mm são mais comumente usadas para HPLC de pressão ultra-alta, colunas de 4-6 mm são usadas para a grande maioria das aplicações de HPLC e colunas de cerca de 21 mm de diâmetro são usadas para HPLC/HPLC semi-preparativa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O comprimento da coluna pode variar entre 10-13 cm ou 25-30 cm. Também é possível utilizar colunas de vidro de paredes espessas, cuja desvantagem é que não há ligação suficiente entre o vidro e o metal para suportar a alta pressão sem vazamentos.

O tamanho da partícula está diretamente relacionado à eficiência da coluna em HPLC/HPLC. Quanto menores forem as partículas de empacotamento da coluna, maior será a pressão da coluna no sistema. Da mesma forma, quanto menores as partículas do recheio da coluna, mais finos os picos e melhor o efeito de separação. Além de reduzir o tamanho das partículas do recheio, a redução do diâmetro interno da coluna também melhora a eficiência do sistema. (LANÇAS, 2010).

Entre os métodos analíticos usados, calcula-se que o HPLC/CLAE seja usado por 90% dos laboratórios por todo o mundo. Nos métodos de fase reversa usados em HPLC/CLAE é utilizado a fase estacionária que apresenta menor polaridade e a fase móvel que apresenta maior polaridade, enquanto, em fase normal, as polaridades são opostas.

A fase reversa contempla diversas vantagens, como o uso de fases móveis que são menos tóxicas e apresenta um custo reduzido, como por exemplo, o metanol e água. Além disso, as fases estacionárias apresentam mais estabilidade, resultam em maior velocidade nas análises e um tempo de retenção com maior reprodutibilidade (LANÇAS, 2010).

### 3 OBJETIVOS

Identificar, comparar e quantificar os principais marcadores bioativos presentes na própolis verde, vermelha e marrom através de análises sensoriais, físico-químicas, espectrofotometria de UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC).

- Realizar análise de autenticidade: aspecto, cor, aroma, sabor, consistência e granulometria;
- Obter os extratos das própolis vermelha, marrom e verde a partir do material *in natura*, por método extrativo a quente, usando o soxhlet;
- Executar ensaios físico-químicos e sensoriais usando as amostras produzidas;
- Identificar e quantificar os marcadores bioativos (quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides totais) da própolis vermelha, verde e marrom através de espectrometria de UV;
- Separar e identificar os compostos da própolis vermelha, verde e marrom por método cromatográfico (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE/HPLC);

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

As análises desenvolvidas tiveram por objetivo avaliar comparativamente amostras de própolis verde, marrom e vermelha cedidas pela empresa Apis Flora Indústria e Comércio Ltda., a partir do desenvolvimento das seguintes técnicas de análise:

### **4.1 Análises organolépticas**

Os testes para avaliar as características organolépticas foram realizados conforme a metodologia validada da Apis Flora. Para avaliarmos a textura da amostra utilizamos o sentido do tato, no qual verificamos a maleabilidade. Visualmente avaliamos a cor e a uniformidade dos grânulos. Em seguida, utilizamos o sentido do olfato para avaliarmos o aroma característico e o sentido do paladar para avaliarmos o sabor característico. Avaliamos também, a presença ou ausência materiais estranhos à própolis, tais como pedaços de madeira, terra ou favos da colmeia.

### **4.2 Obtenção dos extratos de própolis**

Obteve-se uma solução estoque através da extração exaustiva por soxhlet. Para a extração, pesou-se cerca de 3,50 g da própolis bruta, previamente congelada e devidamente triturada, em um cartucho do extrator de soxhlet, devidamente seco e tarado em uma balança. Procedeu-se a extração adicionando 100 mL de etanol 96% v/v em balão de fundo chato. Processo extrator ocorreu por 4-6 horas. Em seguida, deixou-se a solução em béquer, refrigerando em freezer por 24 horas. Transcorrido este período, filtrou-se a solução em papel filtro, previamente seco e tarado, o filtrado foi recolhido em balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume e reservou o extrato.

### **4.3 Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas deste estudo, foram realizadas conforme os métodos analíticos validados pela empresa Apis Flora Indústria e Comércio Ltda., o qual se baseou nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ).

#### **4.3.1 Porcentagem de substâncias solúveis em etanol**

Em um vidro de relógio devidamente seco em estufa a 100°C por 2 horas em seguida esfriado em dessecador, anotou-se o peso do vidro de relógio vazio. Em seguida, foi pesado 3,50 g da solução estoque neste vidro de relógio anotando o peso da amostra mais o vidro de relógio. Colocou-se em estufa a 100°C por 3 horas. Transcorrido este período, resfriou-se em dessecador por 15 minutos, anotou-se o peso. Repetiu-se esse processo até alcançar peso constante. Anotou-se o peso para realizar o cálculo. Foi calculada a razão do resíduo sobre a amostra pesada (g). Para obtenção do resultado em mg/ml, multiplicou o resultado obtido por 1000 e pela densidade. Em seguida, foi multiplicado por 10 e dividiu pela massa utilizada na obtenção da solução estoque (3,5g), para se obter o resultado em % m/m.

#### **4.3.2 Porcentagem de cera**

Secou-se o papel filtro que foi utilizado na filtração da solução estoque em um vidro de relógio devidamente seco em estufa de 100-105°C por 1h e tarado. Transferiu-se o vidro de relógio para dessecador e deixou-se esfriar por 15-20 minutos. Foi calculado a porcentagem de cera em relação à massa utilizada para fazer a solução estoque (3,50g).

#### 4.3.3 Porcentagem de massa mecânica

Secou-se o cartucho utilizado na extração por soxhlet em estufa por 2 horas. Remove-se esse resíduo para um vidro relógio e pesou-se. Em seguida, calculou-se a quantidade de resíduo seco em porcentagem em relação à massa da amostra inicial utilizada para fazer a solução estoque (3,50 g).

#### 4.3.4 Porcentagem de umidade

Em um vidro relógio previamente seco em estufa a 100°C – 105°C pesou-se o vidro relógio vazio e anotou-se peso (P1). Em seguida, no mesmo vidro relógio, pesou-se cerca 2 g da amostra previamente triturada (P2). A amostra foi distribuída de maneira uniforme no vidro de relógio e submetida em uma estufa a 100°C – 105°C por 3 horas. Transcorrido este período, deixou-se esfriar por 15-20 minutos em um dessecador. Em seguida, pesou-se e anotou-se o peso (P3). Repetiu-se o procedimento até alcançar peso constante. Foi efetuado os seguintes cálculos:

Equação 2:

$P2 - P1 =$  Peso da amostra inicial

$P3 - P1 =$  Peso da amostra após a estufa

2º Cálculo

$$\frac{\text{Peso da amostra após a estufa}}{\text{Peso da amostra inicial}} \times 100 \% = \text{Umidade \%}$$

3º Cálculo

$\text{Umidade \%} - 100 = \text{Umidade \% m/m}$

Em que: P1= Peso do vidro relógio vazio

P2= Peso da amostra inicial

P3= Peso da amostra após a estufa

#### 4.3.5 Porcentagem de flavonoides totais

Para doseamento dos compostos flavonoides totais procedemos com o preparo do padrão da seguinte forma: em um balão volumétrico de 10 ml, pipetou-se 1 ml da solução de quercetina 2 mg/ml. Em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico com metanol e homogeneizou-se. Logo após, pipetou-se para um balão volumétrico de 25 ml, 1 ml desta solução e acrescentou-se cerca de 10 ml de metanol. Com auxílio de uma pipeta transferiu-se 0,5 ml de  $\text{AlCl}_3$  5% p/v e completou-se o volume com metanol P.A.

Em dois balões volumétricos de 25 ml, identificados como 1 e 2, pipetou-se em sequência, 0,30 e 0,40 ml (V) da amostra do extrato de própolis, acrescentou-se 0,50 ml de metanol PA, 0,50 ml de  $\text{AlCl}_3$  5% p/v e completou-se o volume com metanol P.A.

Foi homogeneizado as soluções e deixou-se em repouso em um local escuro, por 30 minutos. Após decorrido esse período, realizou-se a leitura das amostras no espectrofotômetro em 425 nm, usando metanol P.A. como branco (AA/AP). Em seguida, calculou-se:

Equação 3:

$$\text{Cálculo: mg/mL} = \frac{Aa \times mp}{Ap \times V}$$

Em que: Aa = absorvância da amostra  
 V = volume da amostra (ml)  
 mp = massa de padrão em mg (0,2)  
 AP = absorção do padrão

NOTA: se o valor de Aa for maior que 1, dilua 5mL do extrato para 10mL com etanol 96%, reinicie o teste e multiplique o resultado por 2.

$$\text{mg/g} = \frac{\text{mg / mL} \times 100}{P1}$$

Em que: P1= peso inicial da amostra (g)

$$\% \text{ m/m} = \frac{\text{mg / g}}{10}$$

#### 4.3.6 Porcentagem de fenóis totais

Para doseamento dos compostos fenóis totais procedemos com o preparo da solução mãe da seguinte forma: transferiu-se 25 mg do padrão de ácido gálico em um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água destilada. Adicionou-se 20 ml de água destilada em um balão volumétrico de fundo chato de 50 ml, em seguida transferiu-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica 1 ml da solução mãe (concentração do padrão-CP= 0,005 mg/ml).

Preparo da amostra: Transferiu-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica 2 ml do extrato da amostra em um balão volumétrico de 50 ml, completou-se o volume com água destilada e filtrou-se. Deste filtrado transferiu-se para um outro balão volumétrico de 50 ml com auxílio de uma pipeta volumétrica, 1 ml do filtrado e acrescentou-se 20 ml de água destilada.

Preparo do branco: em um balão de 50 ml, pipetou-se 2 ml de etanol 70 % v/v e completou-se o volume com água destilada.

Em seguida, transferiu-se 1 ml desta solução para um outro balão volumétrico de 50 ml com auxílio de uma pipeta volumétrica e adicionou-se 20 ml de água destilada.

Nos balões contendo a amostra, o branco e o padrão, protegidos da luz, adicionou-se 2,5 ml do reagente de Folin Denis e 5,0 ml de uma solução saturada a 35 % p/v de carbonato de sódio, em seguida, completou-se o volume dos balões com água destilada e deixou em repouso por exatamente 30 minutos ao abrigo da luz. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 760 nm. Em seguida, calculou-se:

Equação 4:

$$\% \text{ m/m} = \frac{AA \times CP \times 250 \times 100}{AP \times P1 \times V1}$$

Em que: AA = absorvância da amostra a 760 nm  
 CP = Concentração do padrão em mg/mL = 0,005 mg/mL  
 P1 = massa (g) da amostra utilizada para extração  
 AP = absorção do padrão  
 V1 = volume reacional da amostra

### Preparo da solução de Folin Denis

Pesou-se 10 g de tungstato de sódio e 2 g de ácido fosfomolibdico e transferiu-se para balão volumétrico de 250 ml e acrescentou-se 5 ml de ácido fosfórico concentrado e adicionou-se 50 ml de água destilada e homogeneizou-se até dissolver os compostos completamente. Em seguida, acrescentou-se 25 ml de água destilada. Submeteu à sistema de refluxo sob aquecimento por 2h. Após o tempo decorrido, filtrou-se a solução em balão de 100 ml e completou-se o volume com água destilada.

### Preparo do Reagente Carbonato de Sódio 35,0% (p/v)

Pesou-se 35 g de carbonato de sódio anidro em um béquer de 250 ml, em seguida, adicionou-se 100 ml de água destilada. Submeteu-se o béquer com o composto à temperatura de 70-80°C até dissolver completamente. Após esfriar, foi deixado em repouso por 24 horas (a solução tornou-se transparente com depósito de sal no fundo). Após esse tempo filtrou se em papel filtro.

#### **4.3.7 Atividade de oxidação**

A propriedade antioxidante pode ser estimada com os procedimentos descritos abaixo:

Pipetou-se 2 ml do extrato em um béquer de 100 ml, e adicionou 48 ml de água destilada e homogeneizou-se com auxílio de um bastão.

Pipetou-se em seguida, 0,5 ml do diluído + 1,5 ml de água destilada + 1 ml de ácido sulfúrico 20 % v/v, em um tubo de ensaio de 15 ml, previamente lavado com sulfocrômica e seco. Homogeneizou-se e resfriou-se em banho de gelo a 18-20°C.

Depois de atingida esta temperatura, retirou-se os tubos de ensaio do banho de gelo em seguida, pipitou se 50 microlitros de  $\text{KMnO}_4$  0,02M na borda do tubo agitando, ao mesmo tempo cronometrando, até que a cor avermelhada do permanganato desapareça usando um fundo branco como contraste. Anoto se o tempo decorrido.

#### 4.3.8 Porcentagem de cinzas

Secou-se o cadinho em mufla a ( $300^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos, após, deixou-se esfriar em dessecador até a temperatura de 25 graus, após isso pesou-se o cadinho ( $P_0$ ). Pesou-se neste cadinho, 2,0g da amostra de própolis ( $P_1$ ). Colocou-se a amostra na mufla a  $300^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos em seguida, alterou-se a temperatura para  $600^{\circ}\text{C}$  e deixou se por 90 minutos até que se formasse cinzas brancas ou levemente acinzentadas. Colocou se no dessecador e pesou-se ( $P_2$ ). Em seguida, calculou-se:

Equação 5:

Cálculo:

$$\% \text{ de cinzas (g)} = \frac{(P_2 - P_0) \times 100}{(P_1 - P_0)}$$

Onde:  $P_0$  = peso do cadinho vazio

$P_1$  = peso do cadinho + amostra inicial

$P_2$  = peso do cadinho + amostra calcinada

#### 4.4 Análise por HPLC/CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

As realizar as análises dos compostos presentes nas amostras de própolis foram estabelecidas as condições ideais das fases cromatográficas, conforme apresentado na tabela 1. Para o desenvolvimento dessa análise foi utilizada a metodologia validada pela Apis Flora.

Tabela 1 - Condições cromatográficas para análise por HPLC/CLAE.

Fase Estacionária		
Coluna cromatográfica: C18 (Shim-pack, CLC-ODS (M), 25 cm x 4,6)		
Detector: 275 nm	Temperatura da coluna: 40°C	
Fase móvel		
Fluxo da fase móvel: 0,8 mL/ min	Fase A: água acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v	Fase B: Metanol
Volume de injeção: 10 µL		
Tempo (min)	Solvente (%)	
	Metanol	Água Acidificada
0	20	80
70	95	5
75	20	80
77	20	80

Fonte: dos autores.

Pesar, em balão de 10 ml, 800 mg do extrato de própolis. Em seguida, acrescentou-se 5 ml de metanol e completou-se o volume do balão com uma solução de ácido fórmico 0,1 %.

Logo, homogeneizou-se e filtrou-se a solução em papel filtro de 0,45 µm.

Pipetou-se uma alíquota 1 ml para um vial e colocar no batch do HPLC, para realizar a injeção.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises realizadas em amostras de própolis verde, marrom e vermelha estão sumarizados abaixo.

### 5.1 Análises organolépticas e físico-químicas

Nas tabelas 2, 3 e 4 são apresentados os valores obtidos das análises físico-químicas nas amostras de própolis.

**Tabela 2 - Valores das análises organolépticas e físico-químicas da própolis verde.**

Parâmetro	Resultado	Especificação
Aspecto	Conforme	Pós ou pedaços heterogêneos isentos de misturas mecânicas contaminantes
Aroma	Conforme	Balsâmico e resinoso dependendo da origem botânica
Cor	Esverdeada	Amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica
Sabor	Conforme	Suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica
Consistência	Conforme	À temperatura ambiente maleável a rígida, dependendo da origem botânica
Granulometria	Conforme	Heterogênea
Porcentagem de umidade	4,94	Máximo de 8 % m/m
Porcentagem de cinzas	2,87	Máximo de 5% m/m
Porcentagem de cera	11,88	Máximo de 25 % m/m
Porcentagem de fenóis totais	12,15	Mínimo 5 % m/m
Porcentagem de flavonoides totais	2,87	Mínimo de 0,5 % m/m
Atividade de oxidação	19''82	Máximo de 22 segundos
Porcentagem de massa mecânica	30,33	Máximo 40% m/m
Porcentagem de substâncias solúveis em etanol	48,97	Mínimo de 35% m/m

Fonte: Autores.

Conforme podemos observar os resultados obtidos estão conforme as especificações, como recomendado pelo RTIQ. Ressaltando que a baixa porcentagem de cinza, indica que na amostra não houve adulteração. As avaliações sensoriais estão dentro da conformidade.

**Tabela 3 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas da própolis marrom.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Especificação</b>
Aspecto	Conforme	Pós ou pedaços heterogêneos isentos de misturas mecânicas contaminantes
Aroma	Conforme	Balsâmico e resinoso dependendo da origem botânica
Cor	Marrom	Amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica
Sabor	Conforme	Suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica
Consistência	Conforme	À temperatura ambiente maleável a rígida, dependendo da origem botânica
Granulometria	Conforme	Heterogênea
Porcentagem de umidade	4,5	Máximo de 8 % m/m
Porcentagem de cinzas	2,58	Máximo de 5% m/m
Porcentagem de cera	22,35	Máximo de 25 % m/m
Porcentagem de fenóis totais	5,52	Mínimo 5 % m/m
Porcentagem de flavonoides totais	0,88	Mínimo de 0,5 % m/m
Atividade de oxidação	21"10	Máximo de 22 segundos
Porcentagem de massa mecânica	21,02	Máximo 40% m/m
Porcentagem de substâncias solúveis em etanol	40,91	Mínimo de 35% m/m

Fonte: Autores.

Nos resultados das análises da própolis marrom podemos observar que a concentração de flavonoides e compostos fenólicos é baixa, próximo ao limite inferior, fato normal para este tipo de própolis e a quantidade de cera e cinzas está dentro dos limites de tolerância e o teor de solúveis em etanol está dentro dos níveis aceitáveis de concentração. As avaliações sensoriais estão dentro da conformidade.

**Tabela 4 - Resultados das análises organolépticas e físico-químicas da própolis vermelha**

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Especificação</b>
Aspecto	Conforme	Pós ou pedaços heterogêneos isentos de misturas mecânicas contaminantes
Aroma	Conforme	Balsâmico e resinoso dependendo da origem botânica
Cor	Avermelhada	Amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica
Sabor	Conforme	Suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica
Consistência	Conforme	À temperatura ambiente maleável a rígida, dependendo da origem botânica
Granulometria	Conforme	Heterogênea
Porcentagem de umidade	4,74	Máximo de 8 % m/m
Porcentagem de cinzas	1,52	Máximo de 5% m/m
Porcentagem de cera	17,05	Máximo de 25 % m/m
Porcentagem de fenóis totais	9,93	Mínimo 5 % m/m
Porcentagem de flavonoides totais	6,78	Mínimo de 0,5 % m/m
Atividade de oxidação	21"30	Máximo de 22 segundos
Porcentagem de massa mecânica	25,35	Máximo 40% m/m
Porcentagem de substâncias solúveis em etanol	49,50	Mínimo de 35% m/m

Fonte: Autores.

Podemos observar que os resultados obtidos estão conforme as especificações recomendadas pelo RTIQ. A concentração de cera e cinzas também está dentro dos limites aceitáveis, não havendo possibilidade de adulterantes na amostra. O teor de solúveis em etanol também está em nível aceitável, evidenciando boa extração pelo processo realizado.

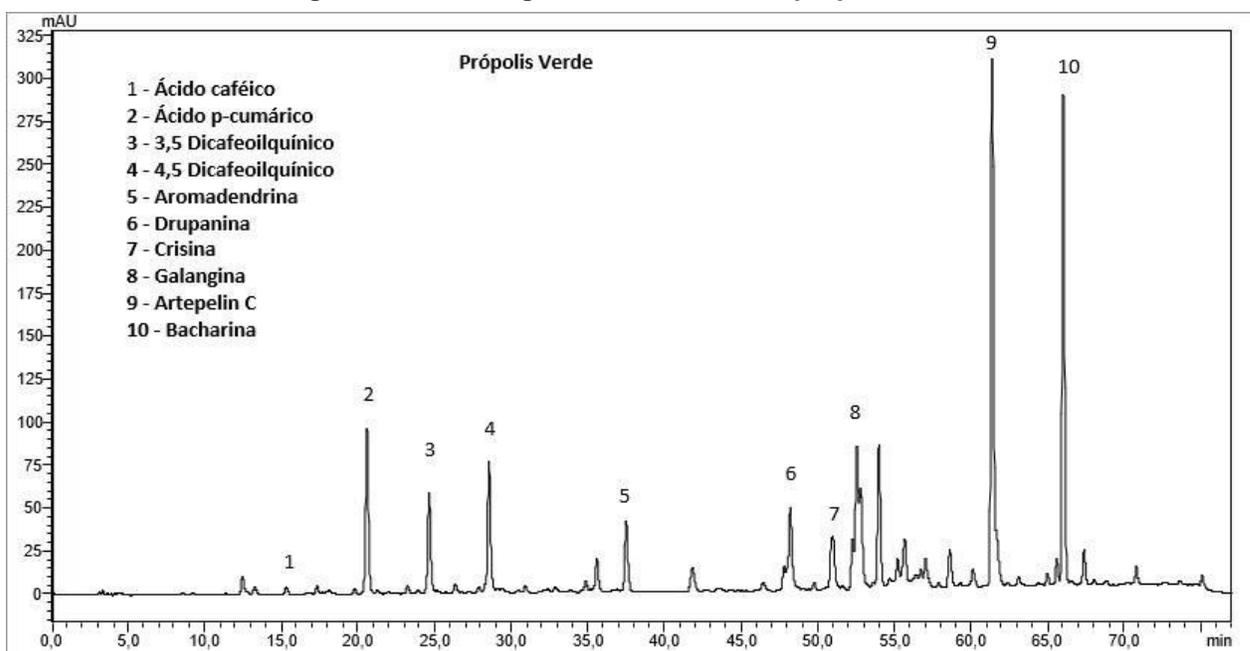
As avaliações sensoriais estão dentro da conformidade, conforme apresentado na tabela 4.

Em destaque, observamos que esse tipo de própolis apresenta uma alta concentração de flavonoides e compostos fenólicos em relação à própolis verde e marrom, característica típica deste tipo, devido a fatores relacionados à região de origem.

## 5.2 Análises cromatográficas e espectrométricas

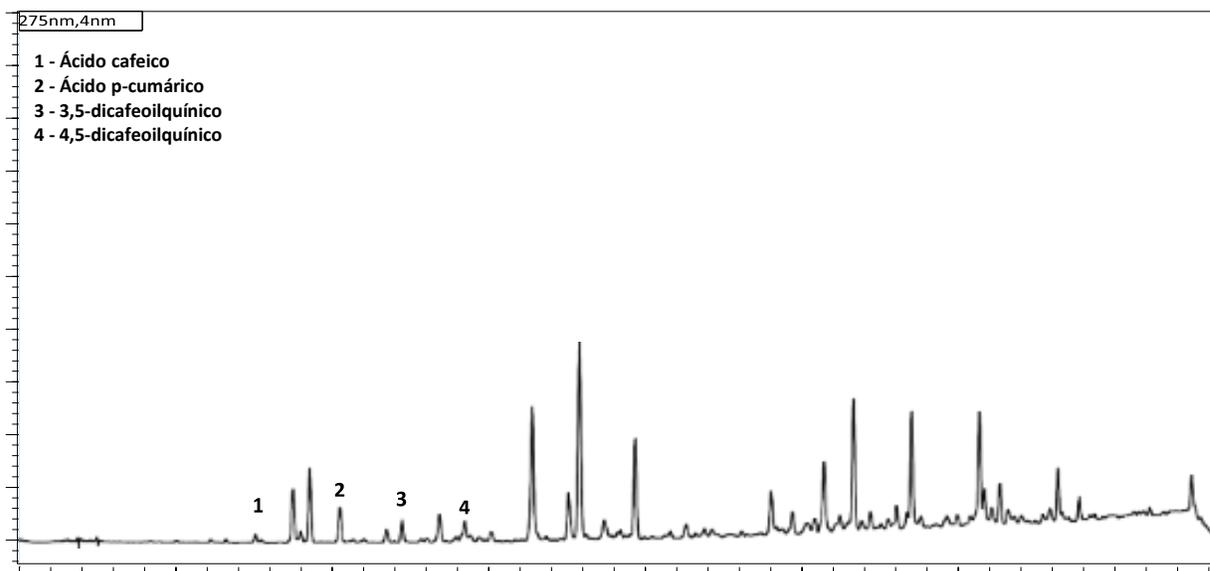
Nas figuras 8, 9 e 10 são apresentados os cromatogramas obtidos nas análises realizadas por HPLC/CLAE, onde se observam a identificação dos picos dos principais compostos presentes em cada uma das amostras de própolis.

Figura 8 - Cromatograma da amostra de própolis verde



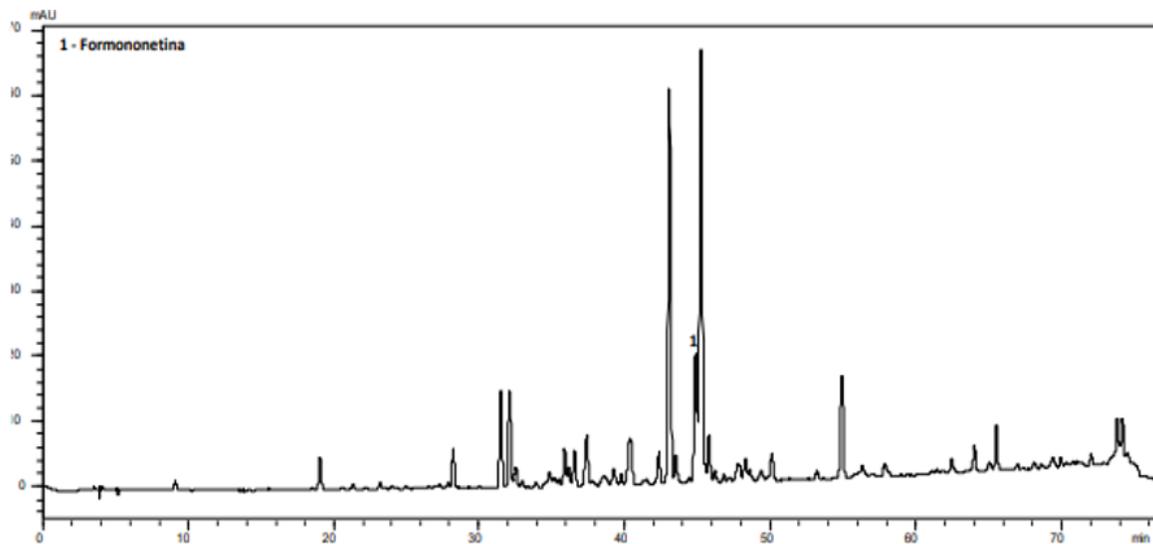
Fonte: Autores

Figura 9 - Cromatograma da amostra de própolis marrom



Fonte: Autores

Figura 10 - Cromatograma da amostra de própolis vermelha



Fonte: Autores

Na tabela 5 estão relacionados os tempos em minutos, da retenção dos marcadores e seus respectivos comprimentos de onda UV máximos absorvidos pelos principais componentes da própolis.

**Tabela 5 – Relação dos principais marcadores encontrados na própolis e seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda máximos absorvidos no UV-VIS**

<b>Padrão</b>	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Lambdas máx.</b>
ácido cafeico	15,00	210 / 323 / 737 / 768 / 565
ácido p-cumárico	20,50	309 / 210 / 735 / 768 / 426
3,4 dicafeoilquínico	24,10	195 / 325 / 244 / 658 / 470
3,5 dicafeoilquínico	24,40	213 / 328 / 736 / 769 / 581
rutina	27,50	206 / 256 / 355 / 767 / 735
4,5 dicafeoilquínico	28,20	213 / 328 / 737 / 656 / 485
3,4,5 tricafeoilquínico	30,70	212 / 330 / 737 / 472
ácido cinâmico	35,50	208 / 194 / 276 / 485 / 426
quercetina	36,20	255 / 369 / 485 / 592 / 685
aromadendrina	37,00	199 / 213 / 291 / 656 / 485
drupanina	48,00	197 / 315 / 233 / 655
kaempferol	52,30	197 / 309 / 235 / 655 / 485
artepelin c	61,60	193 / 315 / 237 / 485 / 581
bacharina	65,70	198 / 280 / 659 / 468 / 639

Fonte: Apis Flora.

A tabela 6 apresenta as equações da reta, com os seus respectivos coeficientes angular e linear, para os principais marcadores encontrados na própolis verde e marrom, obtidos a partir da validação analítica da metodologia Apis Flora, conforme descrito em AF-I-14 e AC-I-7 para quantificação desses analitos. Nas tabelas 7e 8 apresenta a relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração dos compostos presente na amostra de própolis verde e marrom.

**Tabela 6 - Relação dos marcadores presentes na própolis verde e marrom com os seus respectivos coeficientes angular e linear**

<b>Marcador</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
ácido cafeico	$y = 30206 x - 5144$	30206	5144
ácido p-cumárico	$y = 54397 x - 23540$	54397	23540
3,5 dicafeoilquínico	$y = 18942 x - 44655$	18942	44655
Rutina	$y = 9677,4 x - 4151,2$	9677,4	4151,2
4,5 dicafeoilquínico	$y = 15827 x - 13446$	15827	13446
ácido cinâmico	$y = 111914 x - 4065,4$	111914	4065,4
quercetina	$y = 25320 x + 8573$	25320	8573
aromadendrina	$y = 23304 x - 4193$	23304	4193
drupanina	$y = 26870 x - 36385$	26870	36385
crisina	$y = 66663 x - 3433,7$	66663	3433,7
galangina	$y = 34798 x - 17489$	34798	17489
artepelin c	$y = 15984 x - 16698$	15984	16698
bacharina	$y = 49810 x - 39607$	49810	39607

Fonte: Apis Flora.

Analisando os resultados da tabela 7, observa-se que a própolis verde, comum na região sul e sudeste, principalmente na região de Minas Gerais, possui elevada concentração dos compostos fenólicos, que confere a esta variedade de própolis um dos materiais mais ricos em termos nutricionais, sendo exportada para países da Ásia, Estados Unidos e Europa. Na análise química, as concentrações elevadas de flavonoides e compostos fenólicos totais confirmam uma de suas características. Observa-se a presença de altas concentrações de Artepelin-C e Bacharina, as quais são marcadores químicos para este tipo de própolis.

**Tabela 7 - Relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração dos compostos presentes na amostra de própolis verde**

Marcador	Equação da Reta	a	b	Massa Soxlet (g)	Densidade	massa (mg)	Área	Conc. (mg/g)	Conc. (% m/m)
Acido caféico	$y = 30206x - 5144$	30206	5144				49657	0,508	<b>0,051</b>
Acido p-cumárico	$y = 54397x - 23540$	54397	23540				1241749	6,517	<b>0,652</b>
3,5 Dicafeoilquinico	$y = 18942x - 44655$	18942	44655				725070	11,385	<b>1,138</b>
4,5 Dicafeoilquinico	$y = 15827x - 13446$	15827	13446				982107	17,623	<b>1,762</b>
Aromadendrina	$y = 23304x - 4193$	23304	4193				533704	6,467	<b>0,647</b>
Drupanina	$y = 26870x - 36385$	26870	36385	3,551	0,815	819,19	827304	9,006	<b>0,901</b>
Crisina	$y = 66663x - 3433,7$	66663	3434				591028	2,498	<b>0,250</b>
Galangina	$y = 34798x - 17489$	34798	17489				1175223	9,603	<b>0,960</b>
Artepelin C	$y = 15984x - 16698$	15984	16698				4018075	70,722	<b>7,072</b>
Bacharina	$y = 49810x - 39607$	49810	39607				3172818	18,069	<b>1,807</b>

Fonte: Apis Flora.

Na análise dos resultados referentes à própolis marrom (tabela 8) podemos observar concentrações bem menores de compostos fenólicos e a ausência de alguns marcadores comuns na própolis verde como, por exemplo, a Bacharina e o Artepelin C, que são bastante conhecidas pelas suas atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas.

**Tabela 8 - Relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração dos compostos presentes na amostra de própolis marrom**

Marcador	Equação da Reta	a	b	Massa Soxlet (g)	Densidade	massa (mg)	Área	Conc. (mg/g)
Ácido caféico	$y = 30206x - 5144$	30206	5144				13102	0,173
Ácido p-cumárico	$y = 54397x - 23540$	54397	23540				77807	0,532
3,5 Dicafeoilquinico	$y = 18942x - 44655$	18942	44655				46293	1,371
4,5 Dicafeoilquinico	$y = 15827x - 13446$	15827	13446				38579	0,939
Aromadendrina	$y = 23304x - 4193$	23304	4193	3,589	0,818	797,92	nd	nd
Drupanina	$y = 26870x - 36385$	26870	36385				nd	nd
Artepelin C	$y = 15984x - 16698$	15984	16698				nd	nd
Bacharina	$y = 49810x - 39607$	49810	39607				nd	nd

Fonte: Apis Flora.

Na análise da própolis vermelha foi identificada e quantificada a formononetina, através da comparação da área do pico da amostra com a área obtida pela injeção de uma solução padrão deste marcador de concentração conhecida, conforme demonstrado na tabela 9.

**Tabela 9 - Relação entre a área do pico do HPLC/CLAE com a concentração do composto presente na amostra de própolis vermelha**

Marcador	Concentração ( $\mu\text{mL}$ )	Área do Padrão	Massa (Próp. In Natura)	Densidade	Massa Extrato (mg)	Área	Conc. (mg/g)
Formononetina	74	3087405	3,566	0,817	842,91	246017	1,60

Fonte: Apis Flora.

Na análise dos resultados referentes à própolis vermelha observa-se a ausência dos marcadores encontrados nas variedades verde e marrom. Em contrapartida foi encontrada Formononetina, que é um composto fenólico (isoflavona) presente somente neste tipo de própolis.

## 6 CONCLUSÃO

As análises cromatográficas por HPLC/CLAE, espectrometria de UV, avaliações físico-químicas e análises organolépticas foram utilizadas para comparar as principais variedades de própolis (verde, marrom e vermelha) para o preparo de extratos e por meio destas avaliações pode-se concluir que todas estavam dentro dos parâmetros físico-químicos e sensoriais.

Conclui-se também, avaliando o aspecto químico, que a variedade de própolis verde apresentou maior concentração de compostos fenólicos, entre eles, os compostos isoprenilados Artepelin-C e Bacharina. Estas substâncias são típicas da espécie vegetal (*Baccharis dracunculifolia*), que foi polinizada pelas abelhas que produziram este tipo de própolis. Os testes realizados por espectrofotometria também puderam comprovar as altas concentrações de flavonoides totais e fenóis totais, se comparadas aos resultados das análises da própolis marrom, que apresentou uma concentração inferior destes

compostos, comprovada pelas em análises com HPLC, bem como com espectrofotometria.

Ao comparar a variedade de própolis vermelha podemos concluir que ela é singular, pois não apresenta nenhum dos compostos fenólicos encontrados nas outras variedades, ao passo que foi encontrada na sua composição a isoflavona Formononetina, que é um marcador para esta variedade de própolis, que é encontrada exclusivamente no Brasil, o que lhe característica singular.

## REFERÊNCIAS

AGA, H. *et al.* Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Japão, v. 58, n. 5, p. 945–946, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.58.945>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.58.945?needAccess=true>. Acesso em: 29 out. 2022.

AKAO, Y. *et al.* Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 26, n.7, p. 1057-1059, jul. 2003. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/26/7/26\\_7\\_1057/pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/26/7/26_7_1057/pdf/-char/en). Acesso em: 03 out. 2022.

ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Holanda, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007. DOI:10.1016/j.jep.2007.06.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>. Acesso em: 07 ago. 2022.

ALMEIDA, F. B. *et al.* A utilização da apitoxina na apiterapia e seus efeitos no tratamento de patologias. **ACTA Apicola Brasilica**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 16-20, jun. 2017. DOI: [10.18378/aab.v5i1.5597](https://doi.org/10.18378/aab.v5i1.5597). Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/328196432\\_A\\_utilizacao\\_da\\_apitoxina\\_na\\_apiterapia\\_e\\_seus\\_efeitos\\_no\\_tratamento\\_de\\_patologias](https://www.researchgate.net/publication/328196432_A_utilizacao_da_apitoxina_na_apiterapia_e_seus_efeitos_no_tratamento_de_patologias). Acesso em: 30 ago. 2022.

ALMUHAYAWI, M. S.. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi journal of biological sciences**, Jeddah, v. 27, n. 11, p. 3079-3086, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>. Disponível em: [Propolis as a novel antibacterial agent \(europepmc.org\)](https://www.europepmc.org/article/PMID/33079308). Acesso em: 18 set. 2022.

APIS FLORA. **Extrato de própolis verde**. 2022. Disponível em: <https://www.apisflora.com.br/extrato-de-propolis-verde>. Acesso em: 25 ago. 2022.

BANKOVA, V. *et al.* Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Bulgaria, v.54, p.401-405, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-1999-5-616>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-1999-5-616/html>. Acesso em: 13 set. 2022.

BANKOVA, V.. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Bulgaria, v.100, p.114- 117, jun. 2005. DOI: 10.1016/j.jep.2005.05.004. Disponível em: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/chemical\\_diversity\\_of\\_propolis\\_and\\_the\\_problem\\_of\\_standardization.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/chemical_diversity_of_propolis_and_the_problem_of_standardization.pdf). Acesso em: 23 set. 2022.

BAPTISTA, N. U. F.. **Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas**. 2016. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biociências Aplicada à Farmácia, Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: [https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-12122016-163541/publico/Dissertacao\\_Corrigida\\_Completa.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-12122016-163541/publico/Dissertacao_Corrigida_Completa.pdf). Acesso em: 16 nov. 2022.

BARBOSA, M. H. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul de Enferm.**, Uberaba, v.22, n.3, p. 318-322, maio/jun. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ape/a/FvCrphqjwS67zY5LvsWktSP/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 03 nov. 2022.

BARBOSA, R. A. *et al.* Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. **Pharmaceutical Biology**, Brazil, v. 54, n. 6, p. 993-1004, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2015.1091844>. Acesso em: 11 nov. 2022.

BARROSO, P. R. *et al.* Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology**, Diamantina, v. 20, n. 5, p. 289-294. 2012. DOI: 10.1007/s10787-011-0105-5. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/51898507\\_Effect\\_of\\_propolis\\_on\\_mast\\_cells\\_in\\_wound\\_healing](https://www.researchgate.net/publication/51898507_Effect_of_propolis_on_mast_cells_in_wound_healing). Acesso em: 01 ago. 2022.

BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R.. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Germany, v. 52, n. 11-12, p. 828-833, 1997. DOI: 10.1515/znc-1997-11-1217. Disponível em: [Potent Free Radical Scavenging Activity of Propol .pdf](#). Acesso em: 13 nov. 2022.

BATISTA, L. L. V. *et al.* Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Alagoas, v.39, n. 6, p. 515–20, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/GB3JGWnBshXvWTjRCdvD3Yr/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 01 nov. 2022.

BERRETTA, A. A. *et al.* Propolis standardized extract (EPP-AF (R)), na innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 512-521, mar. 2012. DOI: 10.7150/ijbs.3641. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314192/pdf/ijbsv08p0512.pdf>. Acesso em: 19 set. 2022.

BISCAIA, D.. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico, Florianópolis, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/89628/242460.pdf?sequence=1&sAllowed=y>. Acesso em: 03 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução normativa n.º 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. 19 jan. 2001. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2020/09/IN-MAPA-n%C2%BA-03-de-19-de-janeiro-de-2001.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.

BURDOCK, G. A.. Review of the biological properties and toxicity of bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, Florida, v. 36, p. 347-363, ago. 1998. DOI: 10.1016/S0278-6915(97)00145-2. Disponível em: <http://people.fmarion.edu/gprryor/propolis.pdf>. Acesso em: 20 out. 2022.

CAMPOS, R. O. P. *et al.* Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Florianópolis, v. 50, n. 10, p. 1187-1193, maio. 1998. Disponível em: [Natural Products: Antihyperalgesic Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Mice and Rats \(silverchair.com\)](https://www.silverchair.com/Natural-Products-Antihyperalgesic-Effect-of-an-Ethanolic-Extract-of-Propolis-in-Mice-and-Rats). Acesso em: 07 ago. 2022.

CARVALHO, A. M. A..Synopsis of the genus Dalbergia (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil.Brittonia. **Journal Article**, New York, v. 49, n. 1, p. 87-109, jan./mar. 1997. DOI: <https://doi.org/10.2307/2807701>. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2807701>. Acesso em: 08 nov. 2022.

CARVALHO, R. G.. **Apis mellifera; reprodução, polinização e produção de mel**. 2010. TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Faculdades Integradas Fafibe, Bebedouro, 2010. Disponível em: <https://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistabiologia/sumario/15/02032011082215.pdf>. Acesso em: 27 out. 2022.

CHAN, G. C. F.; CHEUNG, K. W.; SZE, D. M. Y.. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, China, v. 44, n. 3, p. 262-273, 2013. DOI:10.1007/s12016-012-8322-2. Disponível em: [The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis | Request PDF | ResearchGate](https://www.researchgate.net/publication/312016012-The-Immunomodulatory-and-Anticancer-Properties-of-Propolis). Acesso em: 02 ago. 2022.

CHIU, H. F. *et al.* Chemopreventive and Chemotherapeutic Effect of Propolis and Its Constituents: A Mini-review. **Journal of Cancer Prevention**. China, v. 25, n. 2, p. 870-78, jun. 2020. DOI: 10.15430/JCP.2020.25.2.70. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337007/>. Acesso em: 27 ago. 2022.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Unicamp ed. Campinas. **Editora Unicamp**, Campinas, v. 1, n. 31, p. 1-10. 2006. Disponível em: <https://idoc.pub/documents/fundamentos-de-cromatografia-carol-h-collinspdf-d4pqk70myrnp>. Acesso em: 16 nov. 2022.

Conselho Regional de Farmácia do Ceará (CFR-CE). **O que são as Práticas Integrativas e Complementares (PICS)?**; Brasil, 2019. Disponível em: <https://crfce.org.br/2019/05/16/o-que-sao-as-praticas-integrativas-e-complementares-pics/> Acesso em: 15 nov. 2022.

COSTA, P. S. C.. **Produção e Processamento de Própolis e Cera**. Viçosa: CPT, 2003.

CRUZ, F. B. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória de própolis de abelha *Apis mellifera*: uma revisão. **Research, Society and Development**, Brasília, v. 10, n. 14, p. 1-17, nov. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i14.21817. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/355828924\\_Avaliacao\\_da\\_atividade\\_anti-inflamatoria\\_de\\_propolis\\_de\\_abelha\\_Apis\\_mellifera\\_uma\\_revisao](https://www.researchgate.net/publication/355828924_Avaliacao_da_atividade_anti-inflamatoria_de_propolis_de_abelha_Apis_mellifera_uma_revisao). Acesso em: 23 set. 2022.

CUNHA, I. B. S. *et al.* Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **J. Braz Chem. Soc**, Bragança Paulista, v.15, n6, p. 964-970, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/yNqnrk9ZLNDxLV4XJXVrgFr/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 13 out. 2022.

DÍAZ-REINOSO *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> Extration and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **J. Agric. Food Chem**, American Chemical Society, v.54, p. 2441-2469, mar. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf052858j>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf052858j>. Acesso em: 27 out. 2022.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.. **Troubleshooting LC systems**. New Jersey: Humana Press, 1989.

**EUCALIPITO – A MADEIRA DO FUTURO**. Revista da Madeira (REMADE), Brasil, set. 2001. Disponível em: [http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira\\_materia.php?num=2&subject=Apicultura&title=O%20Eucalipto%20e%20a%20Apicultura](http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=2&subject=Apicultura&title=O%20Eucalipto%20e%20a%20Apicultura). Acesso em: 17 de out 2022.

FISCHER, G. *et al.* Imunomodulação pela Própolis. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 75, n.2, p. 247-253, abr./jun. 2008. DOI: 10.1590/1808-1657v75p2472008. Disponível

FONTANA, J. D. *et al.* Própolis: chemical microheterogeneity and bioactivity: therapeutic uses of this bee-product. In: Spencer JFT, Ragout De Spencer AL. Environmental microbiology: methods and protocols. **Humana Press**, Totowa, p. 203- 218. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169117305269>. Acesso em 03 ago. 2022.

FRANCIS, J.K. Wildland Shrubs of the United States and its territories: Thamnic descriptions: Volume 1. **United States. Department of Agriculture**, Puerto Rico, p.12-824. 2004. Disponível em: [https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/iitf\\_gtr026.pdf](https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/iitf_gtr026.pdf). Acesso em: 07 nov. 2022.

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 Brasil**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.343-354, abr./jun. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/DBZN7XHRdWmwM53nYFLjmhc/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, jan./mar. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/YRSX8qYyTD3dcgjnDyq6VwK/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 20 out. 2022.

GARCIA, R. C. *et al.* Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* “*in vitro*” e em coelhos. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringa, v. 26, n.1, p. 69-44. 2004. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/1952/1215>. Acesso em: 07 out. 2022.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination, **Annual Reviews of Entomology**, Australia, v. 44, p. 183-206, 1999. Disponível: [https://www.researchgate.net/profile/Tim-Heard/publication/8665983\\_The\\_role\\_of\\_stingless\\_bees\\_in\\_crop\\_pollination/links/576b618608ae5b9a62b3aaf4/The-role-of-stingless-bees-in-crop-pollination.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tim-Heard/publication/8665983_The_role_of_stingless_bees_in_crop_pollination/links/576b618608ae5b9a62b3aaf4/The-role-of-stingless-bees-in-crop-pollination.pdf). Acesso em: 07 set. 2022.

HOU, J. P. *et al.* Antioxidant activity of polyphenolic compounds from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Pakistan Journal of Nutrition**, Xangai, v. 10, p. 694-701, 2011. DOI: 10.3923/pjn.2011.694.701. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/265575925\\_Antioxidant\\_Activity\\_of\\_Polyphenolic\\_Compounds\\_from\\_Dalbergia\\_odorifera\\_T\\_Chen](https://www.researchgate.net/publication/265575925_Antioxidant_Activity_of_Polyphenolic_Compounds_from_Dalbergia_odorifera_T_Chen). Acesso em: 09 nov. 2022.

KAZEMBE, T.; MUNYARARI, E.; CHARUMBIRA, I.. Use of traditional herbal medicines to cure malaria. **B.E.P.L.S**, India, v. 1, n. 4, p. 63-85, mar. 2012. Disponível em: <https://bepls.com/march2012/12.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2022.



MARTINEZ, M. **Espectrofotômetro**. 2014. Infoescola. Disponível em: <http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>. Acesso em 15 out. de 2022.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E.. Propolis: a new frontier for wound healing. **Burns & Trauma**, Itália, v. 3, n. 9, p. 1-7. 2015. DOI: 10.1186/s41038-015-0010-z. Disponível em: [https://www.academia.edu/57467919/Propolis a new frontier for wound healing](https://www.academia.edu/57467919/Propolis_a_new_frontier_for_wound_healing). Acesso em: 27 ago. 2022.

MARTIUS, S. V.; HAMMER, K. A.; LOCHER, C. Chemical characteristics and antimicrobial effects of some Eucalyptus kinos. **Journal of Ethnopharmacology**, Australia, v. 144, n. 2, p. 293-299, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.09.011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/257228666 Chemical characteristics and antimicrobial effects of some Eucalyptus kinos](https://www.researchgate.net/publication/257228666_Chemical_characteristics_and_antimicrobial_effects_of_some_Eucalyptus_kinos). Acesso em 16 nov. 2022.

MATOSO, L. M. L.; MATOSO, M.B.L. Extrato de Própolis no Combate ao COVID-19: um Relato de Experiência em Nível da Atenção Básica em Saúde. **Ensaios e Ciência**, Rio Grande do Norte, v.25, n.1, p. 85-94. 2021. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n1p85-94>. Disponível em: <https://ensaioseciencia.pgsskroton.com.br/article/view/8780>. Acesso em: 04 nov. 2022.

MATSUNO, T.. **O efeito terapêutico da própolis**. São Paulo: Abaete, 1997.

MENDES, C. E. *et al.* Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (vell.) Britton (Fabaceae). **Quim.Nova**, Chapecó, v. 35, n. 9, p. 1787-1793, ago. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/zzHgCkgybp793xrdzYVXFgd/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 03 nov. 2022.

MENEZES, H.. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, jun./set. 2005. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72\\_3/menezes.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72_3/menezes.PDF). Acesso em: 20 out. 2022.

MIRA, N. V. M. *et al.* Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 994-1002, out./dez. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/rNL6v43k8QskHH5Wnjdr9fP/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

MOREIRA, D. R.. Apiterapia no Tratamento de Patologias, Apucarana. **Revista F@ciência**, Apucarana, v.9, n.4, p. 21-29. 2012. Disponível em: [https://www.fap.com.br/fap-ciencia/edicao\\_2012/004.pdf](https://www.fap.com.br/fap-ciencia/edicao_2012/004.pdf). Acesso em: 26 out. 2022.

MOREIRA, L. L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L.. O Apicultor. **Revista de Apicultura**, Irlanda, n. 73, p. 21-24, jul./set. 2020. Disponível em:

<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/10089/3/Apicultor%20n%20.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.

MOREIRA, T. F.. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. bras. Farmacogn**, São Paulo, v. 1, n.1, p. 12 - 19, jan./jun. 1986. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/PKBWg7hCcRzttfzQpBjtPLz/>. Acesso em: 30 out. 2022.

MOURÃO, M. L.. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. **Revista Geográfica de América Central**, Costa Rica, p. 1-15. 2011. Disponível em: <http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/cosmeticos.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2022.

NASCIMENTO, A. J. S.; SILVA, F. G. M.; BONACHELA, F. S.. A apiterapia e o veneno da abelha. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.9, p. 1-9, set. 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n9-399. Disponível em: [https://www.academia.edu/62291566/A\\_apiterapia\\_e\\_o\\_veneno\\_da\\_abelha\\_Apitherapy\\_and\\_bee\\_poison](https://www.academia.edu/62291566/A_apiterapia_e_o_veneno_da_abelha_Apitherapy_and_bee_poison). Acesso em: 26 out. 2022.

NEUWINGER, H. D. African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications with: search system for diseases. **Stuttgart: Medpharm Scientific**, Germany, p. 575-580. 2000. Disponível em: <https://searchworks.stanford.edu/view/4734986>. Acesso em: 03 nov. 2022.

NEVES, M. V. M. *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, Joao Pessoa, v. 47, n. 1, p. 159–166, jan./mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/cnFdBTdVWdWTSDjxQrqCv9G/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 14 nov. 2022.

PACHECO, S. *et al.* História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, p. 1225-1271. 2015. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/869/598>. Acesso em: 16 nov. 2022.

PAGANOTTI, R. S. N.; REZENDE, J. C.; BARBEIRA, P J S.. Discrimination between producing regions of Brazilian propolis by UV/VIS spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. **Current Analytical Chemistry**, Belo Horizonte, v. 10, n. 4, p. 537-544, out. 2014. DOI: 10.2174/15734110113099990030. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/264163144\\_Discrimination\\_Between\\_Producing\\_Regions\\_of\\_Brazilian\\_Propolis\\_by\\_UV-VIS\\_Spectroscopy\\_and\\_Partial\\_Least\\_Squares\\_Discriminant\\_Analysis](https://www.researchgate.net/publication/264163144_Discrimination_Between_Producing_Regions_of_Brazilian_Propolis_by_UV-VIS_Spectroscopy_and_Partial_Least_Squares_Discriminant_Analysis). Acesso em: 30 ago. 2022.

PARK Y. K. *et al.* Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32,n.6, p. 997–1003, 2002, ago./dez. 2001. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/gPRfFTWVqL3nbzZqY9rXfJx/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 30 out. 2022.

PICCINELLI, A. L. *et al.* Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Agr. Food Chem.**, American Chemical Society, v. 59, n. 12, p. 6484– 6491, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf201280z>. Acesso em: 09 nov. 2022.

PICOLI, T. *et al.* Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Capão do Leão, v.38, n.4, p. 365-371, out./dez. 2016. Disponível em: <https://rbmv.org/BJVM/article/view/44/33>. Acesso em: 03 nov. 2022.

POPOVA, M. *et al.* Validated methods for quantification of biologically active constituents of “poplar type” propolis. **Phytochemical Analysis**, Bulgária, n. 15, p. 235-240, 2004. DOI: 10.1002/pca.777. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/8399266> Validated methods for the quantification of biologically active constituents of Poplar-type propolis. Acesso em: 27 out. 2022.

PROKIPCHUK, A.. **Fitoterapia na doença inflamatória intestinal**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Algarve, Algarve, 2016. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/10021/1/Dissertação.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.

RIBANI, M.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/bq5SjVnnKptZkf8NnK6kqRc/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 nov. 2022.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, v. 2013, p. 1-14, jan./mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/267878>. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2013/267878.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2022.

RODRIGUES, D. M.; **Baccharis dracunculifolia: Formação de pasto apícola, estudo das interações com Apis mellifera e insetos galhadores na produção de própolis verde**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2017. Biblioteca digital de teses e dissertações da USP. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-22052018150650/publico/Dissertacao\\_corrigida\\_simplificada.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-22052018150650/publico/Dissertacao_corrigida_simplificada.pdf). Acesso em: 08 de nov. de 2022.

ROSA, C. L. *et al.* Construção de espectrofotômetro visível para fins didáticos. **Journal of Exact Sciences**, Ipatinga, v. 21, n. 1, p. 20-22, abr./jun. 2019. Disponível em: [https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190407\\_145828.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190407_145828.pdf). Acesso em: 11 nov. 2022.

SAHA, S. *et al.* Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). **Phytopharmacology**, Bangladesh, v.4, n. 2, p. 291-346, jan. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/236015007\\_Ethnomedicinal\\_phytochemical\\_and\\_pharmacological\\_profile\\_of\\_the\\_genus\\_Dalbergia\\_L\\_Fabaceae](https://www.researchgate.net/publication/236015007_Ethnomedicinal_phytochemical_and_pharmacological_profile_of_the_genus_Dalbergia_L_Fabaceae). Acesso em: 02 nov. 2022.

SALANTINO, A.; WOISKY, R.G.. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2, p. 99-105. 1988. DOI: 10.1080/00218839.1998.11100961. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001037012>. Acesso em: 13 out. 2022.

SANTOS, M. J.; VIANNA, L. D. A. C.; GAMBA, M. A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 199–204, abr./jun. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ape/a/dNJmxhJzSBSnkzrbMtS8sgs/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 01 nov. 2022.

SANTOS, R. F. *et al.* Composição Química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. Em função da adubação orgânica. **Ver. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, p. 224-234, mar. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/MYdTVxxQzg6mtbLLq5pKxfD/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, Campinas, v. 27, n. 5, p.1-10, jun. 2011. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-153X-5-27>. Acesso em: 7 out. 2022.

SAWAYA, A. C. H. F.. **Análise da Composição Química de Própolis Brasileira por Espectrometria de Massas**. 2006. 103 f. Tese (Doutorado) – Curso de Química Analítica, Universidade de Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas, 2006. DOI: <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2006.373922>. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/373922>. Acesso em: 26 out. 2022.

SAWICKA, D. *et al.* The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Bialystok, v. 50, n. 1, p. 25–37, abr. 2012. DOI: 10.5603/18693. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/307773680\\_The\\_anticancer\\_activity\\_of\\_propolis](https://www.researchgate.net/publication/307773680_The_anticancer_activity_of_propolis). Acesso em: 07 nov. 2022.

SERAFIM, M. S.. **Própolis marrom e resina de Eucalyptus botryoides da região de Bambuí-MG: isolamento de compostos fenólicos e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2019. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-19122019-081542/publico/Dissertacao\\_corrigida\\_simplificada.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-19122019-081542/publico/Dissertacao_corrigida_simplificada.pdf). Acesso em: 17 nov.

SFORCIN, J. M.. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, Botucatu, v. 30, n. 6, p. 894-905. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/172695>. Acesso em: 25 ago. 2022.

SHAPLA, U. M. *et al.* Propolis: The future therapy against Helicobacter pylori-mediated gastrointestinal diseases. **Journal of Applied Biomedicine**, Boêmia do Sul, v. 16, p. 1-19. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jab.2017.10.007>. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Propolis%3A-The-future-therapy-against-Helicobacter-Shapla-Raihan/ab1c74f641055675a25dd1bf4f1c5139d5aec610>. Acesso em: 30 ago. 2022.

SHIGENORI, K. M. Y. *et al.* Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 51, n. 6, p. 740–742, abr. 2006. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/6/51\\_6\\_740/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/6/51_6_740/pdf). Acesso em: 30 out. 2022.

SHIMIZU, K. *et al.* Antioxidative bioavailability of artemisin C in Brazilian propolis. **Science Direct**, Japão, p. 181-192, jan. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986104000888>. Acesso em: 04 nov. 2022.

SILVA, B. B. *et al.* Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n.10, p. 1-21. 2013. DOI: 10.1080/08927014.2013.834050. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/257529247\\_Effect\\_of\\_neovestitol-vestitol\\_containing\\_Brazilian\\_red\\_propolis\\_on\\_accumulation\\_of\\_biofilm\\_in\\_vitro\\_and\\_development\\_of\\_dental\\_caries\\_in\\_vivo](https://www.researchgate.net/publication/257529247_Effect_of_neovestitol-vestitol_containing_Brazilian_red_propolis_on_accumulation_of_biofilm_in_vitro_and_development_of_dental_caries_in_vivo). Acesso em: 01 nov. 2022.

SIQUEIRA, A. L. *et al.* Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de ODONTOLOGIA da Unesp**, Aracaju, v. 43, n.6, p. 359-366, nov./dez. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rounesp/a/tqsqxwZV9vRJVr7j8YwwWpt/?format=pdf>. Acesso em: 04 nov. 2022.

SOUSA, J. P. B. *et al.* Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Franca, v. 17, n. 1, p. 85–93, jan./mar. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/QGgDQPnSVWsnqQT8gC99g8p/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

STORER, T. I.; *et al.* **Zoologia Geral**. São Paulo: Editora Omega. 1998.

TAROLA, D. C; MAGRO, T. C; SCHILING, A. C. Impacts associated with trampling on tropical sand dune vegetation. **For. Snow Landsc. Res**, Piracicaba, v. 81, n. 1-2, p.151-162. 2007. Disponível em: [file:///C:/Users/tatys/Downloads/Impacts associated with trampling on tropical sand.p](file:///C:/Users/tatys/Downloads/Impacts%20associated%20with%20trampling%20on%20tropical%20sand.pd)df. Acesso em: 08 nov. 2022.

TOMAZZOLI, M. M.. **Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)**. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. Disponível em: [https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/160657/337987.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/160657/337987.pdf?sequence=1&isAllowed=y) &isAllowed=y. Acesso em: 28 out. 2022.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 616-623, juç. 2002.. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gymqSXNpPds5xbCmShLWJSS/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 26 ago 2022.

TORETI, V. C. *et al.* Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Campinas, v. 2013, p.01-13, jan./mar.2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/697390>. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2013/697390.pdf>. Acesso em: 30 out. 2022.

ULIAN, C. *et al.* **Assimetria de folhas de Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub. (Fabaceae) expostas a borrifos marinhos**. USP, 2012. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/curso/2012/PDF/APPO1-1.pdf> Acesso em: 08 de nov. de 2022.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES F. S.. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 384-387, jul./set. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/6ddcPWR8rqKqdhZy68ndHKb/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 07 nov. 2022.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD I.; SOSNOWSHI Z. A.. Comparative multi-centre study of the effi cacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, Ucrânia, v. 7, n. 1, p. 1-6. mar. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80014-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80014-8). Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/10782483>. Acesso em: 07 out. 2022.

WATSON, D. G. *et al.* Application of Principal Components Analysis to 1 H-NMR Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. **Phytochemical Analysis**, Glasgow, n. 17, p. 323-331, jun. 2006. DOI: 10.1002/pca.921. Acesso em: 28 set. 2022.

WOLFF, L. F.; SCHUHLI, G. S.. **Eucaliptos e Abelhas**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132444/eucaliptos-e-abelhas>. Acesso em: 16 nov. 2022.

WORLEY, B.; POWERS, R.. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, Nebraska, v. 1, n. 1, p.92-107, jun. 2013. DOI: 10.2174/2213235X11301010092. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465187/pdf/nihms695091.pdf>. Acesso em: 21 set. 2022.

YUGUE, W. **Quero bolsa: “Eucalipto”**. 2022. Disponível em: <https://querobolsa.com.br/enem/biologia/eucalipto>. Acesso em: 10 nov. 2022.

ZEGGIO, A. R. S.. **Própolis Catarinense: Influência da Sazonalidade e da Origem Geográfica no Perfil de Metabólitos Secundários**. 2016. Tese (Doutorado) – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/167683/341267.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 27 out. 2022.