

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E A APLICAÇÃO DE
EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM FILMES DE
CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA**

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

AGOSTO/2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E A APLICAÇÃO DE
EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM FILMES DE
CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA**

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

Sob a Orientação a Professora
Prof^a. Dr^a Rosane Nora Castro

Co-orientação
Profa. Dra. Renata Nunes Oliveira

Tese de doutorado submetida
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutora
em Química no Programa de
Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em
Química

Seropédica, Rio de Janeiro
Agosto de 2019.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725e
e SOUSA, JULIANA PAES LEME DE MELLO, 1986-
ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS
MARRON BRASILEIRA E A APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS EM FILMES DE CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA /
JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA. - SEROPÉDICA, 2019.
150 f.: il.

Orientadora: ROSANE NORA CASTRO.
Coorientadora: RENATA NUNES DE OLIVEIRA.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA,
2019.

1. A PRÓPOLIS. 2. SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS. 3.
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS. 4. BIOPOLÍMEROS.
5. DESENVOLVIMENTO DE FILMES OU MEMBRANAS POLIMÉRICAS.
I. CASTRO, ROSANE NORA, 1965-, orient. II.
OLIVEIRA, RENATA NUNES DE, 1984-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA. IV. Título.

A
Ar

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutora em Química, com área de concentração em Química.

TESE APROVADA EM 26 / 08 /2019

Profa. Dra Rosane Nora Castro (IQ-DQO-UFRRJ)
Orientadora e Presidente

Profa Dra. Yara Peluso Cid (ICBS-UFRRJ)

Dr. Davyson de Lima Moreira (Farmaguinhos-FIOCRUZ-RJ)

Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins (IPPN-UFRJ)

Profa Dra. Maria Raquel Garcia Vega (LCQUI-CCT-UENF)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivaldo e Nilcéa, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida e me deram a base para esta finalizando esta etapa tão importante.

Ao meu marido Leandro, pelo companheirismo, incentivo e paciência ao longo de toda essa trajetória.

A toda minha família que sempre me apoiou e incentivou na conquista deste título, em especial ao meu irmão Victor Paes Leme de Mello Sousa e a minha amada tia Renata Paes leme de Mello por toda força e carinho.

À Prof^a Rosane Nora Castro, pela orientação, dedicação, carinho e paciência.

À Prof^a Renata Nunes Oliveira, pela coorientação, carinho e paciência.

Aos professores da UFRRJ pelas aulas que contribuíram para minha formação profissional.

À amiga e “irmã do coração” Luiza Sant’Ana pela amizade, companheirismo e por todo incentivo e ajuda desde o início do processo seletivo para o Doutorado até na parte das análises, apresentações e desenvolvimento desta tese.

À amiga Fernanda Salgueiro pela amizade e pelas inúmeras ajudas nas análises de CLAE-DAD e principalmente na parte de quimiometria.

Ao amigo Lucas Oliveira pela amizade e companheirismo.

Ao colega Carlos Alberto Vianna pelo fornecimento das amostras de própolis marrom

Aos demais amigos Joana, Roberta, Douglas e Rafael pelo convívio no Laboratório 48B no DEQUIM-UFRRJ.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

À UFRRJ e ao PPGQ, pela oportunidade e qualidade de ensino.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E por fim, agradeço a Deus, por ter me ajudado a concluir esse trabalho.

RESUMO

SOUSA, Juliana Paes Leme de Mello. **Estudo da composição química, do potencial antioxidante e da atividade antimicrobiana da própolis marrom Brasileira e a aplicação de extratos de própolis em filmes de carboximetilcelulose sódica.** 2019. 150. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A própolis é um produto natural que tem sido empregado no tratamento de enfermidades desde os tempos antigos. A presença de diversas substâncias fenólicas explica, em parte, a variedade das propriedades biológicas e terapêuticas relatadas na literatura. Destacam-se os flavonoides, ácidos cinâmicos e seus ésteres. Visando ampliar e produzir conhecimento sobre a própolis brasileira, faz-se necessário analisar este produto de forma a caracterizar sua identidade, sua composição e avaliar seus efeitos na saúde quando adotados pela população. O objetivo desse trabalho foi analisar o perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), comparar os perfis dos extratos obtidos por UV-Vis, determinar o teor de ceras, bálsamos e das substâncias fenólicas, avaliar a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* de dez extratos de própolis marrom (*Apis mellifera*) obtidas do município de Japira, Norte do Paraná. Além disso, foi realizado a preparação e a caracterização de filmes de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) impregnados com extratos de própolis marrom. Para preparar os extratos, quatro métodos de extração foram realizados: maceração dinâmica a temperatura ambiente; maceração dinâmica a 50°C; extração em banho de ultrassom a temperatura ambiente e extração com ultrassom usando sonda de imersão; com dois tipos de solventes (etanol e metanol P.A). De modo geral, o perfil químico dos extratos de própolis marrom por CLAE-DAD foi semelhante e as principais substâncias identificadas foram: ácido clorogênico, cafeico, ferulico, *p*-cumárico e rosmarínico, além dos flavonoides pinobanksina, canferol e canferide. Dentre as substâncias fenólicas quantificadas nos extratos de própolis marrom a que obteve maior valor foi o canferide tanto para os extratos etanólicos de própolis (obtidos por extração com ultrassom usando sonda de imersão $39,58 \pm 14,33 \text{ mg}100\text{mg}^{-1}$ de extrato) quanto para os extratos metanólicos de própolis (obtidos por extração com maceração dinâmica a 50°C $34,86 \pm 3,29 \text{ mg}100\text{mg}^{-1}$ de extrato). O que pode sugerir o canferide como um biomarcador das amostras de própolis marrom estudadas nesse trabalho. Quando comparados os extratos de própolis marrom com os extratos de própolis verde, a análise quimiométrica mostrou diferença entre os solventes usados na extração, bem como entre os tipos de própolis. Quanto a atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, todos os extratos de própolis marrom e verde se mostraram capazes de promover inibição desta bactéria Gram-positiva no teste de difusão em ágar. Os filmes NaCMC impregnados com extrato de própolis verde apresentaram se mostraram promissores no preparo de possíveis de curativos, pois apresnetaream transparência, flexibilidade, liberação imediata das substâncias incorporadas e resistência térmica,

Palavras Chave: própolis marrom, própolis verde, capacidade antioxidante, hidrogel.

ABSTRACT

SOUSA, Juliana Paes Leme de Mello. **Study of the chemical composition, antioxidant potential and antimicrobial activity of Brazilian brown propolis and the application of propolis extracts in sodium carboxymethylcellulose films.** 2019. 150. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Propolis is a natural product that has been used in the treatment of diseases since ancient times. The presence of several phenolic substances explains, in part, the variety of biological and therapeutic properties reported in the literature. Of note are flavonoids, cinnamic acids and their esters. Aiming to expand and produce knowledge about Brazilian propolis, it is necessary to analyze this product in order to characterize its identity, its composition and evaluate its effects on health when adopted by the population. The objective of this work was to evaluate the chemical profile by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), wax and balm content, comparison of UV-Vis spectral data profiles, phenolic content, antioxidant capacity and Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* from ten extracts of brown propolis (*Apis mellifera*) obtained from Japira, Northern Paraná, removed by the scraping method in November 2013. As well as the preparation and characterization of sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) films impregnated with extracts of brown propolis. Four extraction methods were performed: dynamic maceration at room temperature; dynamic maceration at 50°C; extraction at room temperature ultrasound bath and ultrasound extraction using immersion probe; as well as two types of solvents (Ethanol and Methanol P.A) in order to optimize yield. Generally, the chemical profile of extracts HPLC-DAD propolis was similar and the main identified substances were: chlorogenic, caffeic, ferulic, p-coumaric and rosmarinic acid, besides the flavonoids pinobanksina, canferol and canferide. Among the phenolic substances quantified in brown propolis extracts with the highest value was canferide for both ethanolic propolis extracts (obtained by ultrasound extraction using immersion probe $39.58 \pm 14.33 \text{ mg}100\text{mg}^{-1}$ extract) and methanolic propolis extracts (obtained by dynamic maceration extraction at 50°C $34.86 \pm 3, 29 \text{ mg}100\text{mg}^{-1}$ extract). What can characterize canferide as a biomarker of the propolis samples studied in this work. When comparing brown propolis extracts with green propolis extracts, the chemometric analysis showed a difference between the extraction solvents as well as between the propolis types. Regarding antimicrobial activity against *S. aureus*, all brown and green propolis extracts were able to promote inhibition of this Gram-positive bacterium in the agar diffusion test. NaCMC films and propolis extract impregnated NaCMC films showed adequate results for dressing purposes such as transparency, flexibility, immediate release of embedded products and thermal resistance.

Keywords: brown propolis, green propolis, antioxidant capacity, hydrogel.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos tipos de própolis brasileira (TORETI <i>et al</i> , 2013).	Pág.09
Tabela 2- Substâncias descritas em própolis marrom brasileira (DEMBOGURSKI,2017)	Pág. 11
Tabela 3- Parâmetros físico-químicos que determinam a qualidade da própolis brasileira (BRASIL, 2001).	Pág. 13
Tabela 4- Derivados de ácido benzóico e de ácido cinâmico.	Pág.16
Tabela 5- Principais propriedades biológicas descritas para a própolis marrom brasileira. (DEMBOGURSKI, 2017)	Pág. 21
Tabela 6- Amostras de própolis marrom usada neste trabalho.	Pág.34
Tabela 7- Código das amostras e condições de extrações utilizados no preparo dos extratos de própolis.	Pág.36
Tabela 8- Equações da reta, linearidade (r) e a faixa de concentração de cada padrão.	Pág.44
Tabela 9 – Rendimentos (%) dos extratos etanólicos e metanólicos de própolis marrom.	Pág.50
Tabela 10 - Médias dos rendimentos de acordo com o solvente e método de extração (%).	Pág.50
Tabela 11- ANOVA realizado com os rendimentos dos extratos.	Pág.51
Tabela 12- Teores de ceras totais e bálsamos avaliados para as dez amostras de própolis marrom.	Pág.53
Tabela 13 – Média do teor em flavonoides (mg de equivalentes em quercetina por 100mg de extrato) totais dos diferentes extratos etanólicos e metanólicos de própolis.	Pág.56
Tabela 14 – Médias do teor de flavonoides de acordo com o solvente e método de extração.	Pág.57
Tabela 15- ANOVA realizado com os teores de flavonoides totais.	Pág.57
Tabela 16 – Média do teor em fenólicos totais (mg de equivalentes em ácido gálico por 100mg de extrato ou %) dos diferentes extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) .	Pág.59
Tabela 17 - Médias do teor de fenólicos totais de acordo com o solvente e método de extração.	Pág.60
Tabela 18- ANOVA realizado com os teores de fenólicos totais.	Pág.60
Tabela 19 - Variação no teor de fenólicos flavonoides totais de acordo com a região brasileira produtora (DE MELLO <i>et al.</i> , 2014).	Pág.66
Tabela 20- Capacidade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH- CE₅₀ = $\mu\text{g/mL}$) dos extratos (EEP e EMP).	Pág.67
Tabela 21 - Médias das capacidades antioxidantes por DPPH de acordo com o solvente e método de extração (DPPH- CE₅₀ = $\mu\text{g/mL}$).	Pág.67
Tabela 22- ANOVA realizado com os resultados de capacidade antioxidante por DPPH.	Pág.68
Tabela 23- Capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP= $\text{mmol Fe(II)/100 mg}$ de extrato).	Pág.72
Tabela 24 - Médias das capacidades antioxidantes por FRAP de acordo com o solvente e método de extração ($\text{mmol Fe(II)/100 mg}$ de extrato).	Pág. 73
Tabela 25 - ANOVA realizado com os resultados de capacidade	Pág.73

antioxidante por FRAP.

Tabela 26. Capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion (ABTS^{•+}= mmolTE/100mg de extrato). Pág.78

Tabela 27 - Médias das capacidades antioxidantes por ABTS de acordo com o solvente e método de extração (mmolTE/100mg de extrato). Pág.78

Tabela 28- ANOVA realizado com os resultados de capacidade antioxidante por ABTS. Pág.79

Tabela 29 - Métodos que apresentaram maiores rendimentos de flavonoides totais, fenólicos totais e atividades antioxidantes. Pág.83

Tabela 30- Matriz de correlação entre o teor de bálsamo, ceras, atividade antimicrobiana, flavonoides totais, fenólicos totais e atividade antioxidante. Pág.84

Tabela 31 – Tempo de retenção e máximo de absorção das substâncias utilizadas como padrão. Pág.85

Tabela 32 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EEP (mg 100 mg⁻¹ de extrato). Pág.93

Tabela 33 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EMP (mg 100 mg⁻¹ de extrato). Pág.94

Tabela 34 - Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EEP e EMP da própolis marrom *versus* própolis verde (mg100 mg⁻¹de extrato). Pág.97

Tabela 35- Médias dos diâmetros dos halos de inibição de extratos etanólicos de própolis marrom extratos etanólicos por maceração dinâmica (EEP-MD) de própolis marrom (10µg.mL⁻¹) contra *S. aureus* e a percentagem relativa ao antibiótico ampicilina. Pág.102

Tabela 36- ANOVA realizado com os rendimentos dos extratos. Pág.104

Tabela 37. Determinação do fluxo (*J*) e cinética de liberação (n=3) das substâncias fenólicas presentes no extrato de própolis que foi impregnado nos filmes de carboximetilcelulose sódica. Pág.123

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Produção científica sobre a própolis entre os anos de 1996 e 2019. (www.sciencedirect.com em 30/07/19). Pág.5
- Figura 2-** (A) Própolis de *Apis mellifera*; (B) Geoprópolis de *Melipona fascicullata* (tiúba). (<http://abelhasdomato.webnode.com.pt/geopropolis-e-seus-beneficios>) Pág.6
- Figura 3-** Biodiversidade na coloração da própolis brasileira Pág.8
- Figura 4-** Abelha-comum (*Apis mellifera*) coletando própolis verde de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Fotos de Michel Stórquio Belmiro. Fonte: Pág.9
<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/112/artigo2.htm>
- Figura 5-** Exemplos de substâncias encontradas na própolis verde brasileira. Pág.10
- Figura 6-** Estrutura básica de um flavonoide. (SALGUEIRO, 2016) Pág.18
- Figura 7** – Classes de flavonoides encontrados na própolis. Pág.19
- Figura 8-** Publicações anuais sobre biopolímeros (FARIAS et al, 2016) Pág.25
- Figura 9-** Estrutura da celulose (adaptado de CERRUTTI & FROLLINI, 2009). Pág.27
- Figura 10-** Obtenção do éter da celulose (CMC) através da substituição do halogênio do ácido monocloroacético (adaptado de CERRUTTI & FROLLINI, 2009). Pág.27
- Figura 11-** Reticulação da NaCMC pelo ácido cítrico (Adaptado GORGIEVA & KOKOL, 2011) Pág.29
- Figura 12-** Formação de filmes poliméricos pelo método de “casting” (Adaptado: SIEPMANN et al, 2008; FELTON, 2013). Pág.31
- Figura 13- a)** Amostra de própolis *in natura*. **b)** Própolis pulverizada Pág.35
- Figura 14** - Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorvância (Y), construída para a análise de fenólicos totais a partir do padrão comercial de ácido gálico. Pág.38
- Figura 15** – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorvância (Y), construída para a análise de flavonoides totais a partir do padrão comercial de quercetina. Pág.39
- Figura 16-** Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA. Pág.41
- Figura 17-** Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *versus* as leituras de absorvâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP. Pág.42
- Figura 18** - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox *versus* as leituras de absorvâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS. Pág.43
- Figura 19** – Etapas de obtenção e caracterização dos hidrogéis: FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier; DRX- Difração de Raio X; TGA- Análise térmica (Adaptado: Soares, 2019) Pág.46
- Figura 20-** Diagrama de caixa (*box plot*) comparando as médias dos rendimentos utilizando metanol e diferentes métodos de extração. Pág.51
- Figura 21** - Espectros de absorção dos extratos etanólicos de própolis: EEP-MD (A), EEP-MDAQ (B), EEP-US (C) e EEP-USI (D) na faixa de 200-500 nm. Pág.54

Figura 22 – Espectros de absorção dos extratos metanólicos de própolis: EMP-MD (E), EMP-MDAQ (F), EMP-US (G) e EMP-USI (H) na faixa entre 200-500nm.	Pág.55
Figura 23- (A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação do teor de flavonoides totais utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.58
Figura 24- (A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação do teor de flavonoides totais utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.59
Figura 25 -(A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação do teor de fenólicos totais utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.61
Figura 26 - (A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação do teor de fenólicos totais utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.61
Figura 27- Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde para teor de Fenólicos Totais (mgE _{AG} .100mg ⁻¹).	Pág.64
Figura 28- Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde para o teor de Flavonoides (mgE _{QE} .100mg ⁻¹)	Pág.64
Figura 29 - Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação do teor de fenólicos totais e flavonóides utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.	Pág.65
Figura 30 - Estabilização do radical livre DPPH (MOLYNEUX, 2004).	Pág.66
Figura 31- (A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.69
Figura 32- (A) Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).	Pág.69
Figura 33 - Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo radical DPPH (CE ₅₀ = μg/mL).	Pág.70
Figura 34 - Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.	Pág.70
Figura 35- Redução do íon Fe (III) pelo TPTZ.	Pág.72
Figura 36- Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando metanol e diferentes métodos de extração.	Pág.74
Figura 37- Gráfico de diferenças de médias (IC 95%).	Pág.75
Figura 38 - Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP= mmol Fe(II)/100 mg de extrato)	Pág.76
Figura 39 - Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.	Pág.76
Figura 40 -Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando metanol e diferentes	Pág.80

métodos de extração.

- Figura 41-** Gráfico de diferenças de médias (IC 95%). Pág.80
- Figura 42 -** Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^{+•}$ = mmolTE/100mg de extrato). Pág.81
- Figura 43 -** Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por ABTS utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom. Pág.82
- Figura 44 -** Estruturas das substâncias identificadas nos extratos de própolis **EEP (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI)** e **EMP (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI)** de própolis marrom. Pág.86
- Figura 45 -** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por maceração dinâmica a temperatura ambiente EEP-1MD a EEP-10MD. Pág.87
- Figura 46 -** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por maceração dinâmica à 50°C EEP-1MDAQ a EEP-10MDAQ. Pág.88
- Figura 47-** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por ultrassom EEP-1US a EEP-10US. Pág.88
- Figura 48-** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por ultrassom com sonda de imersão EEP-1USI a EEP-10USI. Pág.89
- Figura 49-** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por maceração dinâmica a temperatura ambiente EMP-1MD a EMP-10MD. Pág.89
- Figura 50 -** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por maceração dinâmica à 50°C EMP-1MDAQ a EMP-10MDAQ. Pág.90
- Figura 51-** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por ultrassom EMP-1US a EMP-10US. Pág.90
- Figura 52-** Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por ultrassom EMP-1USI a EMP-10USI. Pág.91
- Figura 53–** Cromatograma do extrato metanólico de própolis **EMP-1MD** obtidos por CLAE-DAD. Pag.91
- Figura 54.** Diagramas de caixa (*box plots*) comparando a variação do teor de cada substância fenólica quantificada para cada tipo de extração, sendo: (A) ácido clorogênico, (B) ácido p-cumárico, (C) canferol, (D) ácido cafeico, (E) ácido rosmarínico, (F) canferide, (G) ácido ferúlico e (H) pinobankisina. Pág. 95 e 96
- Figura 55 -** Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos de própolis marrom (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI) e metanólicos de própolis marrom (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI). Pág.99
- Figura 56 -** Gráfico de *loadings* de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI) e metanólicos (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI). Pág.100
- Figura 57.** Halos de inibição (método de difusão em ágar): extrato etanólico de própolis verde (**V**) ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$), extrato etanólico de própolis marrom (**M**) ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$), solvente (**Et**- Etanol) e o antibiótico (**A**-ampicilina). Pág.103

Figura 58. Gráfico de comparação do percentual de inibição própolis marrom (PM) <i>versus</i> própolis verde (PV).	Pág.103
Figura 59- Diagrama de caixa (<i>box plot</i>) comparando as médias dos halos de inibição das amostras de própolis verde e marrom.	Pág.104
Figura 60. Filmes de NaCMC (A); Filme de NaCMC impregnados com extrato de própolis (B).	Pág.106
Figura 61 - Grau de intumescimento dos filmes obtidos.	Pág.107
Figura 62 - Perda de massa e fração gel dos filmes obtidos	Pág.109
Figura 63- Espectros no infravermelho dos filmes obtidos e do extrato de própolis.	Pág.111
Figura 64- Espectros no infravermelho do filme de Na-CMC.	Pág.112
Figura 65- Espectros no infravermelho do extrato de própolis.	Pág.113
Figura 66- Espectros no infravermelho do filme de NaCMC impregnado de extrato de própolis.	Pág.113
Figura 67- Difratoograma de raio x (DRX) dos filmes obtidos.	Pág.114
Figura 68- Curvas termogravimétricas das amostras.	Pág.116
Figura 69. Perfil de liberação do ácido clorogênico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido clorogênico até 4h.	Pág.118
Figura 70. Perfil de liberação do ácido cafeico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido cafeico até 4h.	Pág.119
Figura 71. Perfil de liberação do ácido ferúlico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido ferúlico até 4h.	Pág.119
Figura 72. Perfil de liberação do ácido <i>p</i> -cumárico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido <i>p</i> -cumárico até 4h.	Pág.120
Figura 73. Perfil de liberação do ácido rosmarínico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido rosmarínico até 4h.	Pág. 120
Figura 74. Perfil de liberação da pinobankisina até 96h. Inset: perfil de liberação da pinobankisina até 4h.	Pág.121
Figura 75. Perfil de liberação de flavonoides totais da membrana polimérica NaCMC e pectina impregnados de extrato de própolis vermelha. (Basílio, 2018).	Pág.122
Figura 76. Gráfico <i>scores/loadings</i> aplicados ao teor de fenólicos totais, flavonoides totais, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de extratos etanólicos da própolis marrom (M) e verde (V).	Pág.126
Figura 77. Gráfico <i>scores/loadings</i> aplicados ao teor de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF), FRAP, DPPH, ABTS das amostras de extratos metanólicos da própolis marrom (M) e verde (V).	Pág.127
Figura 78. Gráfico <i>scores</i> aplicados as substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis marrom e própolis verde.	Pág.128
Figura 79. Gráfico <i>loadings</i> aplicados as substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis marrom e própolis verde.	Pág.129
Figura 80. Gráfico <i>scores</i> aplicados às substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis marrom e própolis verde.	Pág.130
Figura 81. Gráfico <i>loadings</i> aplicados as substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis marrom e própolis verde.	Pág.131
Figura 82. Estrutura da pinostrobina, canferol e ácido <i>p</i> -cumárico.	Pág.132

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EEP	Extrato etanólico de própolis
EMP	Extrato metanólico de própolis
NaCMC	Carboximetilcelulose sódica
MD	Maceração dinâmica
MDAQ	Maceração dinâmica com aquecimento
US	Ultrassom
USI	Ultrassom com sonda de imersão
TP	Teores de fenólicos
TF	Teores de flavonoides
%AA	Percentual de atividade antioxidante
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
CE ₅₀	Concentração efetiva para uma que a atividade se reduza em 50%.
ABTS	Método de captura do radical-cátion (ABTS ⁺)
TPTZ	(ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina]
FRAP	Método de redução do íon férrico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.
DRX	Análise por Difração de Raio X
TGA	Análises termogravimétricas
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
LC-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A PRÓPOLIS	4
2.2. SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS.....	16
2.2.1. <i>Biossíntese de Ácidos Fenólicos.....</i>	<i>16</i>
2.2.2. <i>Biossíntese de Flavonoides</i>	<i>18</i>
2.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS.....	21
2.4. BIOPOLÍMEROS	25
2.4.1. <i>Desenvolvimento de filmes ou membranas poliméricas.....</i>	<i>29</i>
3. OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.2. AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	35
4.3. PREPARO DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS	36
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BÁLSAMOS E CERAS	37
4.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VIS.....	38
4.6. DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	38
4.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	39
4.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	40
4.8.1. <i>Método do DPPH.....</i>	<i>40</i>
4.8.2. <i>Método de redução do íon férrico (FRAP).....</i>	<i>42</i>
4.8.3. <i>Método de captura do radical-cátion (ABTS⁺).....</i>	<i>43</i>
4.9. ANÁLISE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS POR CLAE-DAD.....	44
4.10. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	45
4.11. PREPARO DOS HIDROGÉIS.....	46
4.12. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	47
4.12.1. <i>Ensaio de intumescimento.....</i>	<i>47</i>
4.12.2. <i>Análise microestrutural por FTIR.....</i>	<i>48</i>
4.12.3. <i>Análise por Difração de Raio X (DRX).....</i>	<i>49</i>
4.12.4. <i>Análise térmica.....</i>	<i>49</i>
4.12.5. <i>Estudo de cinética de liberação dos filmes de hidrogéis impregnados de extrato de própolis... 49</i>	<i>49</i>
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	50
5.2. TEORES DE CERAS E BÁLSAMOS	53
5.3. DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	55
5.4. TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES	57
5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	67
5.6. QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CLAE-DAD.....	86
5.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	102
5.8. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	106
5.8.1. <i>Espectros no infravermelho (FTIR)</i>	<i>111</i>
5.8.2. <i>Difração de raio X (DRX).....</i>	<i>115</i>
5.8.3. <i>TGA.....</i>	<i>116</i>
5.8.4. <i>Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação in vitro.....</i>	<i>119</i>
5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA.....	126
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

1. INTRODUÇÃO

O termo própolis deriva do grego *pro* (“em frente”, “na entrada”) e *polis* (“comunidade” ou “cidade”) e significa uma substância para defesa da colméia. (GHISALBERTI, 1979). É um remédio natural que tem sido empregado extensivamente desde os tempos antigos. Egípcios conheciam muito bem as propriedades anti-putrefação da própolis e usavam para embalsamar cadáveres. Foi reconhecida por suas propriedades medicinais pelos médicos gregos e romanos, Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno. Ela foi empregada como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal, sendo perpetuada na Idade Média e entre os médicos árabes. Também foi reconhecida por outros povos, como os Incas que a empregavam como agente antipirético, e as farmacopeias de Londres do Século XVII listavam a própolis como uma droga oficial. Entre o Século XVII e XX, a própolis tornou-se uma substância muito popular na Europa por conta da sua atividade antibacteriana (CASTALDO E CAPASSO, 2002). Atualmente ela continua sendo usada como um remédio popular, e está disponível tanto em forma pura ou em combinação com outros produtos naturais, em produtos cosméticos e como componente de alimentos. Por conta de suas características, nas últimas décadas, pesquisadores têm se interessado por investigar seus constituintes e suas propriedades biológicas (GHISALBERTI, 1979; CASTALDO E CAPASSO, 2002; BANKOVA, 2005; SFORCIN, 2007).

O Brasil possui ambiente propício para a exploração da apicultura, considerando seu clima tropical, território vasto e diversidade de vegetação. Aliados a essas características, o conhecimento e o domínio das técnicas apícolas tem contribuído para que o Brasil aumente sua participação no mercado mundial apícola. Neste contexto, uma vez que existe um grande potencial no Brasil, para que o mesmo expanda a produção e possível exportação dos produtos oriundos da colmeia, torna-se relevante a realização de estudos que busquem avaliar a competitividade dos principais Estados brasileiros produtores de própolis, por meio da mensuração dos indicadores de desempenho e qualidade, de modo a subsidiar possíveis políticas de incentivo à exportação. Comercialmente, a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Tal inserção deve-se essencialmente à constatação das diferentes atividades biológicas atribuídas aos constituintes químicos desse produto (AGUIAR *et al*, 2018).

Muitos pesquisadores relataram que o potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes encontrados em extratos etanólicos de própolis (EEP), e não somente a presença de uma determinada substância (PEREIRA *et al.*, 2015)

O uso da própolis tem se destacado na formulação de zoterápicos como alternativa, na promoção da saúde, sendo considerada uma importante ferramenta nas ciências médicas, devido suas comprovadas propriedades biológicas, tais como: atividade cicatrizante, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, anestésica. Essas propriedades da própolis fazem com que este material se torne um componente adequado para uso em materiais curativos. (AGUIAR *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; BOHNEBERGER *et al.*, 2019; FIORDALISI *et al.*, 2019; KLAHR *et al.*, 2019; SILVA, 2019; BAUNGRATZ, 2019)

Neste sentido, como a própolis já possui destaque no uso na medicina popular e atrai muita atenção por suas utilidades na prática médica graças às suas propriedades farmacológicas, o que pode permitir sua utilização como estratégia na terapia de cicatrização, podendo vir a possibilitar a redução do tempo de tratamento de lesões, melhorando a condição psicossocial do paciente com sua conseqüente inclusão social, além de garantir o acesso mais fácil e democrático da população a tratamentos complementares da saúde (ORYAN *et al.*, 2018).

A busca por novas tecnologias e por métodos não invasivos para a correção das alterações cutâneas relacionadas a ulcerações cutâneas e curativos é tendência cada vez mais expressiva na área médica. Vários produtos estão disponíveis variando em relação às características físicas e químicas, o que influencia em seus efeitos. Vários deles são registrados e aprovados para o uso no Brasil, o que torna importante verificar a existência de estudos clínicos e acompanhar as informações de farmacovigilância para assegurar-se a eficácia e, principalmente, a segurança no uso destes produtos.

A eficácia de hidrogeis para o tratamento de ulcerações cutâneas já foi demonstrada em diversos estudos. Os hidrogeis possuem a propriedade de absorver, desencrostar e desbridar o tecido necrótico e fibrótico. A carboximetilcelulose é um polímero natural utilizado no tratamento de ulcerações cutâneas na forma de hidrogel. Tais preparações são classificadas como curativos primários, apresentando excelência para hidratação e manutenção de um ambiente úmido na ulceração cutânea.

Considerando os benefícios da própolis no tratamento de ulcerações cutâneas, principalmente sua atividade antimicrobiana e também em virtude da presença das substâncias fenólicas como um dos principais antioxidantes responsáveis por suas propriedades terapêuticas; associados à eficácia de hidrogéis de carboximetilcelulose no tratamento de ulcerações cutâneas, o presente trabalho propõe o estudo da composição química dos extratos de própolis marrom, e o desenvolvimento de hidrogéis de carboximetilcelulose associado a extratos etanólicos de própolis. O desenvolvimento deste tipo de hidrogel associados aos extratos de própolis, poderia contribuir para a melhoria do tratamento de feridas e consequentemente para a melhoria da qualidade de vida e saúde em nosso país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Própolis

As civilizações antigas sempre usavam produtos apícolas como recursos terapêuticos valiosos em suas práticas medicinais. A história da medicina das civilizações assírias, chinesas, tibetanas, Inca, egípcia, e também o greco-romano é muito rica e possui registros de centenárias formulações, incluindo a própolis, para tratar ou prevenir doenças. Antigos egípcios, gregos e romanos usaram própolis para tratar feridas, lesões cutâneas, úlceras e intervenções cirúrgicas (PARK *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002).

No Egito, a própolis foi usada como um dos principais ingredientes nas formulações para embalar cadáveres. Também foi usado por Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno como um antisséptico e para cicatrização de feridas. Os gregos, incluindo Aristóteles e Hipócrates, adotaram a própolis como um medicamento de cura interna e externa. O historiador romano Plínio refere-se à própolis como um medicamento para reduzir o inchaço e aliviar a dor (MARCUCCI e CUSTÓDIO, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; SALANTINO, 2005; SFORCIN e BANKOVA 2011).

O termo própolis que significa “em defesa da colmeia”, foi descrito no Século XVI na França, e no Século XVII foi considerada uma droga oficial pela Farmacopeia de Londres. Nos Séculos seguintes, a própolis atraiu um crescente interesse devido às suas propriedades medicinais, especialmente na Europa Oriental. Em 1908, o primeiro artigo científico sobre as propriedades e composição química da própolis foi publicado e indexado no *Chemical*

Abstracts. Em 1968, o resumo da primeira patente foi publicado também no *Chemical Abstracts* (HELFENBERG,1908; IULIU, 1965; BANKOVA *et al*, 1982; MARCUCCI,1996).

Na África do Sul, durante a guerra no final do Século XIX, a própolis foi muito usada devido suas propriedades curativas, assim como na Segunda Guerra Mundial por médicos soviéticos (IOIRISH,1982; MARCUCCI,1996).

Nas últimas décadas, a própolis ganhou ampla aceitação na medicina tradicional em várias partes do mundo. Esse interesse disseminado pela própolis em vários países estimulou grande números de estudos considerando as propriedades químicas e biológicas da própolis (SALATINO *et al*, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor de própolis do mundo, e o produto é consumido principalmente por países orientais, onde sua aplicação vai desde zooterápico até a publicação de patentes em aplicações, formulações e metodologias específicas para a obtenção dos seus constituintes (SEBRAE, 2017). A apreciação científica da própolis pode ser avaliada de acordo com o número de publicações sobre o assunto. Na busca por publicações em torno da palavra própolis, entre os anos de 1996 e 2019, utilizando-se a base de dados *Science Direct*, verificou-se que a maioria aborda o valor biológico, pela descrição de novas substâncias orgânicas e pela ação medicamentosa. Este número de publicações sobre a própolis pode ser observada na **Figura 1**. O aumento no interesse dessa matriz complexa se deve a várias propriedades biológicas que são relatadas devido à presença de algumas substâncias na sua composição.

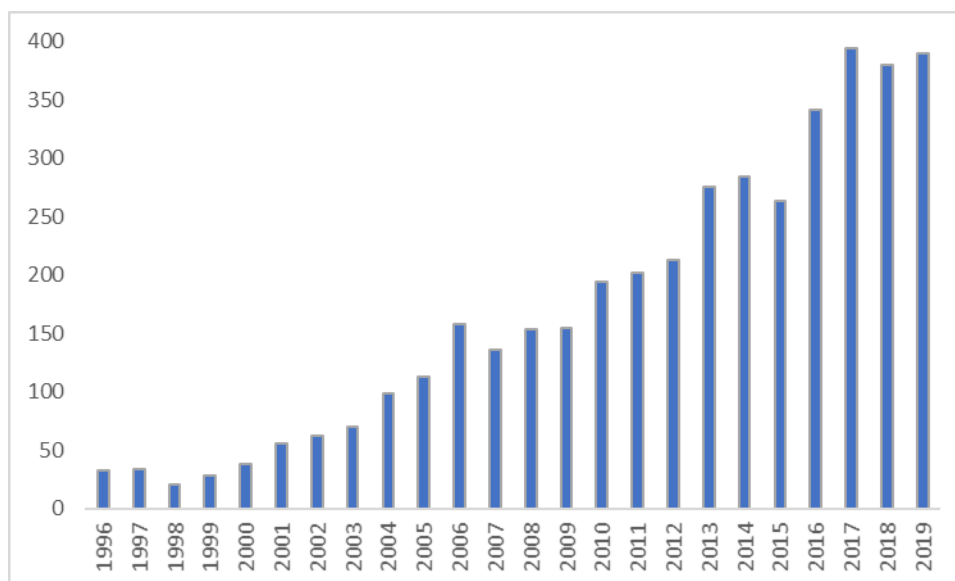


Figura 1- Produção científica sobre a própolis entre os anos de 1996 e 2019. (www.sciencedirect.com em 30/07/19).

A própolis é um material resinoso coletada, por abelhas operárias, dos brotos de folhas de inúmeras espécies de árvores. Para fabricar a própolis, as abelhas também podem usar o material ativamente secretado por plantas, ou exudados das feridas das plantas (material lipofílico em folhas, mucilagens, gomas, resinas, treliças, etc.). Uma vez coletado, este material é enriquecido com secreções salivares e enzimáticas das abelhas e é usado pelas abelhas para cobrir paredes de colméia, preencher lacunas e rachaduras (BANKOVA, 2000). É produzida em qualquer época do ano sendo utilizada pelas abelhas com o intuito mecânico de vedar e calafetar a colméia, atuando como um agente termorregulador, evitando a exposição da colônia a correntes de ar e infestação por elementos estranhos. Por apresentar propriedades antissépticas, serve na assepsia da colônia, pois impede a ação de microrganismos, principalmente nas áreas de postura de cria e para embalsamar insetos invasores (MARCUCCI 1995; KUJUMGIEV *et al*, 1999; BANSKOTA *et al*, 2001; MANRIQUE & SOARES 2002; TEIXEIRA *et al*, 2003).

A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colmeia. O espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta (SALATINO *et al*, 2005; TEIXEIRA *et al*, 2005). Normalmente, a

coleta de própolis é feita mediante raspagem na tampa da colmeia, aumentando assim, o risco de contaminação com outros materiais como lascas de madeira e terra. Visando a melhora da qualidade da própolis, algumas técnicas foram desenvolvidas, como uso de telas coletoras abaixo da tampa, coletor de própolis inteligente (CPI), dentre outras (INOUE *et al.*, 2007).

As abelhas sem ferrão também produzem uma mistura semelhante a própolis, conhecido como geoprópolis ou cerume (SIMONE-FINSTRÖM e SPIVAK, 2010), e há uma evidência de que as abelhas sem ferrão adicionam secreções das glândulas da cabeça durante a produção desse material (dos SANTOS *et al.*, 2009). A geoprópolis é produzida por algumas espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* de uma mistura de resinas vegetais, secreções salivares, cera, e terra. As abelhas sem ferrão armazenam grandes depósitos deste material dentro de suas colméias, onde é usado para fechar pequenas fissuras, para evitar a entrada de ar, para mumificar os intrusos e preservar um ambiente estéril na colméia (LEHMBERG *et al.*, 2008; PATRICIO *et al.*, 2002; SAWAYA *et al.*, 2004). Em contraste com as abelhas *Apis mellifera* que usam própolis como camadas interna em torno do ninho, as abelhas sem ferrão usam grandes quantidades de geoprópolis como material de construção para o ninho, elementos como potes de mel, pilares e outras estruturas nos ninhos (ROUBIK, 2006) (Figura 2).



(A)



(B)

Figura 2- (A) Própolis de *Apis mellifera*; (B) Geoprópolis de *Melipona fascicullata* (tiúba)
<http://abelhasdomato.webnode.com.pt/geopropolis-e-seus-beneficios/>

A composição da própolis varia de acordo com a fonte de matérias usadas pelas abelhas melíferas. Em geral, é composto de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias,

incluindo detritos orgânicos. Estão presentes ainda, microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, magnésio, silício, titânio, bromo, zinco e vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979; CIRASINO *et al*, 1987; MONTI *et al*, 1983).

A cor, sabor, odor, consistência, composição química e atividade biológica da própolis dependem, principalmente, das espécies vegetais que lhes deram origem, da época do ano em que foram produzidas e da origem geográfica (PAULINO, 2004). Dessa maneira, a alteração do pasto apícola, o uso indiscriminado de agrotóxicos e mudanças climáticas pode afetar a composição química da própolis, dificultando sua padronização para comercialização. A variação sazonal, por exemplo, pode implicar a diminuição de alguns componentes biologicamente ativos e o aumento de outros (NUNES *et al*, 2009).

Segundo Rosa *et al* (2019) diversos estudos ao redor do mundo demonstram o perigo da utilização indiscriminada de agrotóxicos, os quais vêm lentamente suprimindo as populações de polinizadores como as abelhas. Mesmo em concentrações baixas, muitas vezes os agrotóxicos afetam a estrutura e a função das comunidades naturais, provocando impactos em múltiplos níveis, que vão desde o molecular até o de comunidades inteiras, comprovando que as práticas agrícolas intensivas são altamente impactantes ao ambiente e estão diretamente relacionadas à redução da biodiversidade.

Estudos demonstraram que amostras de própolis oriundas de regiões tropicais, especialmente brasileiras, apresentam diferenças na composição química em relação à própolis oriunda da zona temperada. O Brasil possui clima e vegetação que torna possível às abelhas produzirem própolis de diversas qualidades, o que pode ser um diferencial dentre os países produtores. Mesmo a própolis brasileira apresenta variações na sua composição química e, portanto, nas suas propriedades biológicas, de acordo com as diferentes regiões do país onde são coletadas, e esta variação ocorre em virtude da grande biodiversidade de plantas encontradas no Brasil (PEREIRA *et al*, 2002). Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos pesquisadores de todo o mundo (TRUSHEVA *et al*, 2006).

Por exemplo, quando este produto é derivado da Europa ou da China, os principais metabólitos vegetais encontrados são flavonoides e ácidos fenólicos, ao contrário dos originários do Sudeste do Brasil, que contêm quantidades elevadas de terpenoides e derivados do ácido *para*-cumárico. Essa diferença na composição revela a coleta de material resinoso, em zonas temperadas, principalmente de espécies populares do Sudeste do Brasil,

especialmente *Baccharis dracunculifolia* DC (Compositae), popularmente conhecido como “vassourinha do campo” (MELLO *et al*, 2010; ISHIDA *et al*, 2011)

Park *et al.* (2000) classificaram as amostras de própolis coletadas em todas as regiões do país (exceto Região Norte) em 12 grupos, de acordo com a aparência e coloração dos extratos. Posteriormente, foi encontrada uma nova própolis em colmeias localizadas ao longo do litoral e manguezais no Nordeste brasileiro, classificada como própolis do grupo 13, denominada própolis vermelha. Atualmente, existem 13 tipos catalogados e descritos na literatura (**Tabela 1**) (TORETI *et al*, 2013). Porém esta classificação ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande variedade de plantas, dada a imensa Flora brasileira. Observou-se que abelhas coletavam o exudado vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), sugerindo que essa seja a origem botânica da própolis vermelha (DAUGSCH *et al.* 2006). Análises cromatográficas verificaram que as amostras de própolis apresentavam perfis muito semelhantes em relação ao teor de flavonoides como os exudados resinosos vermelhos (DAUGSCH *et al.* 2008).

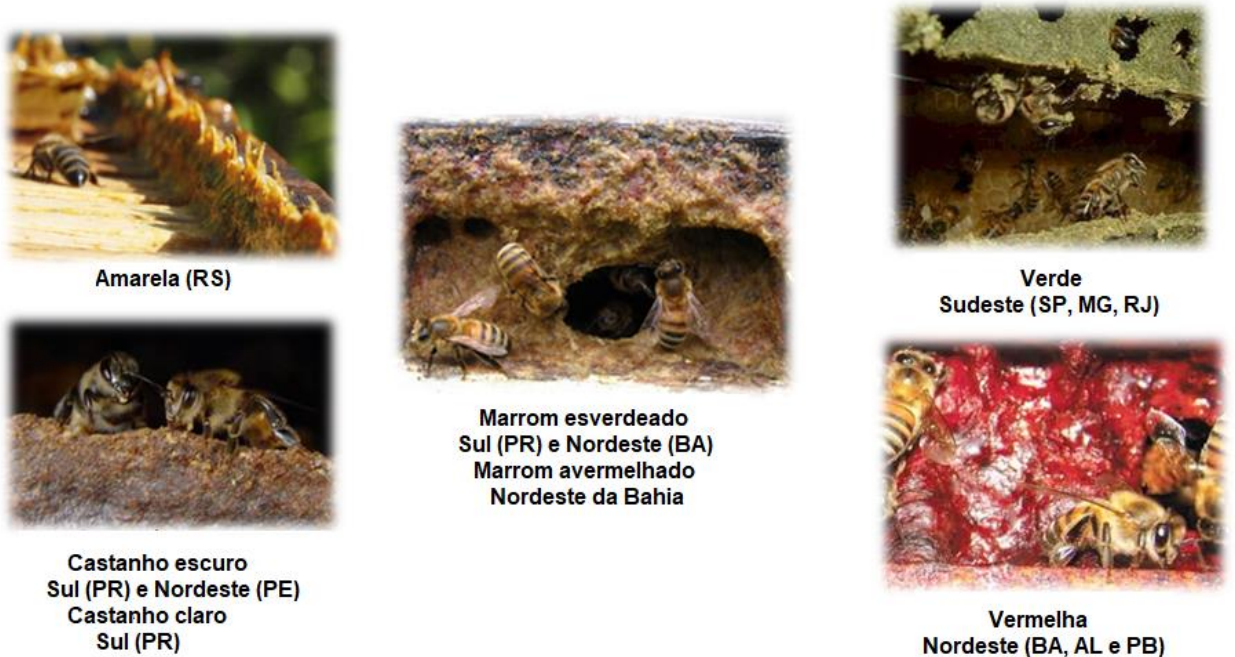


Figura 3 - Biodiversidade na coloração da própolis brasileira

Tabela 1. Classificação dos tipos de própolis brasileira (TORETI *et al*, 2013)

Extrato etanólico de própolis		
Grupos	Cor	Origem
Grupo 1	Amarelo	Sul
Grupo 2	Castanho claro	Sul
Grupo 3	Castanho escuro	Sul
Grupo 4	Castanho claro	Sul
Grupo 5	Marrom esverdeado	Sul
Grupo 6	Marrom avermelhado	Nordeste
Grupo 7	Marrom esverdeado	Nordeste
Grupo 8	Castanho escuro	Nordeste
Grupo 9	Amarelo	Nordeste
Grupo 10	Amarelo escuro	Nordeste
Grupo 11	Amarelo	Nordeste
Grupo 12	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste
Grupo 13	Vermelha	Nordeste

Dentre os tipos existentes, a própolis verde (muitas vezes chamada de própolis brasileira), produzida, sobretudo no Sudeste do País, é a mais valorizada internacionalmente, e seu alto valor agregado supera até mesmo o preço do mel. É conhecida popularmente como alecrim-do-campo, cuja origem botânica é a planta *Baccharis dracunculifolia* (**Figura 4**).



Figura 4- Abelha-comum (*Apis mellifera*) coletando própolis verde de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Fotos de Michel Stórquio Belmiro. Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/112/artigo2.htm>

Os principais componentes da própolis verde são os fenilpropanoides prenilados, como o artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (**Figura 5**), substância majoritária que é considerada o biomarcador da própolis verde. Além de derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos, flavonoides e triterpenoides que apresentam importantes propriedades biológicas (SALATINO *et al*, 2005).

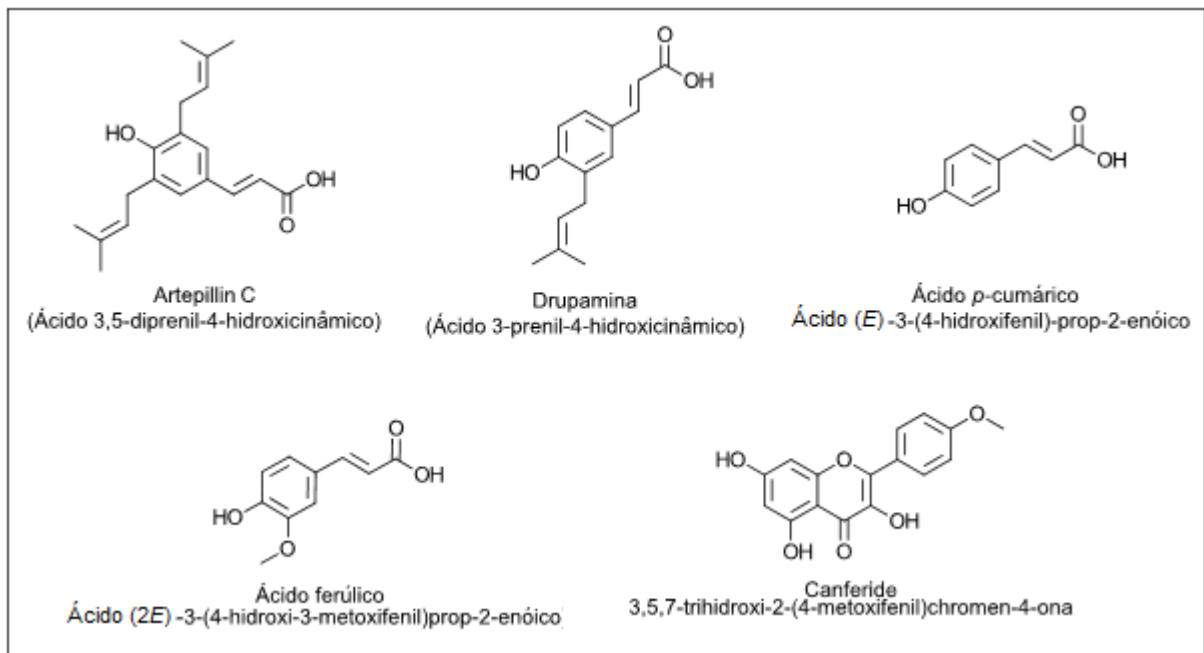


Figura 5- Exemplos de substâncias encontradas na própolis verde brasileira.

A própolis marrom é característica de diferentes áreas, mas em relação a própolis marrom brasileira, é geralmente citada como a que vem do Sul do país. Embora muitas substâncias químicas presentes neste produto e seus efeitos biológicos já tenham sido identificadas, este tipo de própolis não tem sido bem estudado como a verde e vermelha. A origem botânica não é bem definida como a própolis verde, mas estudos relatam como fonte botânica, principalmente, a araucária, embora algumas substâncias encontradas estejam presentes em *B. dracunculifolia* (SALATINO et al, 2005).

A variedade marrom de própolis é a mais comum produzida e estudada em outros países, porém a própolis marrom brasileira (PMB) é a menos estudada em relação às outras e esta foi o alvo de interesse neste trabalho de pesquisa.

A PMB se destaca por grande concentração de ácidos graxos como ácido oleico, linoleico, palmítico, esteárico, e também por possuir polifenólicos, principalmente derivados do ácido cumárico e flavonoides (CASTRO et al., 2007 DEMBOGURSKI,2017)(Tabela 2).

Tabela 2- Substâncias descritas em própolis marrom brasileira (DEMBOGURSKI,2017)

Substâncias	Referências
Flavonoides	
Flavanonas	
Hesperetina, pinocembrina	Waller et al., 2017
Flavonas	
Apigenina, crisina, luteolina e 5-metoxi-luteolina	Waller et al., 2017, Fernandes-Silva et al., 2013, Sawaya et al., 2004
Flavanonol	
Diidrokaempferide, metoxi-pinobanksina	Machado et al., 2016b, Fernandes-Silva et al., 2013
Flavonois	
Dimetil quercetina, galangina, isoramnetina, kaempferol, quercetina, rutina	Waller et al., 2017, Machado et al., 2016b, Fernandes-Silva et al., 2013
Ácidos clorogênicos	
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -cafeoilquínico	Waller et al., 2017, Machado et al., 2016b, Fernandes-Silva et al., 2013
Ácidos Cinâmicos	
Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, hidrocínato de etila, ácido benzenopropanoico, cinamato de metila, <i>trans</i> -cinamato de sitosterila, hidrocínato de metila	Waller et al., 2017, Machado et al., 2016a, Bittencourt et al., 2015, Fernandes-Silva, 2013 Santos, David & David, 2017
Ácidos Cinâmicos prenilados	
Artepinil C, ácido 4-hidróxi-3-prenil- cinâmico, ácido 3,4-diidroxi 5-prenil cinâmico, baccharina, drupanina, ácido 2,2dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	Machado et al., 2016a, 2016b, Fonseca et al., 2011, Fernandes-Silva et al., 2013, Sawaya et al., 2004, Rodrigues et al., 2016
Outros fenólicos	
Ácido 4-hidróxido benzóico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido elágico, ácido 2,2-dimetil-6-carboxietinil-2H-1benzopirano, ananixantona (xantona)	Waller et al., 2017, Bittencourt et al., 2015, Rodrigues et al., 2016, Santos, David e David, 2017
Terpenos	
Monoterpenos : α -pineno	Fernandes et al., 2015
Sesquiterpenos: 7-epi-sesquitujeno, alloaromadendreno, aromadendreno, cariofileno, espatulenol, germacreno D, <i>trans</i> -cadina-1,4-dieno, <i>trans</i> -nerolidol, viridifloreno, α -cadineno, α - <i>cis</i> -bergamoteno, α -copaeno, α -cubebeno, α -curcumeno, α -gurjuneno, α -himachaleno, α -humuleno, α -muuroleno, α - <i>trans</i> -bergamoteno, α -ylangeno, β -bisaboleno, β -curcumeno, β -elemeno, β -gurjuneno, β -selineno, γ -cadineno, γ -muuroleno	Bittencourt et al., 2015, Fernandes et al., 2015
Triterpenos: Cicloartenol, lupeol	Bittencourt et al., 2015
Ácidos Graxos	
Ácido <i>cis</i> -oleico, hexadecanoato de etila, oleato de etila, tetracosanoato de etila, γ -palmitolactona, ácido hexadecanóico, <i>cis</i> -9-octadecenoato de metila, hexadecanoato de metila, tetracosanoato de metila	Bittencourt et al., 2015

Avelino e Santos (2018) estudaram amostras de própolis verde, vermelha e marrom obtidas no Nordeste do Brasil, tendo observado maior frequência de pólen das seguintes espécies vegetais para a própolis marrom: Fabaceae e Rubiaceae (100 %), Anacardiaceae (95 %), Amaranthaceae (91 %), Lamiaceae (86 %), Myrtaceae e Asteraceae (82 %), Euphorbiaceae (77%), Poaceae e Sapindaceae (73%), Arecaceae (68%), Urticaceae (59%) e Rhamnaceae (41%).

Os flavonoides crisina e pinocembrina já foram descritos para própolis originários de regiões temperadas na Europa e América do Norte, assim como terpenos oriundos de resinas de *Araucaria angustifolia* (SAWAYA *et al*, 2004; BANKOVA *et al*, 1999). Estes flavonoides e outros também foram observados em amostras de própolis marrom brasileira da região Sul (SAWAYA *et al*, 2004). Além disso, a partir da própolis marrom originária do Estado do Paraná foram isolados seis diterpenos clerodanos, os quais exibiram atividade de inibição do crescimento de quatro linhagens de células de câncer humano (LNCaP, MCF-7, DLD-1 e A549) (TAZAWA *et al*, 2016; DEMBOGURSKI, 2017).

Tanto a própolis bruta quanto os extratos comercializados devem atender a especificações, que no Brasil é estabelecido conforme a normativa descrita pelo MAPA (BRASIL, 2001). O “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis” (normativa nº 03, de 19 de Janeiro de 2001) tem como objetivo estabelecer parâmetros para avaliação da qualidade de própolis; o anexo VII da mesma normativa descreve a composição, propriedades físicas e químicas, características sensoriais e demais condições a que um extrato ou própolis bruta deve obedecer para ser legalmente comercializado e consumido (**Tabela 3**).

Tabela 3- Parâmetros físico-químicos que determinam a qualidade da própolis brasileira (BRASIL, 2001).

Parâmetros	Própolis bruta	Extrato hidroalcoólico
Perda por dessecação	Máximo de 8 % (m/m)	-
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)	-
Extrato seco	-	Mínimo de 11% (m/v) Máximo 1% do extrato seco (m/m)
Ceras	Máximo de 25 % (m/m)	
Substâncias Fenólicas	Mínimo 5 % (m/m)	Mínimo 0,50% (m/m);
Flavonoides	Mínimo de 0,5 % (m/m)	Mínimo 0,25%(m/m);
Atividade de oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Massa mecânica	Máximo 40% (m/m)	-
Solúveis em Etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-
Teor alcoólico:	-	Máximo de 70o GL (v/v);
Espectro de Absorção de Radiações UV-Vis	200 e 400 nm	200 e 400 nm

A normativa que descreve o controle de qualidade da própolis não fornece dados suficientes para o estabelecimento de um padrão comercial que indique a finalidade terapêutica do produto, e também não especifica parâmetros microbiológicos para garantia de qualidade e segurança biológica do seu uso. Para tais, avaliações fitoquímicas e toxicológicas se fazem necessárias (SALGUEIRO, 2016).

A própolis é normalmente consumida na forma de extratos, pois sua matriz bruta é uma mistura que contém, além dos metabólitos bioativos, a mistura de cinzas, ceras, e pólen, além de resinas vegetais. Extrair significa solubilizar seletivamente um conjunto de substâncias que tem afinidade com determinado solvente, e isso é mensurado de acordo com a polaridade de ambos. Isso significa que o potencial biológico da própolis está diretamente relacionado com o tipo de solvente utilizado para extração (SALGUEIRO, 2016).

Extratos preparados com *n*-hexano, assim como outros solventes apolares como clorofórmio e diclorometano, extraem preferencialmente substâncias de natureza lipofílica na própolis, em geral ácidos graxos e terpenos. Solventes mais polares, como álcoois (etanol e metanol), assim como acetato de etila e água, tem melhor afinidade pelas substâncias polifenólicas da própolis, como derivados do ácido cinâmico, benzóico e flavonoides, que são as substâncias que apresentam correlação positiva com as propriedades biológicas da própolis. Esse tipo de correlação, no entanto, não descarta a possibilidade de substâncias de natureza apolar também contribuir no potencial biológico deste produto natural, mesmo estando presentes em quantidades inferiores nos extratos polares.

Solventes alternativos têm sido utilizados para o preparo de diferentes produtos, como é o caso do glicerol e do propilenoglicol, porém mostram menor eficiência na extração dos ácidos fenólicos e flavonoides quando comparado aos extratos etanólicos e metanólicos (YEO *et al.*, 2015). A água também é um solvente bastante explorado e com crescente interesse por conta da química verde, mas sua eficiência em extrair as substâncias da própolis é baixa. O teor de ceras e resinas da matriz bruta faz com que a mesma tenha alta lipofilicidade, sendo insolúvel em água e dificultando assim o carregamento das substâncias pelo solvente (CABRAL *et al.*, 2009; COTTICA *et al.*, 2011).

A metodologia mais utilizada para extração de matrizes vegetais, incluindo a própolis, é maceração estática. Essa técnica consiste no repouso da matriz vegetal em um recipiente contendo o solvente extrator, devidamente fechado, em temperatura ambiente e um intervalo de tempo que pode ser de horas ou dias, com agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. A agitação constante (maceração dinâmica) é uma forma de reduzir o tempo de extração quando esta técnica é aplicada, mas ambas as técnicas são ineficientes no que diz respeito a saturação do solvente, pois, uma vez extraído e no equilíbrio, há uma interrupção no processo de solubilização dos princípios ativos presentes na amostra. Para maximizar o efeito da extração, geralmente o resíduo sólido obtido após a extração é submetido a novas macerações, o que implica num maior gasto de solvente (SALGUEIRO, 2016).

O ultrassom de alta potência pode ser aplicado usando dois tipos de dispositivos: banho ultrassônico ou equipamento de ultrassom tipo sonda. Ambos os sistemas são baseados em um transdutor como fonte de energia de ultrassom. O banho ultrassônico é o tipo mais comumente conhecido de dispositivo ultrassônico geralmente consiste em um tanque de aço inoxidável com um ou mais transdutores ultrassônicos. Banhos ultrassônicos geralmente operam a uma frequência de cerca de 40 kHz e podem ser equipados com controle de temperatura. Eles são baratos, disponíveis e um grande número de amostras pode ser tratado simultaneamente. No entanto, em comparação com sistemas de sonda, a baixa reprodutibilidade e baixa potência do ultrassom diretamente na amostra são grandes desvantagens. De fato, a intensidade é altamente atenuada pela água contida no banho e pelo material de vidro usado para o experimento. Sondas ultrassônicas de alta potência são geralmente preferidas para aplicações de extração. O sistema de sonda é mais potente devido a intensidade ultrassônica fornecida através de uma superfície menor (ponta da sonda), quando comparado ao banho ultrassônico. Eles são geralmente operados em torno de 20 kHz

e usam transdutor ligado a sonda que é imerso no reator resultando em uma entrega direta de ultrassom no meio de extração com perda mínima de energia ultrassônica (CHEMAT *et al*, 2017).

O processo de extração por ultrassom pode ser influenciado, consideravelmente, pela escolha do solvente, onde a solubilidade das substâncias a serem extraídas, a viscosidade e a superfície de tensão do solvente afetam o fenômeno de cavitação acústica. O aumento da viscosidade ou o aumento da superfície de tensão induz o aumento das interações moleculares, conseqüentemente, aumentando o limite de cavitação, tornando necessária maior intensidade para se obter as vibrações para promover o processo de cavitação. Um solvente com pressão de vapor menor é preferível na extração por ultrassom devido a maior intensidade do colapso das bolhas de cavitação (CHEMAT *et al*, 2017).

Portanto a escolha por um método de extração prático e eficiente é um objetivo constante nas avaliações de substâncias bioativas, onde diversos parâmetros devem ser observados, como por exemplo, solvente, tempo e temperatura usados. E assim obter melhores rendimentos das extrações, assim como extratos com maiores teores de substâncias bioativas como as substâncias fenólicas presentes nos extratos de própolis.

2.2. Substâncias polifenólicas

2.2.1. Biossíntese de Ácidos Fenólicos

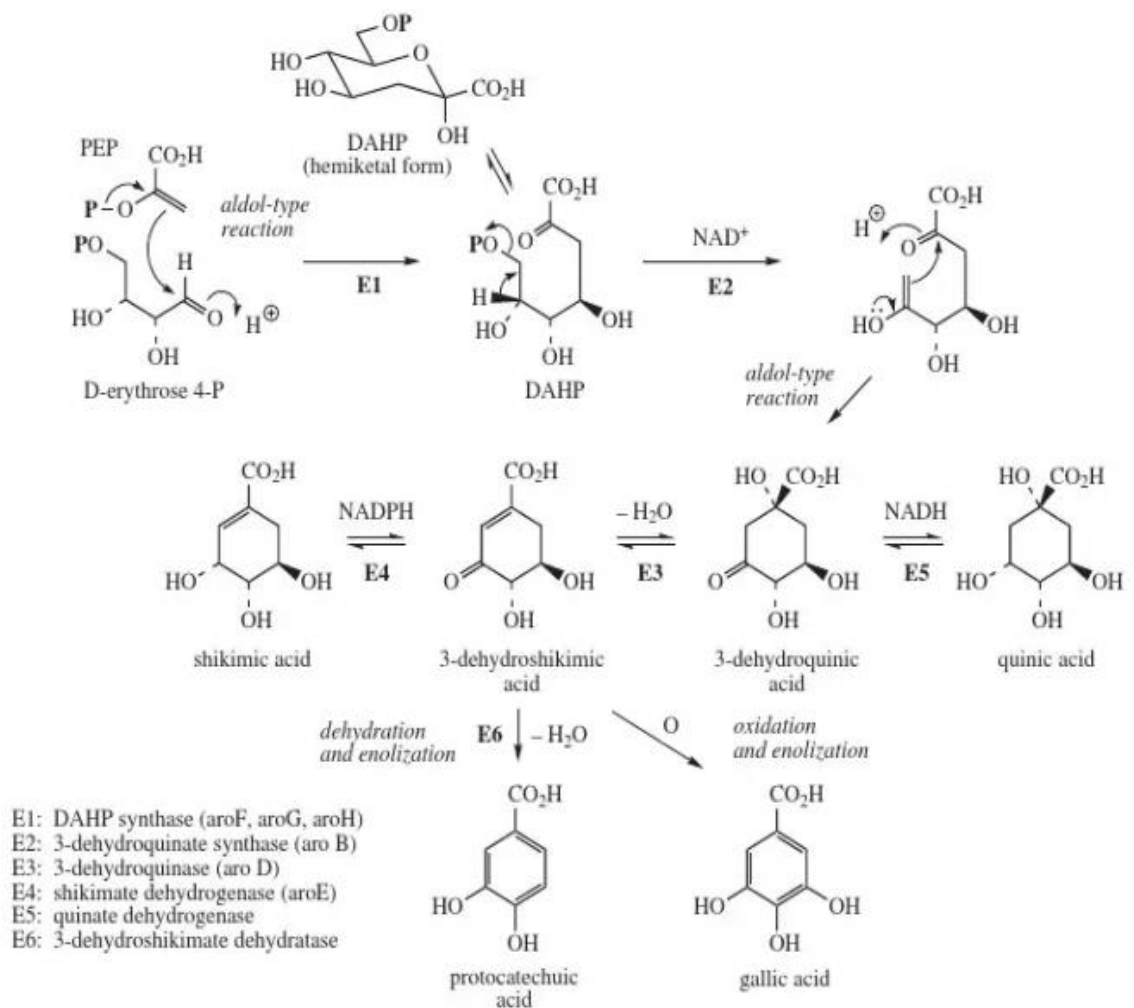
Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários, que possuem na estrutura um grupo funcional carboxílico e outro grupo fenólico, ou seja, um anel aromático substituído com pelo menos uma hidroxila. Os ácidos fenólicos são biosintetizadas por meio da via do chiquimato. Estes podem ser classificados como ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C₆-C₃) e os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono (C₆-C₁). O anel fenólico também pode estar substituído em várias posições por grupos hidroxilas e/ou metoxilas, o que distingue as diferentes substâncias. Na **Tabela 4** estão apresentadas estruturas dos ácidos cinâmico, benzóico e seus principais derivados (SALGUEIRO, 2016; SHAHIDI & YEO, 2018; WANG *et al*, 2019; SANTOS-SÁNCHEZ *et al*, 2019).

Tabela 4- Derivados de ácido benzóico e de ácido cinâmico.

Substituintes	Derivados de ácido cinâmico	Derivados de ácido benzóico
R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	Ácido cinâmico	Ácido benzóico
R ₁ =OH	Ácido orto-cumárico	-
R ₃ =OH	Ácido para-cumárico	Ácido para-hidroxibenzóico
R ₃ =R ₄ =OH	Ácido cafeico	Ácido protocatecuico
R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	-	Ácido gálico
R ₁ =R ₄ =OH	-	Ácido gentísico
R ₂ =R ₄ =OCH ₃ , R ₃ =OH	Ácido sinápico	Ácido siríngico

Uma variedade de substâncias incluindo eritrose-4-fosfato, fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase, *p*-cumarato-3-hidroxilase e *o*-metil transferase estão envolvidas na biossíntese de substâncias fenólicas. A fenilalanina e a tirosina, que são sintetizadas pela via do chiquimato são os precursores primários para a biossíntese de diferentes classes de fenólicos. A biossíntese enzimática dos fenólicos começa com a liberação de um grupo de amônia da fenilalanina pela fenilalanina amônia liase (PAL), e esta etapa produz ácido *trans*-cinâmico com a criação de uma ligação dupla. O ácido *trans*-cinâmico produzido é modificado em ácido *p*-cumárico pela cinamato-4-hidroxilase e, posteriormente, com o auxílio da *p*-cumarato-3-hidroxilase gera ácido cafeico a partir do ácido *p*-cumárico, após a introdução de um grupo hidroxila no anel aromático. Este ácido *p*-cumárico é convertido em ácido ferúlico pela ação da *o*-metil-transferase, e assim o ácido ferúlico é convertido em ácido sinápico; duas enzimas, hidroxilase e *o*-metil transferase, estão envolvidas na substituição de um grupo metoxi para a biossíntese do ácido sinápico. A tirosina, outro precursor, também é transformada em ácido *p*-cumárico, retirando um grupo de amônia através da reação enzimática da tirosina amônia liase e, em seguida, o ácido *p*-cumárico é transformado em diferentes tipos de ácidos fenólicos através das mesmas reações. Além disso, o ácido benzóico é formado pela perda de dois átomos de carbono dos ácidos cinâmicos. Assim como para os ácidos cinâmicos, as reações de hidroxilação e metilação do anel aromático do ácido benzóico geram seus correspondentes derivados. O **esquema 1** representa resumidamente a formação dos ácidos fenólicos a partir da via do chiquimato.

(STUPER-SZABLEWSKA & PERKOWSKI, 2017; SHAHIDI & YEO, 2018; WANG *et al.*, 2019; SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019)



Esquema 1 - Representação geral da biossíntese de ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (DEWICK, 2009)

2.2.2. Biossíntese de Flavonoides

Os flavonoides são substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas que formam um grupo numeroso de polifenóis, que variam amplamente em relação à estrutura e propriedades. Quanto a sua estrutura, os flavonóides são caracterizados pela presença de 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, dispostos na forma C6-C3-C6, que corresponde a dois anéis aromáticos A e B ligados por uma unidade de três átomos de carbono, que pode ou não dar origem a um terceiro anel. Os anéis são chamados A, B e C. (**Figura 6**) (ARAÚJO, 2016; SALGUEIRO, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017)

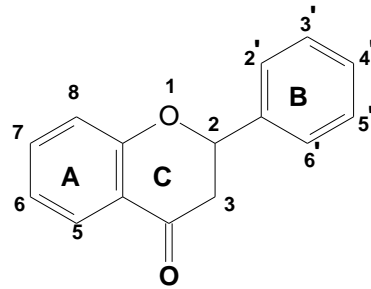
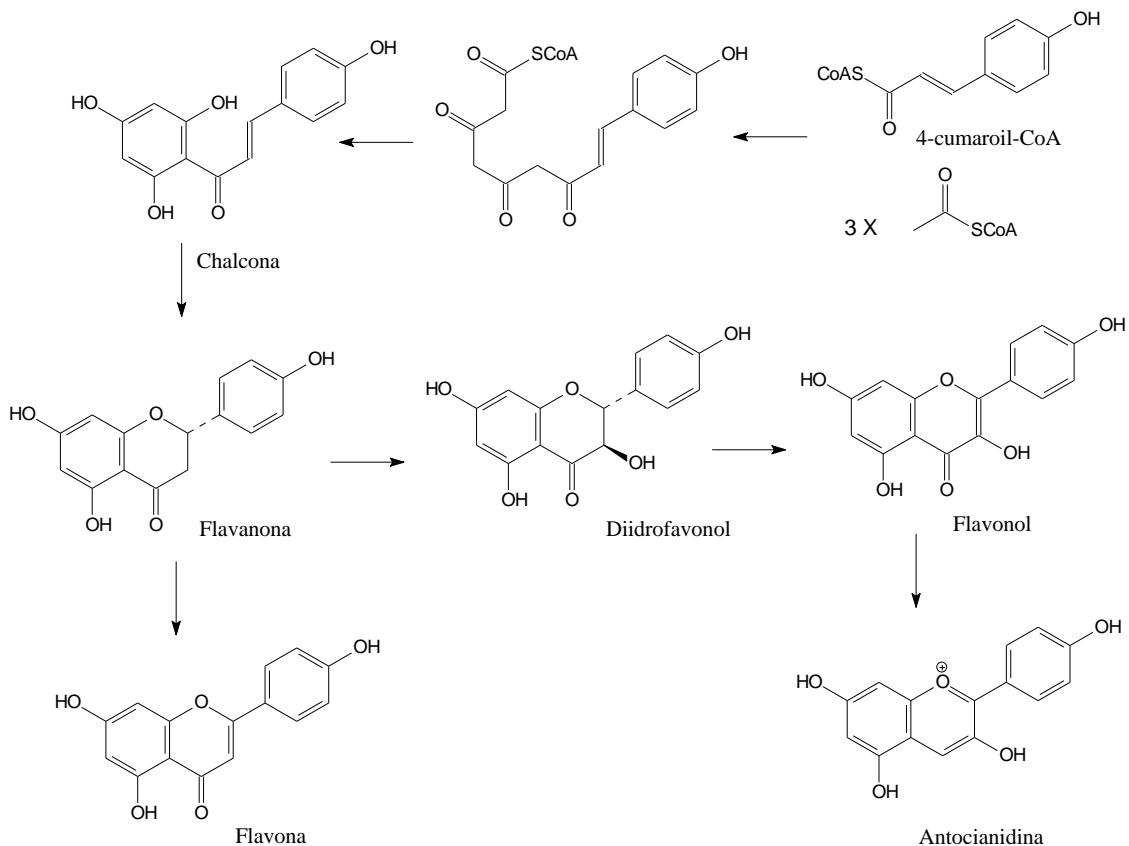


Figura 6- Estrutura básica de um flavonoide. (SALGUEIRO, 2016)

A etapa inicial na biossíntese da maioria dos flavonóides é a condensação de uma molécula *p*-coumaroilCoA (derivada da via do chiquimato, anel B) com três moléculas de malonil-CoA (origem de policetídeos, anel A) para originar chalcona (2', 4', 6', 4-tetrahidroxicalcona). Esta reação é realizada pela enzima chalcona sintase (CHS). A chalcona é isomerizada pela enzima chalcona flavanona isomerase (CHI) à flavanona. Destes intermediários centrais, a via diverge em várias rotas biossintéticas, cada uma produzindo uma classe diferente de flavonoides. O **esquema 2** representa resumidamente a formação dessa classe. (SINGH *et al*, 2017; SANTOS *et al*, 2017)



Esquema 2- Representação geral da biossíntese de flavonoides (SALGUEIRO, 2016)

Os vários tipos de flavonoides diferem uma das outras devido a pequenas variações nessa estrutura básica de 15 carbonos. De acordo com as variações estruturais no anel C, existe uma subdivisão dos flavonoides. As flavanonas, por exemplo, têm o anel B ligado ao carbono 2, enquanto que as isoflavanos têm o anel B ligado à posição 3. Flavonas e flavonóis são muito semelhantes entre si, a única diferença é que os flavonóis apresentam um grupo hidroxila (OH) na posição 3. As antocianidinas, que são a forma aglicona e os cromóforos de antocianinas, apresentam um oxigênio catiônico. Por fim, as proantocianidinas (PAS ou taninos condensados), formadas pelo ramo terminal da via dos flavonoides, apresentam as mesmas propriedades dos taninos hidrolisáveis, apesar de serem polímeros de catequinas. (ARAÚJO, 2016; SALGUEIRO, 2016; SANTOS *et al*, 2017; SILVA *et al*, 2018)

Na própolis são encontrados em sua composição diversos tipos de flavonoides: quercetina, galangina e canferol (flavonóis); apigenina e crisina (flavona); pinocembrina, pinobanksina e naringenina (flavanonas). Outra característica da própolis de regiões temperadas é a presença de flavonoides sem substituintes no anel B, como a crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina. (SALGUEIRO, 2016). A **figura 7** apresenta alguns tipos de flavonoides encontrados na própolis.

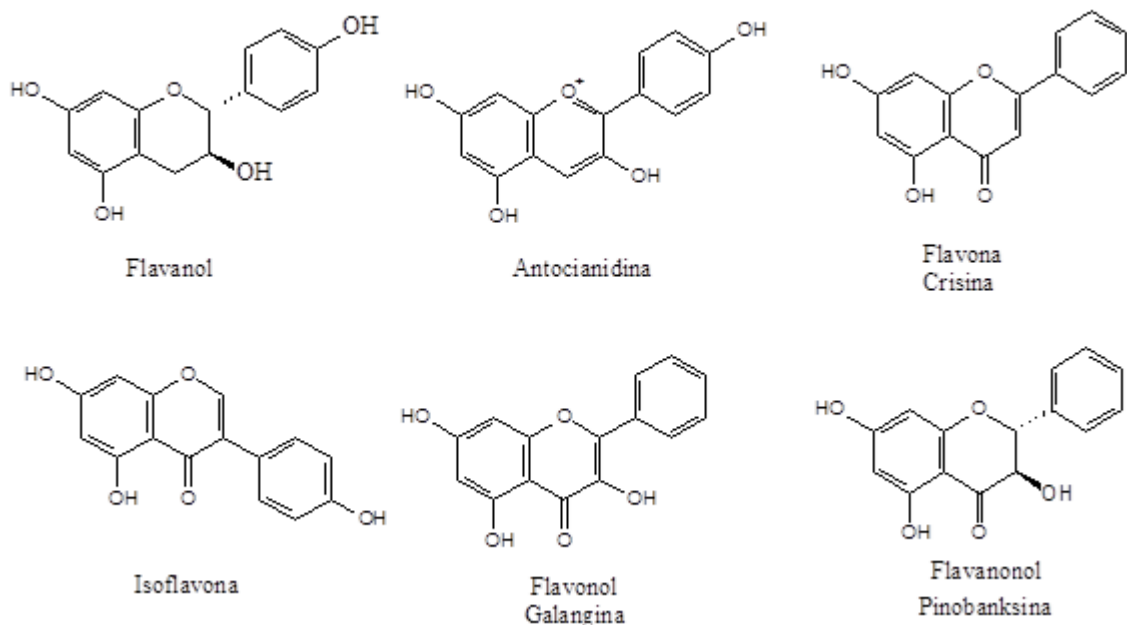


Figura 7 – Classes de flavonoides encontrados na própolis.

2.3. Propriedades biológicas da Própolis

Diversas propriedades biológicas já foram descritas para a própolis marrom brasileira, como antibacteriana, antioxidante (FERNANDES *et al*, 2014; MACHADO *et al*, 2016a), anti-inflamatória (CONTI *et al*, 2015), antiparasitária (ALDAY-PROVENCIO *et al*, 2015; SILVA *et al*, 2017), antitumoral (MACHADO *et al*, 2016a; 2016b), como pode ser observado na **Tabela 5**. Convém destacar, que em comparação com as própolis brasileiras vermelha e verde, a própolis marrom apresenta informações mais restritas sobre suas propriedades biológicas (DEMBOGURSKI,2017)

A própolis é considerada um poderoso antioxidante; e um antioxidante é uma molécula capaz de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas. A teoria radicalar na fisiologia humana afirma que os radicais livres ativos estão envolvidos em quase todos os processos de degradação e morte celular. O estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças auto-imunes, o envelhecimento, catarata, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (BOGDANOV, 2012). A propriedade antioxidante de própolis é devido à sua elevada concentração de fenóis e outras substâncias antioxidantes (BOGDANOV, 2011). Assim, a própolis pode ser considerado um suplemento potencial para a prevenção de doenças degenerativas crônicas.

Tabela 5- Principais propriedades biológicas descritas para a própolis marrom brasileira. (DEMBOGURSKI, 2017)

Atividades farmacológicas	Referências
Antioxidante	
ABTS	SILVA et al., 2017, MACHADO et al., 2016 ^a
DPPH	MACHADO et al., 2016a, BITTENCOURT et al., 2015
Peroxidação lipídica, Luminol/H ₂ O ₂ , Xantina	FONSECA et al., 2011
Antitumoral	
Citotóxica (B16F10, SF-295, HCT-116, OVCAR-8, HL-60)	MACHADO et al., 2016a, 2016b
Anti-inflamatório	
<i>In vivo</i> (lesões por <i>Herpes simplex</i> tipo 2)	SARTORI et al., 2010
Citocinas (TNF- α e interleucina IL-10)	CONTI et al., 2015, YEN et al., 2017
COX-2	
Anti-Leishmania	
<i>Leishmania amazonensis</i>	SANTANA et al., 2014
Anti-Trypanossoma	
<i>Trypanossoma cruzi</i>	SILVA et al., 2017
Antibacteriana	
<i>Bacillus subtilis</i>	BITTENCOURT et al., 2015
<i>Enterococcus faecalis</i>	FERNANDES et al., 2015, MACHADO et al., 2016b, PIMENTA et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	MACHADO et al., 2016a, BASTOS et al., 2011 ^a
<i>Micrococcus luteus</i>	BITTENCOURT et al., 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	MACHADO et al., 2016a, BITTENCOURT et al., 2015
Antifúngica	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	WALLER et al., 2017

Dentre as propriedades biológicas da própolis, a atividade antimicrobiana tem merecido destacada atenção. Esse potencial biológico atribui-se a um sinergismo que ocorre entre os constituintes presentes na sua constituição, como os compostos flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres (PETER *et al.*, 2017).

Afrouzan *et al.* (2018), estudando as composições químicas e efeitos de quatro amostras de própolis de diferentes áreas do Irã, constataram atividade antimicrobiana das mesmas contra *C. albicans*, *Escherichia coli* e *S. aureus*, talvez devido à presença de flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos, como componentes ativos que podem ser usados isoladamente ou em combinação com antibióticos, selecionados para sinergizar o efeito antibiótico, bem como prevenir a resistência microbiana aos antimicrobianos disponíveis.

Bryan *et al.* (2015) fazendo uso de microscopia eletrônica (MEV) avaliaram a ação do extrato etanólico de própolis de origem russa contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e

Escherichia coli. Após 18 h de exposição ao extrato as bactérias apresentaram graves danos às paredes celulares, que segundo os pesquisadores, indicam que o extrato induz lesões na parede celular, levando à lise da célula, e eventualmente, morte bacteriana.

Magalhães *et al* (2016) analisou a ação antibacteriana da própolis através de antibiograma. Foram utilizados discos estéreis de antibiograma, contendo própolis sem álcool, com álcool a 30%, e um grupo controle utilizando apenas álcool para a 30% em placas de petri com meio Mueller-Hinton. Foram utilizadas as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* para os testes de atividade antibacteriana. A própolis sem álcool inibiu o crescimento bacteriano de maneira muito discreta somente nas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus* e *Streptococcus*, mostrando-se menos potente quando relacionada à própolis alcóolica, e não demonstrando efeito nas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella*

Nos estudos de Campos (2017) extratos de própolis verde com diferentes proporções de água e etanol foram preparados e caracterizados quanto à sua composição e propriedade antibacteriana, contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*. As análises permitiram alegar que a própolis verde possui maior atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* quando comparada à bactéria Gram-negativa *E. coli*, o que pode ser entendido com base na diferença da composição das paredes celulares de cada bactéria.

O efeito antibacteriano do extrato etanólico de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pode ser explicado provavelmente devido à presença da membrana externa nessas espécies, sendo que bactérias Gram-negativas são mais resistentes ao extrato etanólico de própolis do que bactérias Gram-positivas. O equilíbrio do potencial de membrana é essencial para as bactérias, pois através dele ocorre o transporte de nutrientes pela membrana entre o meio externo e interno, a síntese de ATP e a motilidade celular. A própolis e alguns de seus componentes provavelmente possuem efeito sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, desestabilizando o gradiente eletroquímico de prótons da membrana o que leva à interferência sobre os processos essenciais para a manutenção da célula. Estes componentes presentes na própolis também foram relatados como responsáveis pela inibição da motilidade bacteriana. (BANKOVA *et al*, 2000; FERNANDES JÚNIOR *et al*, 2007; MAGALHÃES, 2016; CAMPOS, 2017)

Muitos estudos relatados na literatura comprovam a ação antibacteriana do extrato de própolis e por esse motivo ele pode ser considerado como um antibiótico natural. (SANTOS *et al*, 2015; FREIRES *et al*, 2016; LIMA *et al*, 2015; MOUHOUBI-TAFININE *et al*, 2016)

Em alguns casos produtos naturais como a própolis podem ser misturadas a biopolímeros como a carboximetilcelulose sódica, na formulação de membranas que podem atuar como curativos, uma vez que a própolis tendo em vista suas comprovadas propriedades biológicas atua como uma importante alternativa no tratamento de feridas, aliada também ao baixo custo de aquisição, e a fácil disponibilidade. (BASÍLIO, 2018)

Testes *in vivo* demonstraram uma boa atuação do gel de carboximetilcelulose em úlceras de perna, acelerando o processo de cicatrização (RODRIGUES *et al*, 2013). Em um trabalho realizado por Vilela (2010), a associação do hidrogel de carboximetilcelulose com própolis a 8% apresentou atividade anti-estafilocócica semelhante ao antisséptico clorixidina. Em estudo realizado por Basílio (2018) membranas poliméricas de carboximetilcelulose (CMC)-pectina foram enriquecidas com extrato etanólico de própolis vermelha em uma concentração de 10% apresentou boa atividade cicatrizante.

Franca *et al* (2014) testaram três formulações de verniz de quitosana à base de própolis contendo diferentes concentrações (5%, 10% e 15%), produzidas pela dissolução da própolis com quitosana em veículo hidroalcoólico. Dentes bovinos foram utilizados para analisar a adesão das formulações e observar a liberação controlada de própolis associada ao verniz. Foi também avaliada a atividade antimicrobiana do composto *in vitro*. As formulações apresentaram aderência na superfície dentária e foram capazes de formar filmes muito rapidamente na superfície dos dentes bovinos, prevenindo a formação de biofilmes dentários cariogênicos. Além disso, vernizes de quitosana à base de própolis mostraram atividade antimicrobiana semelhante ou melhor do que o verniz de clorexidina contra todas as bactérias patogênicas orais. Todos os microrganismos foram sensíveis ao verniz e à quitosana. Os componentes ativos da própolis foram liberados por mais 13 de uma semana.

De Luca *et al* (2017) investigaram os efeitos anticárie de um verniz de própolis experimental *in vivo*, e testaram ainda sua toxicidade contra fibroblastos. Os resultados mostraram que o verniz de própolis preveniu a cárie do esmalte na superfície lisa dos dentes de ratos e mostrou baixa toxicidade celular, encorajando novos estudos relacionados a estes compostos.

Zeighampour *et al* (2018) compararam o efeito da própolis como agente antibacteriano natural incorporada ao poliálcool vinílico (PVA) em diferentes formas de nanofibra, microfibra e filme. A manta nanofibrosa apresentou liberação contínua de própolis durante 96 horas, mantendo a atividade antibacteriana total por até 51 h, o que é de grande importância nas feridas por queimaduras. Estes resultados confirmam o desempenho avançado da própolis natural na forma de substrato de nanofibra como curativo.

2.4. Biopolímeros

Polímeros são macromoléculas compostas de subunidades que se repetem (monômeros), podendo ser de origem natural ou sintética. Os polímeros podem ser classificados, quanto à fusibilidade, em termoplásticos e termorrígidos. Os polímeros termoplásticos podem ser fundidos, viabilizando a moldagem e reciclagem, enquanto os termorrígidos, que são polímeros rígidos e frágeis, mas relativamente estáveis a variações de temperatura, não são capazes de serem fundidos ou solubilizados devido as reticulações das cadeias poliméricas. Dentre os polímeros termoplásticos encontram-se os derivados de celulose, dentre os quais os éteres de celulose são de grande importância por suas propriedades espessantes, aglutinantes e formadores de filmes (MARTINEZ, 1996).

Os polímeros apresentam uma ampla aplicação em diversas áreas, sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica como excipientes em formulações de medicamentos, por isso são muito conhecidos como biomateriais. Um biomaterial é definido como qualquer tipo de material que é usado para produzir um dispositivo farmacologicamente inerte, que pode auxiliar ou substituir uma função fisiológica de uma maneira segura, confiável e fisiologicamente aceitável (PARK, 2012).

O uso de biomateriais aumentou consideravelmente, devido a uma variedade de fatores como envelhecimento da população, devido a uma série de doenças congênitas e lesões e as melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis (BASÍLIO, 2018; PIRES *et al*, 2015).

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os materiais cerâmicos ou metálicos incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e

disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (PIRES *et al*, 2015).

As aplicações dos biopolímeros na medicina regenerativa incluem o tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos, entre outras. Isto se deve às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a matriz extracelular e por induzir e estimular o processo de cicatrização de feridas. Além do mais, os polímeros naturais possuem grupos funcionais (como grupamentos amino, grupos carboxílicos e hidroxilas) disponíveis para modificações químicas (hidrólise, oxidação, redução, esterificação, ligações cruzadas, etc.) e enzimáticas e, também, para interagir com outras moléculas, o que permite a obtenção de uma vasta variedade de produtos com propriedades adaptáveis (PIRES *et al*, 2015).

É crescente o número de publicações que envolvem biopolímeros, uma vez que os mesmos também são uma alternativa para promoção da sustentabilidade (**Figura 8**) (FARIAS *et al*, 2016)

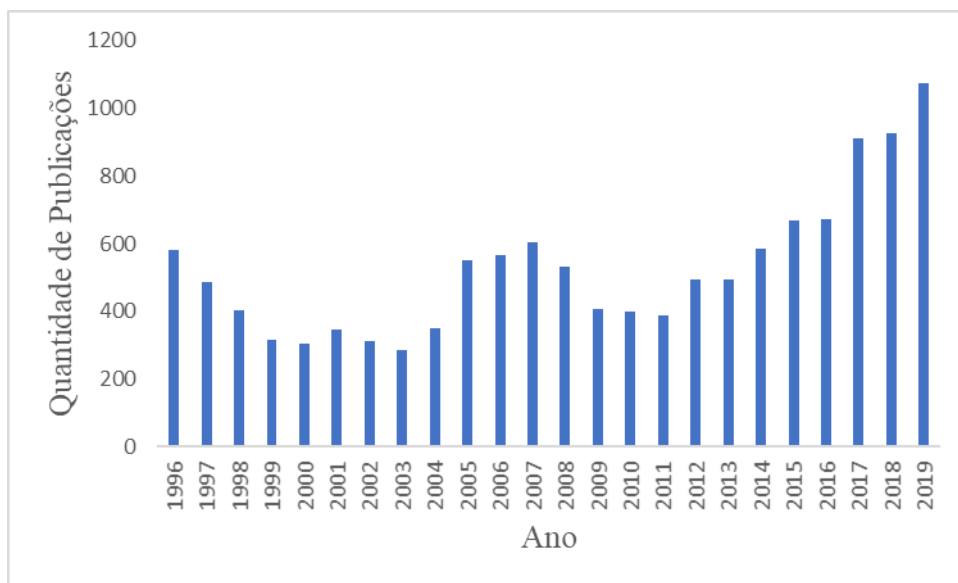


Figura 8- Publicações anuais sobre biopolímeros .
(www.sciencedirect.com em 30/07/19).

Os polissacarídeos também vêm ganhando apreciável interesse para uso no âmbito médico devido as suas propriedades, tais como renovabilidade, biodegradabilidade e por mimetizar os componentes da matriz extracelular, o que os tornam elementos-chave em processos biológicos. Estes biopolímeros também são muito importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e efeito hidratante, dentre outras. Os polissacarídeos são obtidos a partir de fontes microbianas, animais, vegetais

ou de algas e, assim como as proteínas, podem ser processados como géis, filmes, partículas e pós (FELLOWS, 2018)

Esta classe de polímeros apresenta grupos químicos reativos característicos, como hidroxila, amino, acetamido, carboxila e sulfato, que lhe conferem propriedades únicas. Além disso, possuem alta massa molar com ampla distribuição de tamanhos. A presença de um grande número de grupos -OH nos polissacarídeos leva à tendência à formação de ligações de hidrogênio intra e intercadeias, que, por sua vez, podem resultar na redução da solubilidade, com consequente formação de agregados em solução, contribuindo também no aspecto de formação de filmes. O leve caráter hidrofóbico decorrente da presença de grupos -CH leva a formação de estruturas estereorregulares de caráter semi-rígido e com formação helicoidal em solução. Além disso, a estabilidade estrutural é dependente, com frequência, da temperatura e da presença de íons (DE SOUSA *et al*, 2015).

A celulose, principal componente da parede celular de plantas, é um polissacarídeo formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β -D-glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. A unidade estrutural de repetição da molécula de celulose é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose. Este polímero apresenta elevado grau de cristalinidade, baixa solubilidade e baixa degradação *in vivo*. As principais aplicações na área médica incluem membranas de diálise e *scaffolds* para engenharia tecidual (PIRES *et al*, 2015).

A celulose (**Figura 9**) é o polímero vegetal mais abundante na natureza, no entanto, o fato de ser insolúvel em água restringe sua empregabilidade. Portanto, é comum a modificação química da celulose para formar derivados como a metilcelulose, hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose sódica. A capacidade de ser biodegradável, o baixo custo, baixa toxicidade e a abundância de material celulósico na natureza tornam os polímeros derivados de celulose um dos mais utilizados, sendo aplicáveis no ramo alimentício, cosmético e farmacêutico em ampla variedade de formulações (SANNINO *et al*, 2009; XU *et al*, 2014). Uma das principais aplicações farmacêuticas dos derivados de celulose é no revestimento de comprimidos, atuando como direcionador e modulador na liberação de fármacos devido a sua ação aglutinante (VILLANOVA & ORÉFICE, 2010; LOPES *et al*, 2005).

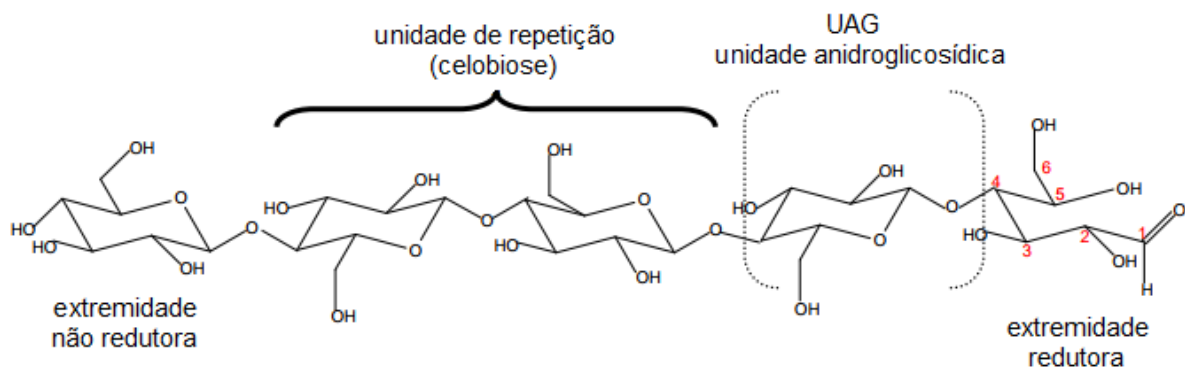


Figura 9- Estrutura da celulose (adaptado de CERRUTTI & FROLLINI, 2009).

A carboximetilcelulose (CMC) é um dos principais polímeros derivados da celulose, sendo formada através da reação da celulose com ácido monocloroacético em meio alcalino, via reação de Williamson (**Figura 10**), primeiramente sintetizada em 1918. A carboximetilcelulose é um polímero solúvel em água, cuja viscosidade e capacidade de adsorção pode ser modulada através da variação de pH, concentração e temperatura. Pode atuar como um hidrocoloide, formando gel ou uma dispersão viscosa em água (FUJIMOTO *et al*, 2002; SAHA & BHATTACHARYA, 2010).

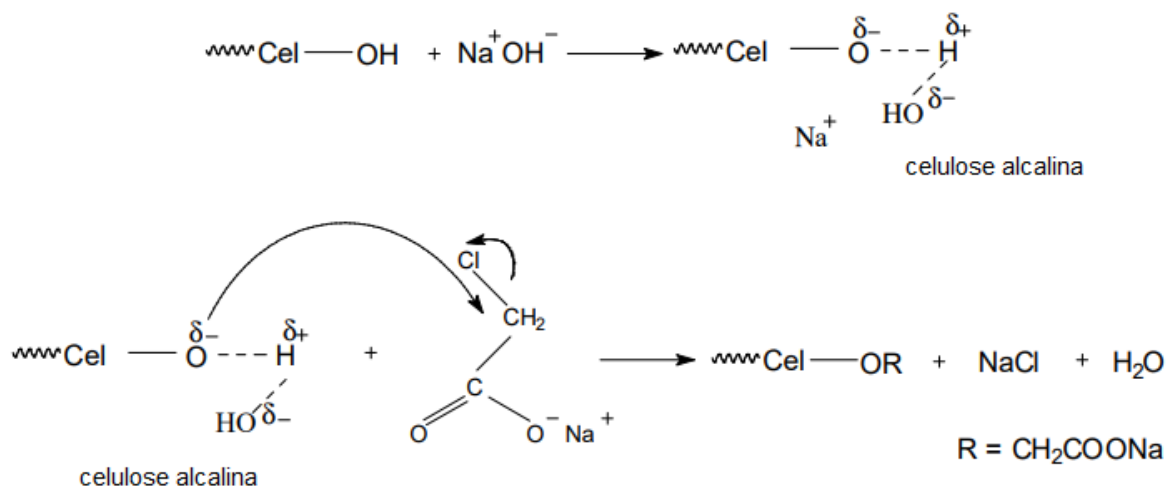


Figura 10- Obtenção do éter da celulose (CMC) através da substituição do halogênio do ácido monocloroacético (adaptado de CERRUTTI & FROLLINI, 2009).

Atualmente são conhecidos diversos tipos de curativos para o tratamento de lesões na pele, desde curativos tradicionais como gaze, pomadas e ataduras, aos curativos bioativos, que

liberam substâncias ativas durante a cicatrização da ferida e agem diretamente nas camadas da pele, acelerando o processo de recuperação do tecido (DE Sousa *et al*, 2015).

Curativos convencionais atuam apenas como cobertura passiva da ferida, mantendo-a protegida do meio ambiente. Entretanto, idealmente um curativo deve não apenas proteger a lesão, mas também promover o processo de cicatrização, proporcionando um microambiente adequado, hidratado e com isolamento térmico removendo o excesso de exsudato e promovendo trocas gasosas. Neste contexto, propostas de terapias alternativas que busquem o restabelecimento mais rápido e efetivo da pele lesada são de grande relevância (DE SOUSA *et al*, 2015).

A carboximetilcelulose vem sendo recentemente utilizada em curativos para tratamento de feridas e queimaduras, a fim de melhorar o processo de cicatrização, podendo ser utilizada pura ou em associação com outros polímeros. Devido a sua característica higroscópica, a carboximetilcelulose promove o desbridamento autolítico de feridas (amolecimento e remoção do tecido desvitalizado), facilita a reidratação celular e apresenta ação bacteriostática, sendo portanto aplicável em feridas com crostas, fibrinas, tecidos desvitalizados e necrosados (WARING & PARSONS, 2001; MOSELEY *et al*, 2003; DHIVYA *et al*, 2015).

2.4.1. Desenvolvimento de filmes ou membranas poliméricas

Filmes ou membranas poliméricas para aplicação transdérmica têm sido amplamente empregados em sistemas de liberação controlada modulando a liberação e às formas convencionais de administração de fármacos. Uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos tem sido empregada na preparação de sistemas de transporte de princípios ativos, pois podem fornecer muitas vantagens ao serem utilizados como soluções poliméricas filmogênicas em sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como: alta flexibilização de dosagem, alta adesão do paciente ao tratamento, resistência ao atrito e maior período de permanência na região aplicada (BASAVARAJU *et al*, 2008).

As formulações formadoras de filmes envolvem frequentemente, a presença de pelo menos um agente formador de filme (macromolécula), solvente (água, etanol e outros e substâncias que mudam as propriedades dos filmes, como agentes plastificantes e reticulantes, como o ácido cítrico) (FELTON, 2013)

Agentes reticulantes são substâncias de baixa massa molar que apresentam grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter-intracadeias (GONSALVES *et al*, 2011). A reticulação visa principalmente modificar as propriedades e estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade e cor (GUPTA & GOPAL, 2011).

Vários reticulantes são utilizados, como o glutaraldeído, formaldeído, ácido cítrico e outros. Entre os reticulantes usados, o ácido cítrico vem sendo bastante estudado (SELIGRA *et al*, 2016; MALI *et al*, 2017; GHORPADE *et al*, 2017).

O processo de reticulação leva a formação de éster, que não ocorre em baixas temperaturas. Uma variedade de características estruturais e físicas muda com o resultado da esterificação (SHI *et al*, 2008). Em relação ao processo de reticulação usando o ácido cítrico como agente reticulante, que foi usado neste trabalho com o polímero NaCMC, a reticulação ocorreu pela esterificação através da formação de um anidrido cíclico reativo. Nesse processo, quando o ácido cítrico é aquecido, ele desidrata obtendo-se um anidrido cíclico altamente reativo, que reage facilmente com os grupos hidroxilas presentes na NaCMC. (**Figura 11**)

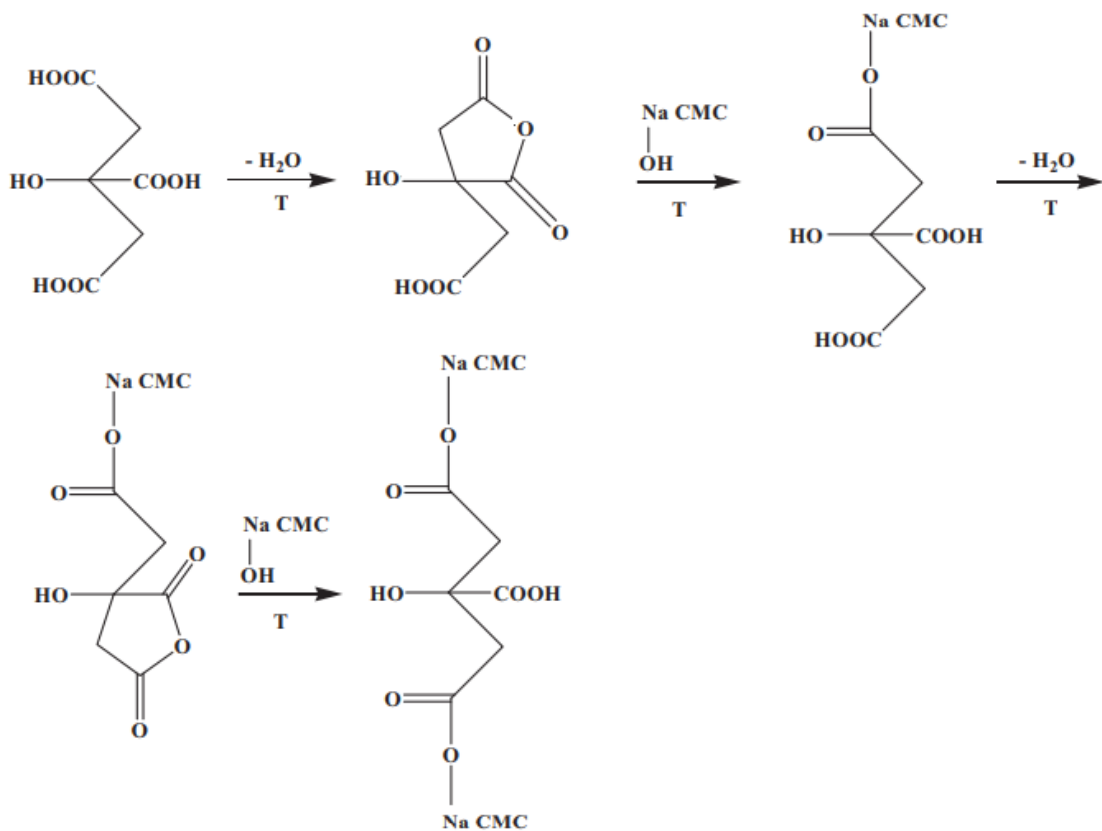


Figura 11- Reticulação da NaCMC pelo ácido cítrico (Adaptado GORGIEVA & KOKOL, 2011)

Na maioria dos filmes, a matriz é constituída por um polímero de cadeia longa. Estruturas desse tipo são necessárias para formar uma matriz filmogênica com força de coesão apropriada quando dispersa em solvente adequado. Este poder coesivo do filme é descrito pela estrutura química e polimérica do sistema e do solvente e, quanto maiores a polaridade e o comprimento da cadeia polimérica, maior a coesão, devido a maior probabilidade de ligações de hidrogênio intermoleculares e interação iônica entre as cadeias. (FURLANETTO, 2014)

O filme pode ser formado em suportes próprios, com forças de adesão atuando entre o filme e o suporte. Entre os materiais que constituem os suportes, os mais citados na literatura são: acrílico, vidro e poliestireno (FURLANETTO, 2014).

Os filmes podem ser obtidos pelo método de pulverização (“*spraying*”), extrusão e evaporação do solvente (“*casting*”). O método de *casting* consiste na deposição da solução filmogênica em uma superfície adequada e secagem pela evaporação do solvente. O processo de evaporação do solvente envolve a dispersão do polímero em um solvente adequado formando uma solução filmogênica (**Figura 12**). Depois da evaporação do solvente o filme é destacado do suporte. Durante a evaporação do solvente há um aumento da concentração da dispersão. Com isso, as forças intermoleculares, entre os segmentos de cadeias poliméricas tornam-se cada vez mais eficazes e os filmes resultantes apresentam estrutura densa e forte devido ao entrelaçamento das cadeias (SIEPMANN *et al*, 2008; FELTON, 2013).

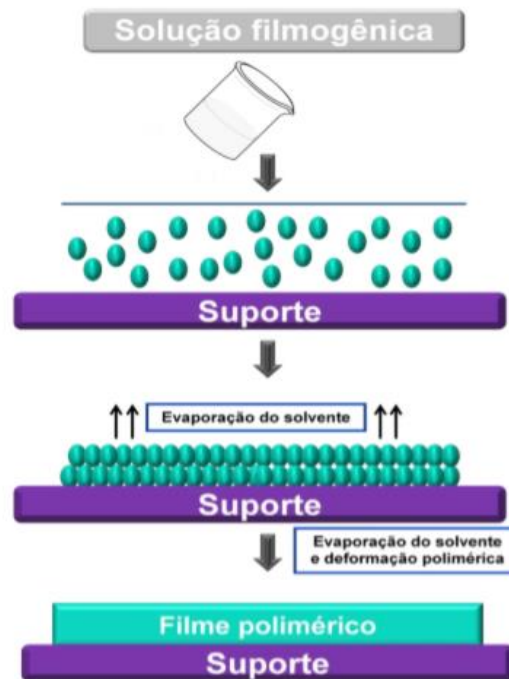


Figura 12- Formação de filmes poliméricos pelo método de “casting” (Adaptado: SIEPMANN et al, 2008; FELTON, 2013).

A impregnação de materiais ativos em sistemas poliméricos, para posterior liberação controlada, vem sendo utilizada devido a preservação das características do material ativo a ser impregnado. A impregnação (adsorção) é um processo que envolve o contato de uma fase aquosa contendo soluto livre com uma fase particulada rígida que esteja propensa a remover ou estocar, seletivamente, um ou mais solutos presentes na solução (ATKINS,1993; SINHÁ, 2004).

No campo de liberação controlada, os polissacarídeos naturais têm sido cada vez mais empregados devido às suas propriedades diferenciadas, tornando-se, talvez, os materiais poliméricos mais populares nesta área. Os polissacarídeos naturais podem agir como excipientes na liberação controlada, protegendo o fármaco, aumentando a estabilidade da preparação farmacêutica, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e a sua aceitação pelo paciente, sendo degradados pelo organismo enquanto o fármaco é liberado. Com o uso de polissacarídeos no campo da liberação controlada, tem-se tornado possível manter a concentração de fármaco constante no organismo durante períodos relativamente longos de tratamento, de modo que atinja o efeito desejado sem causar efeitos colaterais. Alguns

exemplos de sistemas de liberação controlada obtidos a partir de polissacarídeos são as partículas, os hidrogéis e os curativos de pele contendo fármacos. (DE SOUSA *et al*, 2015)

Polímeros formadores de filmes são alternativas aos sistemas convencionais de tratamentos medicamentosos. Eles tornam o tratamento mais confortável e funcional à medida que, por exemplo, podem ser aplicados em processos de cicatrização de feridas. Podem ser carreadores de fármacos que será liberado continuamente naquele local. Por serem transparentes, permitem a visualização da ferida e pode ser removido facilmente sem riscos ou danos a integridade física do paciente (OSHIRO JUNIOR, 2014).

A velocidade de liberação do fármaco em sistemas constituídos a base de polímeros hidrofílicos, como a carboximetilcelulose sódica, é condicionada por um ou mais dos seguintes mecanismos cinéticos: transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica, intumescimento do polímero com formação de camada de gel, difusão do fármaco através do polímero intumescido, erosão do polímero intumescido. (LOPES, 2005)

Os sistemas transdérmicos de liberação de fármacos incluem medicamentos inovadores baseados em sistemas reservatórios e matriciais (VILLANOVA, 2010). Esses sistemas são considerados preparações farmacêuticas semissólidas em forma de adesivos ou *patches* e são preparados para aplicação sobre a pele, visando a ação sistêmica do fármaco (VILLANOVA, 2010; OSHIRO JUNIOR, 2014).

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o perfil químico, o teor em substâncias fenólicas, a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana de dez amostras de extratos de própolis marrom (abelha *Apis mellifera*) obtidas do município de Japira Norte do Paraná, para posterior comparação com o perfil de própolis verde que foi anteriormente estudada e caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa. Assim como, preparar biofilmes de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) impregnados de extrato de própolis verde.

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativamente e quantitativamente o uso de dois solventes (etanol e metanol) e diferentes metodologias de extração: maceração dinâmica em temperatura ambiente (MD), maceração dinâmica com aquecimento à 50°C (MDAQ), ultrassom

(US) e ultrassom com sonda de imersão (USI) no preparo de extratos da própolis bruta marrom.

- Avaliar o teor de bálsamos e cera da própolis marrom.
- Avaliar e comparar os teores de fenólicos (TP) e flavonoides (TF) totais dos diferentes extratos de própolis marrom.
- Avaliar o potencial antirradicalar dos diferentes extratos de própolis marrom pelos métodos de captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e pelo poder de redução do ferro (FRAP).
- Identificar, quantificar e comparar as substâncias presentes nos diferentes extratos de própolis marrom por CLAE-DAD.
- Comparar o perfil químico e capacidade antioxidante dos diferentes extratos de própolis marrom com extratos de própolis verde.
- Aplicar o método de análise multivariada (ACP) aos resultados obtidos para os extratos de própolis marrom em comparação com os resultados dos extratos de própolis verde.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos EEP-MD de própolis marrom.
- Preparar e caracterizar filmes de carboximetilcelulose sódica e avaliar a impregnação dos extratos de própolis verde, anteriormente obtida pelo grupo, nestes biofilmes.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material e Métodos

O solvente utilizado para os ensaios espectrofotométricos foi metanol grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil).

Os reagentes: carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado, persulfato de potássio foram comprados da VETEC (RJ, Brasil). Enquanto os reagentes 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e carboximetilcelulose sódica (NaCMC, Mw 250000 Da) foram obtidos comercialmente da Sigma (Brasil).

Os padrões para cromatografia: ácidos clorogênico, cafeico, sinápico, ferulico, *p*-cumárico, rosmarínico, 2,3-dimetoxi benzoico e 2,5-dimetoxi benzoico; e os flavonoides:

hesperidina, naringenina, pinobanksina, acacetina, canferide, canferol, pinocembrina, galangina e pinostrombina, e a vanilina foram adquiridos da Sigma (Brasil).

Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados em um aparelho UV-vis da marca NOVA 2000UV e também no leitor de microplacas Elisa (BioRad).

A fase móvel utilizada na análise por CLAE foi composta de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, SP, Brasil), metanol e ácido acético com grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,45 µm (Sartorius) para remover todas as impurezas.

4.2. Amostras de Própolis

No presente trabalho foram estudadas dez amostras de própolis castanho escura *in natura* obtidas diretamente de apicultores do município de Japira, Norte do Paraná (**Tabela 6**).

Tabela 6- Amostras de própolis marrom usada neste trabalho.

Códigos das amostras	Local	Tipo de coleta	Data
P1	Japira- Paraná	Raspagem	13/11/2013
P2	Japira- Paraná	Raspagem	16/11/2013
P3	Japira- Paraná	Raspagem	13/11/2013
P4	Japira- Paraná	Raspagem	13/11/2013
P5	Japira- Paraná	Raspagem	13/11/2013
P6	Japira- Paraná	Raspagem	13/11/2013
P7	Japira- Paraná	Raspagem	21/11/2013
P8	Japira- Paraná	Raspagem	21/11/2013
P9	Japira- Paraná	Raspagem	21/11/2013
P10	Japira- Paraná	Raspagem	22/11/2013

As amostras de própolis *in natura* foram resfriadas em nitrogênio líquido e em seguida pulverizadas em liquidificador industrial. O material pulverizado foi mantido em frascos bem fechados, sob refrigeração, até o momento das análises (**Figura 13**).

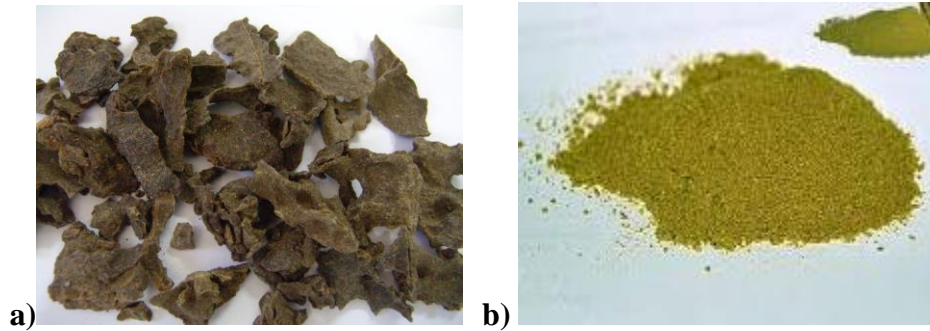


Figura 13- a) Amostra de própolis *in natura*. b) Própolis pulverizada

4.3. Preparo dos extratos da própolis

Dois gramas de própolis pulverizada foi extraída com etanol e metanol através de quatro diferentes métodos:

- a) maceração dinâmica com 50 mL de etanol P.A (95%) a temperatura ambiente por 48 h;
- b) maceração dinâmica com 50 mL de etanol P.A (95%) a 50°C por 48 h;
- c) extração em banho de ultrassom com 50 mL de etanol P.A (95%) a temperatura ambiente por 2h; e
- d) extração com ultrassom usando sonda de imersão com 50 mL de etanol P.A (95%) à temperatura ambiente por 30 min.

Após cada etapa de extração, os extratos foram filtrados, separadamente, em funil de Buchner. Cada extrato foi concentrado sob pressão reduzida até um pequeno volume, resultando nos extratos brutos:

a) Etanólicos denominados: extrato etanólico de própolis por maceração dinâmica (EEP-MD), extrato etanólico de própolis por maceração dinâmica e aquecimento (EEP-MDAQ), extrato etanólico de própolis por agitação com ultrassom (EEP-US) e extrato etanólico de própolis por agitação com ultrassom de imersão (EEP-USI)

b) Metanólicos denominados: extrato metanólico de própolis por maceração dinâmica (EMP-MD), extrato metanólico de própolis por maceração dinâmica e aquecimento (EMP-MDAQ) extrato metanólico de própolis por agitação com ultrassom (EMP-US) e extrato metanólico de própolis por ultrassom com sonda de imersão (EMP-USI) (**Tabela 7**).

Tabela 7- Código das amostras e condições de extrações utilizados no preparo dos extratos de própolis.

Códigos das amostras	Tipo de extração	Temperatura	Tempo de extração	Solvente
EEP-MD	Maceração dinâmica	Ambiente	48h	Etanol
EEP-MDAQ	Maceração dinâmica	50°C	48h	Etanol
EEP-US	Banho de ultrassom	Ambiente	2h	Etanol
EEP-USI	Ultrassom com sonda de imersão	Ambiente	30 min	Etanol
EMP-MD	Maceração dinâmica	Ambiente	48h	Metanol
EMP-MDAQ	Maceração dinâmica	50°C	48h	Metanol
EMP-US	Banho de ultrassom	Ambiente	2h	Metanol
EMP-USI	Ultrassom com sonda de imersão	Ambiente	30 min	Metanol

4.4. Determinação do teor de bálsamos e ceras

Para a determinação do conteúdo de bálsamos nos extratos etanólicos de própolis (EEP) foi utilizado o método descrito por Popova *et al* (2007). Dois mililitros de cada um dos dez extratos etanólicos (EEP) foi seco em estufa a 50°C até peso constante, e a porcentagem de bálsamo nos extratos foi calculada como a fração solúvel em etanol P.A. (95%).

O conteúdo de ceras foi estimado pelo método descrito por Woisky e Salatino (1998). Porções de 1 g de cada amostra de própolis pulverizada foram submetidas à extração exaustiva com éter de petróleo a 40-60 °C (50 mL). Em seguida, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, 30 mL de etanol quente foi adicionado sob o resíduo. A mistura foi mantida sob ebulição até que fossem separadas duas fases: uma solução clara na porção superior e pequena quantidade de resíduo oleoso na parte inferior. A fase etanólica superior foi filtrada a quente através de papel de filtro para recipiente previamente pesado, evitando a passagem do material oleoso. O filtrado foi então resfriado a 0°C, e novamente pesado. O filtrado e o resíduo após secagem a temperatura ambiente, foram mantidos em dessecador até que atingissem peso constante. Os resultados foram expressos em mg por grama de própolis.

4.5. Análise dos extratos de própolis por espectrofotometria na região do UV-Vis

Os espectros de absorção dos diferentes extratos de própolis foram obtidos de acordo com a metodologia modificada descrita por Park e colaboradores (2000). Os extratos de própolis marrom (EEP e EMP) foram previamente solubilizados em metanol espectroscópico na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções recém-preparadas foram diluídas com 5 mL de metanol grau espectroscópico, e os espectros de absorção foram obtidos na região UV-Vis, determinados na faixa de 200 a 500 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu), com cubeta de quartzo de caminho ótico de $4,0 \text{ cm}$.

4.6. Determinação de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura por Salgueiro e Castro (2016), utilizando o método redox com reagente de Folin-Ciocalteu. Os extratos foram previamente solubilizados (1 mg.mL^{-1}) em metanol espectroscópico no momento do ensaio e foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm .

Uma alíquota ($50 \mu\text{L}$) de cada um dos extratos foi transferida para um tubo de ensaio, onde foi acrescentado $2,5 \text{ mL}$ do reagente Folin-Ciocalteu (1:10, previamente diluído em água ultrapura) e $2,0 \text{ mL}$ de uma solução de Na_2CO_3 (4%) recém preparada em água ultrapura. A mistura reacional ficou em repouso durante 5 min em banho à $50 \text{ }^\circ\text{C}$, onde foi possível observar uma mudança de coloração do amarelo esverdeado para o azul. A leitura foi feita após o tempo de incubação em espectrofotômetro UV-vis fixo em 760 nm , utilizando como branco, água ultrapura (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). O teor de fenólicos totais nos extratos de própolis foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrão de ácido gálico. A curva analítica foi construída a partir uma solução metanólica do padrão comercial, com faixa de concentração de 25 , 50 , 100 , 200 , 300 , 400 , 500 e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e o ensaio foi realizado a partir de $50 \mu\text{L}$ de cada uma dessas soluções, sob as mesmas condições reacionais. A construção da curva analítica foi conduzida no software Origin 6.0 para a obtenção de uma equação da reta onde Y é o valor da absorbância e X a concentração correspondente (**Figura 14**). Através da equação ($Y =$

$0,12497 + 0,12951X$, onde o coeficiente de correlação foi $r = 0,99949$) determinou-se indiretamente o teor de fenólicos totais nas amostras, e todas as análises foram realizadas com 3 repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 mg de extrato (EAG.100 mg-1 de extrato).

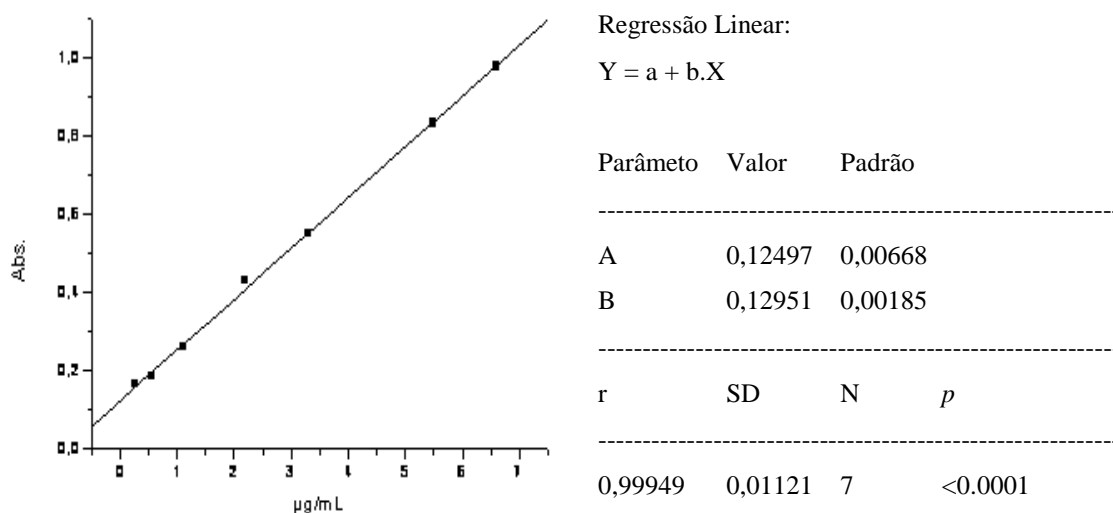


Figura 14 - Curva analítica da relação entre a concentração (X) versus a absorbância (Y), construída para a análise de fenólicos totais a partir do padrão comercial de ácido gálico.

4.7. Determinação do teor de flavonoides totais

O ensaio de determinação do teor de flavonoides totais foi realizado de acordo com o procedimento descrito na literatura por Salgueiro e Castro (2016), pelo método de complexação utilizando o ácido de Lewis $AlCl_3$. Os extratos foram previamente solubilizados (1 mg.mL^{-1}) em metanol espectroscópico no momento do ensaio. Foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm

Uma alíquota ($400 \mu\text{L}$) de cada um dos extratos (EEP e EMP) foi transferida para um balão volumétrico com 10 mL de capacidade, onde foi acrescentado $200 \mu\text{L}$ de uma solução metanólica recém-preparada de $AlCl_3$ (2%). O volume total do balão foi completado com metanol espectroscópico e a solução ficou em repouso à temperatura ambiente durante 30 min, quando foi possível observar uma intensificação na cor amarela. A leitura foi feita após o tempo de incubação com comprimento de onda fixo em 425 nm, tendo como branco metanol espectroscópico (SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

O teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da absorbância de acordo com uma curva analítica construída a partir do padrão de quercetina. A curva analítica foi construída a partir uma solução metanólica do padrão comercial, com faixa de concentração de 50, 40, 30, 20, 10, 15, 5 e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e o ensaio foi realizado a partir de 400 μL de cada uma dessas soluções, sob as mesmas condições reacionais. A construção da curva analítica foi conduzida no software Origin 6.0 (**Figura 15**). Através da equação ($Y = 0,04078 + 0,06553X$, onde o coeficiente de correlação foi $r = 0,99948$) determinou-se indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, e todas as análises foram realizadas com três repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato (EQ.100 mg^{-1} de extrato).

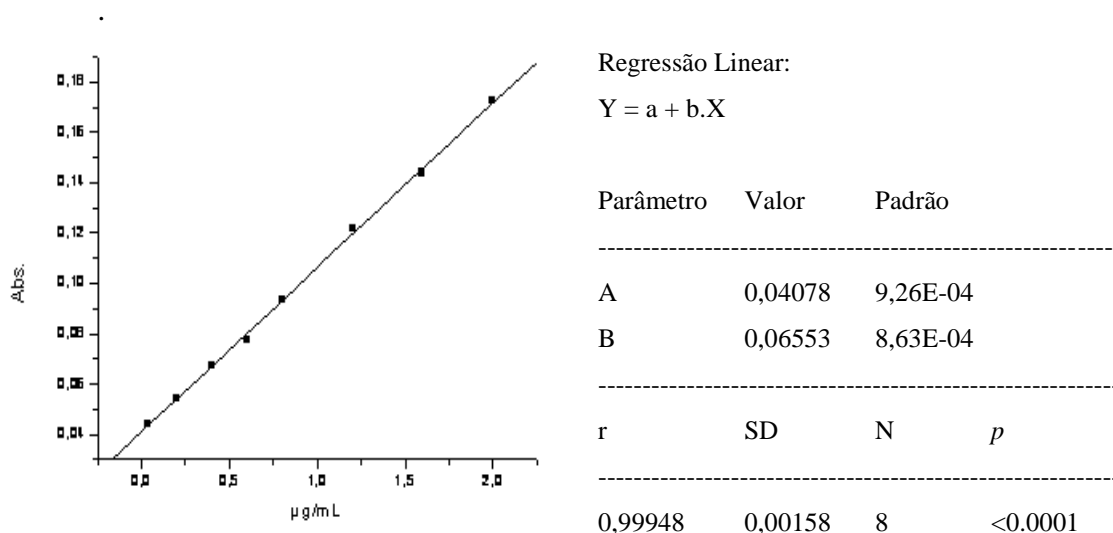


Figura 15 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorbância (Y), construída para a análise de flavonoides totais a partir do padrão comercial de quercetina.

4.8. Avaliação da capacidade antioxidante

4.8.1. Método do DPPH

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada de acordo com a metodologia descrita na literatura por Salgueiro e Castro (2016). Neste ensaio, foi determinada a capacidade das substâncias que compõem o extrato em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de coloração violeta intenso. Neste ensaio observa-se a descoloração do radical na presença de substâncias com capacidade antioxidante, e a porcentagem de atividade (AA%) pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

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

Onde:
 Abs amostra = absorvância da amostra com a solução de DPPH
 Abs branco = absorvância da amostra com metanol
 Abs controle = absorvância do metanol com a solução de DPPH

Os resultados foram expressos em CE_{50} , que representa a concentração necessária para que a atividade do radical DPPH se reduza em 50%. Para a determinação do CE_{50} dos extratos de própolis, foram preparadas soluções de extrato em metanol, partindo de uma solução inicial de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados foram expressos em CE_{50} , que representa a concentração necessária para que a atividade do radical DPPH se reduza em 50%. O ensaio foi conduzido utilizando duas microplacas de 96 poços cada para cada amostra, com três repetições em cada linha e em ordem crescente de diluição. A partir de uma solução inicial de extrato de própolis com concentração em $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, $71 \mu\text{L}$ foram pipetados para as fileiras B, C e D, nas colunas de 1 a 11. Como controle, para seis primeiros poços da fileira A, foi pipetado uma alíquota de $71 \mu\text{L}$ de metanol espectroscópico. O branco foi preparado a partir de uma alíquota de $29 \mu\text{L}$ de metanol espectroscópico com $71 \mu\text{L}$ do extrato de própolis diluído, nas colunas 10, 11 e 12 das respectivas fileiras B, C e D. Em seguida, foram pipetados $29 \mu\text{L}$ de uma solução recém preparada com o radical DPPH ($0,3 \text{ mM}$) para cada um dos poços, com exceção dos poços relativos ao branco e ao controle. As placas foram incubadas sob abrigo de luz durante 30 min, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA, com UV fixo em 520 nm (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Todos os ensaios foram realizados em três repetições (**Figura 16**).

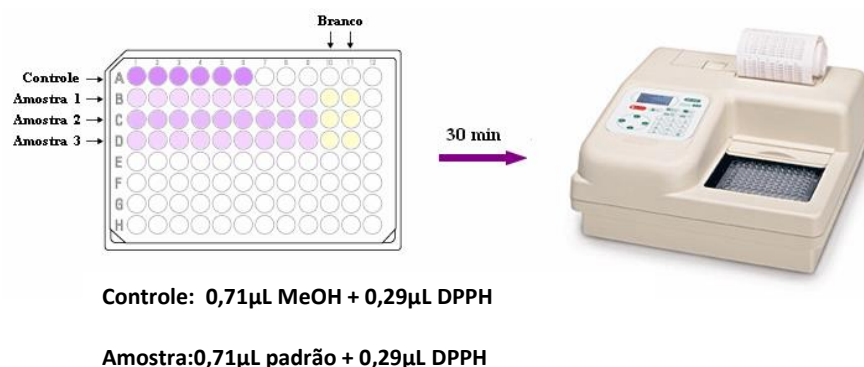


Figura 16- Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

O volume final de cada poço foi de 100 μ L. A curva para o cálculo do CE_{50} foi construída a partir da concentração dos extratos diluídos em cada poço, sendo possível considerar que []poço = 0,71.[]extrato. Os dados foram tratados no software Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida ao plotar a concentração das amostras (μ g.mL⁻¹) versus a porcentagem de atividade antioxidante (AA%).

4.8.2. Método de redução do íon férrico (FRAP)

O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidante Power*) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Salgueiro e Castro (2016), e consiste na redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), na presença de antioxidantes, gerando uma coloração azul intensa. O reagente FRAP é preparado a partir da mistura de uma solução 25 mL de tampão acetato a 0,3 M, regulado em pH 3,6, com 2,5 mL de uma solução do ligante TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,2,5-triazina à 10 mM, sendo o ligante solubilizado com uma solução de HCl a 40 mM. O reagente deve ser usado imediatamente após o preparo.

Uma alíquota de 0,5 mL de cada um dos extratos diluídos (1,0 mg.mL⁻¹) foi transferida para um tubo de ensaio, e em seguida misturada com 4,5 mL do reagente FRAP. A mistura reacional foi aquecida a 37 °C durante 10 min, onde foi observado uma intensificação da cor azul. A leitura foi feita após o tempo de incubação com comprimento de onda fixo em 593 nm, sendo água ultrapura utilizada como branco (SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

A curva de analítica foi construída a partir do padrão $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ em uma faixa de concentração de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ M. Alíquotas de 0,5 mL

de cada dessas soluções foram pipetadas e tratadas sob as mesmas condições do ensaio. A construção da curva foi realizada no software Origin 6.0 (**Figura 17**). Através da equação ($Y = 0,00107 + 0,0018X$, onde o coeficiente de correlação foi $r = 0,99961$) determinou-se indiretamente a capacidade antioxidante nos extratos, e todas as análises foram realizadas com três repetições. Os resultados são expressos resultados foram expressos em mmol Fe(II) por 100 mg de extrato.

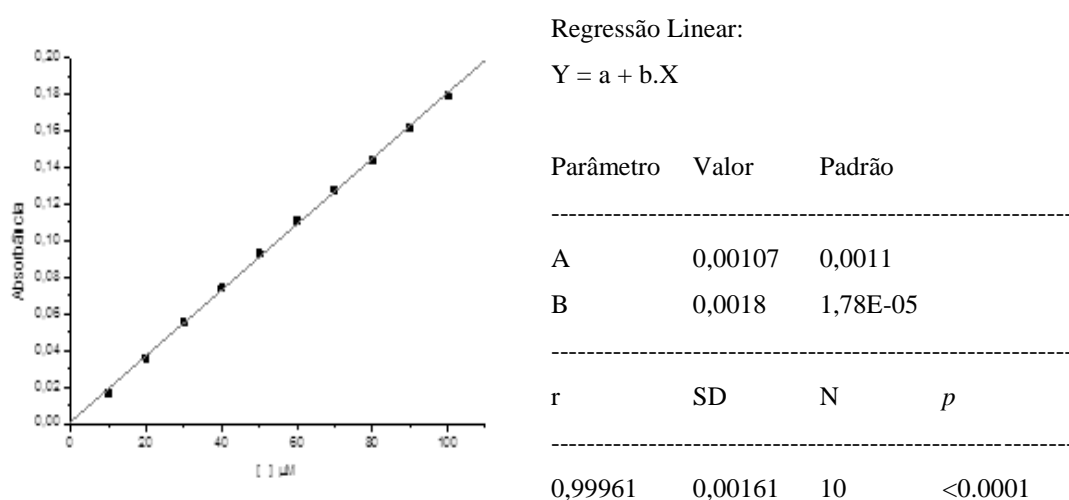


Figura 17-Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ versus as leituras de absorvâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.

4.8.3. Método de captura do radical-cátion ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)

A capacidade antioxidante avaliada pelo método de sequestro dos radicais $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi avaliada de acordo com a metodologia descrita na literatura por Salgueiro e Castro (2016). O radical-cátion foi preparado a partir da reação de 5 mL de uma solução estoque do reagente ABTS (7 mM) com 88 μL de uma solução de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi mantida sob abrigo de luz durante 16 h à temperatura ambiente. A solução utilizada nos ensaios foi preparada a partir da diluição de 1 mL do radical preparado em etanol absoluto até obter uma absorvância de 0,700 ($\pm 0,05$) com comprimento de onda fixo em 734 nm.

A uma alíquota de 50 μL de cada um dos extratos ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionado 5,0 mL do reagente $\text{ABTS}^{\cdot+}$ diluído. A mistura reacional ficou em repouso sob abrigo de luz durante 6 min, até a leitura ser feita com comprimento de onda em 734 nm (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). A curva analítica foi construída ($Y = -26,37778 + 0,65164X$, onde coeficiente de correlação foi $r = -0,9997$) nas mesmas condições reacionais do ensaio a partir

de alíquotas de 50µL de soluções padrão de Trolox, nas faixas de concentração de 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol/L (**Figura 18**). A curva analítica foi construída com auxílio do software Origin 6.0 (Figura 26), e todas as análises foram realizadas com três repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de Trolox por 100 mg de extrato (ETrolox.100 mg⁻¹ de extrato).

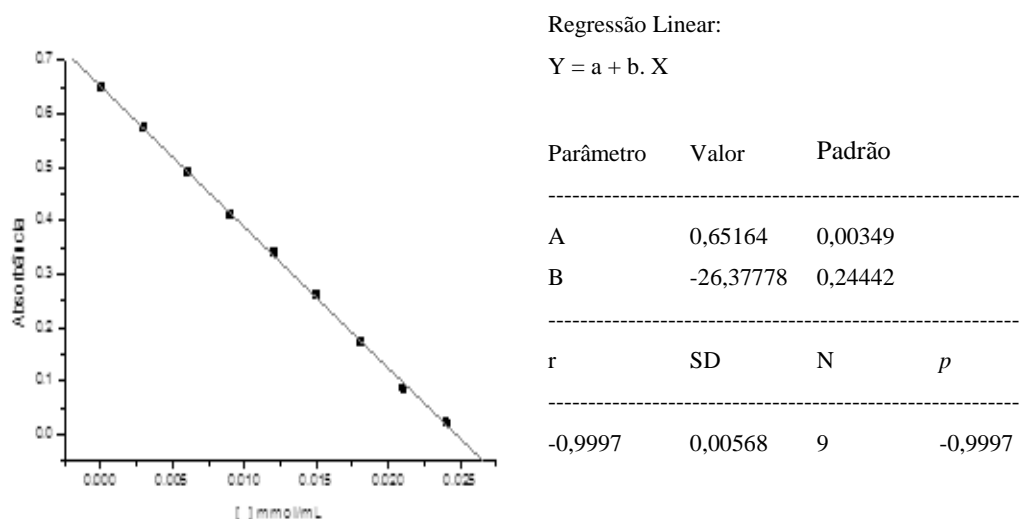


Figura 18 - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox *versus* as leituras de absorvâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.

4.9. Análise dos extratos de própolis por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico qualitativo e quantitativo dos extratos etanólicos e metanólicos foi realizado em cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu) constituído por duas bombas série LC-20AT, com detector de fotodiodos SPD-M20A e autoinjeter SIL-10A. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil, Thermo), mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi água ultrapura com 1% de ácido acético (solvente A) e metanol (100, solvente B), com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹, e o volume de amostra injetada foi de 20µL. O gradiente iniciou-se com 35% do solvente B por 2 min, 35 a 80% de B em 20 min., 80 a 92% B em 25 min; após 3 min retornando a 35% de B, onde foi mantido por 2 min. Os extratos de própolis foram solubilizados em metanol espectroscópico na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, e a solução foi filtrada através de um filtro (13 mm x 0,45 µm, PVDF, Millipore). A identificação das

substâncias foi baseada na comparação dos tempos de retenção e suas curvas no UV com os padrões autênticos e a quantificação foi realizada usando método de padronização externa. Cada padrão foi analisado individualmente e o monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280 e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonoides encontrados em própolis mostram suas absorções máximas no ultravioleta próximos a esses comprimentos de onda.

Na **Tabela 8** estão definidas as equações da reta, a linearidade (r) e a faixa de concentração de cada padrão. Todas as análises foram realizadas em três repetições. Os resultados quantitativos foram expressos em mg de substância por 100 mg de extrato

Tabela 8- Equações da reta, linearidade (r) e a faixa de concentração de cada padrão.

Padrões	Equação da reta ($Y=a+b.X$)	R	Faixa de concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido clorogênico	$Y = 82444,94377 + 24145,81562 * X$	0,99746	6,25 - 125
Ácido cafeico	$Y = 40945,9875 + 89031,694 * X$	0,99937	6,25 - 125
Ácido ferulico	$Y = 108615,96518 + 67576,73263 * X$	0,99997	6,25 - 125
Ácido <i>p</i> -cumárico	$Y = -111713,45833 + 168514,68688 * X$	0,99877	3,125 - 50
Ácido rosmarínico	$Y = 27314,71514 + 47569,33288 * X$	0,99868	6,25 - 75
Pinobankisina	$Y = 54650,2512 + 60652,83404 * X$	0,99964	6,25 - 75
Canferol	$Y = 135435,8913 + 53824,0633 * X$	0,99810	6,25 - 50
Canferide	$Y = 99954,13822 + 23488,91442 * X$	0,99853	6,25 - 75

4.10. Atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*

O ensaio da atividade antimicrobiana foi realizado pela técnica Edlene Ribeiro Prudêncio no laboratório de Microbiologia de Alimentos e de Processos Fermentativos da professora Rosa Helena Luchesi (Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ).

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis contra *S. aureus* foi determinada de acordo com o método de difusão em ágar descrito por Kirby e Bauer (1966), com modificações.

A cepa de *S. aureus* (12692) foi mantida congelada a -20 °C em caldo BHI adicionado de 15% (v/v) de glicerol estéril. No momento da utilização a ativação da cultura foi realizada por duas transferências sucessivas em caldo BHI seguida de inoculação por alçada em ágar PCA. Após incubação das placas a 36°C por 24h, foi preparada uma suspensão de células em 3mL de solução salina peptonada de forma a conter aproximadamente 2×10^8 ufc/mL, cuja turbidez equivale ao tubo n°5 da escala de Mc Farland. Esta suspensão foi diluída 100 vezes e 0,1 mL

foi inoculada de maneira confluyente em 3 direções, em placas de ágar Mueller Hinton com auxílio de uma alça Drigalsky.

Com auxílio de furador estéril, poços com diâmetro de 0,75 cm foram perfurados e, em cada poço foram inoculados 50 µL de cada extrato de própolis a 10µgmL⁻¹. Discos contendo ampicilina 10µgmL⁻¹ foram utilizados para comparação e o solvente etanol 95% como controle. As placas foram incubadas a 36°C por 20-24 h, quando então os diâmetros das zonas claras de inibição de crescimento ao redor de cada poço foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

O halo de inibição induzido pelos extratos testados foi comparado com o controle positivo do antibiótico ampicilina. Todos os experimentos foram realizados em três repetições. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\text{Média do halo de inibição da amostra} - \text{halo do solvente}) \times 100}{\text{Média do halo de inibição do antibiótico}}$$

4.11. Preparo dos hidrogéis

O preparo das amostras de Na-CMC se procedeu pelo método de Casting, método de deposição de solução polimérica Taylor e Schultz (1996). Os Hidrogéis foram produzidos a partir de três componentes, carboximetilcelulose sódica, ácido cítrico e água deionizada. O preparo das amostras consistiu em diluir 3g de Na-CMC em 100 mL de água deionizada sob agitação mecânica (Marca Fisatom, modelo 710) por 90 min à temperatura ambiente. A solução pronta foi dividida em porções de 25 mL e, sob agitação magnética (Marca Fisatom, modelo 752), diluiu-se 0,8g de ácido cítrico anidro para reticulação física via formação de ligações éster entre o polímero e o reticulante (KAMEL *et al*, 2008 e Ghorpadea, Yadav e Dias, 2017). As amostras foram secas em estufa (Marca Nova instruments, modelo NI1512) por 24 h a 50 °C, formando assim filmes de NaCMC. Os filmes de NaCMC obtidos foram imersos em água deionizada para que o excesso de reticulante fosse removido (cada hidrogel foi submerso em 10 mL de água deionizada por 24 h em estufa a 50 °C).

Após este período os filmes de NaCMC foram submetidos ao processo de intumescimento em extratos de própolis verde 20% (m/v). O período de intumescimento dos hidrogéis com o extrato de própolis verde perdurou durante 24 h. A preparação e caracterização dos hidrogéis foi realizada conforme o fluxograma na **Figura 19**.

O extrato de própolis utilizado no processo de intumescimento dos filmes de NaCMC foi o extrato de própolis verde anteriormente obtida pelo grupo proveniente do Município de Mesquita, Estado do Rio de Janeiro, obtidas pelo método de raspagem no período de Janeiro/Julho de 2012. Esse extrato foi utilizado de modo a otimizar a produção dos filmes assim como sua caracterização, pois este já tinha sido estudado e caracterizado quanto a seu perfil químico qualitativamente e quantitativamente.

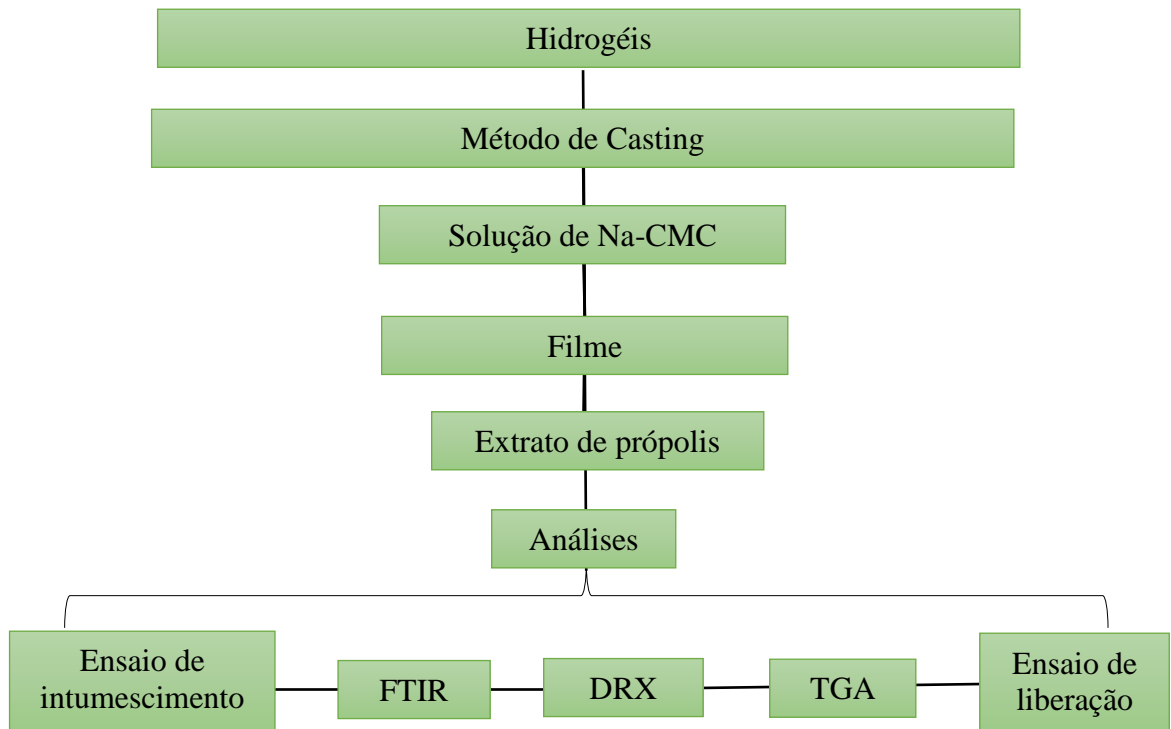


Figura 19 – Etapas de obtenção e caracterização dos hidrogéis: FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier; DRX- Difração de Raio X; TGA- Análise térmica (Adaptado: Soares, 2019)

4.12. Caracterização dos hidrogéis

4.12.1. Ensaio de intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado em triplicata como meio de aferir a reprodutibilidade dos resultados de Kokabi, Sirousazar; Hassan (2007). Os hidrogéis foram submersos em 25 mL de soro fisiológico e a variação de massa das amostras foi avaliada por

pesagens em intervalos de tempo predeterminados (1h, 2h, 3h, 4h, 24h, 72h, 96h de imersão). O grau de intumescimento é associado ao mecanismo de liberação e foi calculado através da equação 1. As amostras foram removidas da solução fisiológica nos intervalos pré-estabelecidos, seguido pela retirada do excesso do soro presente no filme com papel toalha e realizou-se a pesagem da amostra para verificação da variação da massa.

$$GI (\%) = \frac{[M_n - M_o]}{M_o} * 100$$

Equação (1)

Onde: GI: grau de intumescimento;

M_n: massa da amostra em cada intervalo;

M_o: massa inicial seca.

As amostras foram secas após intumescimento (estufa a 50°C) para obtenção da massa final (M_f) dos filmes. A perda de massa (PM) das amostras no decorrer do ensaio de intumescimento foi avaliada através da equação 2. A fração gel (FG), medida indireta do grau de reticulação, foi obtida pela equação 3.

$$PM (\%) = \frac{[M_o - M_f]}{M_o} * 100$$

Equação (2)

$$FG (\%) = \frac{M_f}{M_o} * 100$$

Equação (3)

4.12.2. Análise microestrutural por FTIR

A avaliação qualitativa das amostras foi realizada através de análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar se houve interação entre as cadeias de Na-CMC, ácido cítrico anidro e com extrato de própolis (PAIVA *et al.*, 2010). Analisou-se também o extrato de própolis. A análise foi realizada em equipamento Bruker (Vertex 70) da Central Analítica Multiusuário do PPGQ-, na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ de resolução.

4.12.3. Análise por Difração de Raio X (DRX)

A análise microestrutural das amostras foi realizada por difração de raios X (DRX) utilizando o difratômetro Brucker-AXS D8 Advance Eco (CETEM -UFRJ), com radiação $\text{CuK}\alpha$ a 40 kV e 25 mA. O ângulo de difração foi definido entre 4° e 70° com um comprimento de passo de $0,02^\circ$ e tempo de passo de 2 segundos.

4.12.4. Análise térmica

A análise térmica permite obter informações relativas a desidratação, vaporização e degradação dos filmes de hidrogéis. Para tal, utilizou-se o equipamento TGA Q500 (TA Instruments Co.) do IT-UFRRJ. Foram realizadas as análises das amostras dos filmes de hidrogéis impregnados de extratos de própolis verde, bem como da Na-CMC *in natura* e do ácido cítrico anídrico. As amostras foram carregadas em cadinho de platina aberto, sendo o cadinho vazio utilizado como referência. As análises foram realizadas de acordo com as condições de Capanema *et al.* (2018) sob fluxo contínuo de N_2 seco ($30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, entre 25°C e 400°C .

4.12.5. Estudo de cinética de liberação dos filmes de hidrogéis impregnados de extrato de própolis

O estudo de liberação *in vitro* das substâncias fenólicas presentes no extrato de própolis verde impregnado nos filmes de carboximetilcelulose sódica foi realizado segundo a metodologia de *shake flask* (ANVISA, 2010). Os filmes de carboximetilcelulose impregnados com o extrato de própolis verde foram colocados em erlenmeyer de 250 mL com 100mL de tampão fosfato pH 6 com 1% de Luaril Sulfato de Sódio (LSS). Os erlenmeyers foram colocados em plataforma de agitação, sob agitação constante de 50 rpm por um período de 96 h a temperatura de 32°C . As alíquotas das amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 24; 48; 72; 96h para análise do perfil cinético de liberação por CLAE-DAD. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana $0,45 \mu\text{m}$ e analisados por CLAE utilizando as mesmas condições cromatográficas do **item 4.9**.

A determinação da cinética de liberação foi realizada através de análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos (CID, 2009):

- Ordem zero: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (min);
- Higuchi: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus raiz do tempo (min);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (min).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de r foi o escolhido. O valor de fluxo de liberação (J) corresponde a inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação. O fluxo foi calculado em triplicata ($n=3$) e o valor foi expresso pela média \pm desvio padrão (CID, 2009).

4.13. Análise Estatística

Os resultados obtidos para as análises realizadas (teor de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante) foram utilizados como variáveis estatísticas em uma matriz de correlação de Pearson através do *software* BioEstat 5.0 (Amazônia, Brasil). A Análise das Componentes Principais (ACP) foi utilizada como ferramenta de análise multivariada de dados, empregando-se o *software* The Unscrambler X 10.3 (Oslo, Noruega) e Origin 2018b (Massachusetts, EUA). Para esta análise, as variáveis foram autoescaladas e centradas na média, e o parâmetro estatístico utilizado na realização da PCA foi a validação cruzada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos extratos de própolis

Existem várias metodologias descritas na literatura para a preparação de extratos de própolis. Um dos métodos considerado o mais adequado para a análise química e biológica de própolis é a preparação de extratos etanólicos. Alguns trabalhos tem demonstrado que os extratos etanólicos são os que apresentam maior eficiência na extração de substâncias fenólicas (SAWAYA *et al*, 2011; PAPOTTI *et al*, 2010).

Buscando avaliar o método mais eficaz quanto à extração de substâncias da própolis neste trabalho dez amostras de própolis castanha escura de *Apis mellifera*, do município de Japira-Paraná, foram submetidas a quatro diferentes metodologias de extração: maceração dinâmica a temperatura ambiente por 48h; maceração dinâmica a 50°C por 48 h; extração em banho de

ultrasson à temperatura ambiente por 2h e extração em ultrasson com sonda de imersão à temperatura ambiente por 30 min. Os solventes utilizados foram o metanol e o etanol, uma vez que segundo a literatura estes solventes possibilitam a extração de substâncias mais polares e de polaridades intermediárias (SAWAYA, *et al*, 2011; PAPOTTI *et al*, 2010).

A variação de temperatura também foi avaliada neste estudo, foram realizados ensaios à temperatura ambiente e a 50°C. Alguns autores acreditam que a temperatura empregada no processo extrativo não deve exceder 70°C podendo acarretar degradação, polimerização e oxidação de substâncias fenólicas, fatores que resultam na redução dos fenóis totais (SAWAYA *et al*, 2011).

Na **Tabela 9** estão descritos os rendimentos dos diferentes extratos, partindo todos de 2g de própolis pulverizada em 50mL de etanol (EEP) ou metanol (EMP).

Tabela 9 – Rendimentos (%) dos extratos etanólicos e metanólicos de própolis marrom.

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	43,25±0,010	48,20±0,480	49,27±0,008	38,68±0,980	48,80±0,570	45,78±0,566	55,90±0,212	20,00±0,000
P2	44,78±0,0802	62,30±0,752	40,29±0,004	47,18±0,001	58,72±0,813	47,06±0,003	40,12±0,197	48,26±0,001
P3	38,09±0,241	34,90±0,903	51,03±0,735	38,92±0,326	45,65±0,199	49,52±0,092	56,11±0,378	49,63±0,001
P4	39,70±0,075	60,80±0,003	27,39±0,229	39,76±0,71	52,32±0,218	46,03±0,579	63,21±0,309	57,25±0,971
P5	48,35±0,556	57,80±0,720	43,94±0,977	61,21±0,019	49,80±0,001	31,58±0,883	59,45±0,700	50,45±0,056
P6	48,10±0,007	27,40±0,901	49,95±0,056	44,41±0,083	60,00±0,000	34,28±0,001	39,30±0,523	41,95±0,001
P7	49,92±0,094	40,70±0,214	35,59±0,017	60,25±0,047	49,10±0,960	40,00±0,111	45,25±0,749	48,76±0,006
P8	39,26±0,500	30,40±0,002	39,09±0,069	44,85±0,009	52,40±0,200	38,44±0,450	55,00±0,000	24,25±0,109
9	24,37±0,001	20,10±0,311	25,23±0,003	22,02±0,001	35,41±0,001	22,80±0,700	24,37±0,02	20,24±0,810
P10	38,70±0,126	40,80±0,781	27,66±0,673	54,79±0,270	45,31±0,416	39,13±0,009	56,27±0,718	47,25±0,612
Média	41,45±7,426	42,34±14,66	38,94±9,78	45,21±11,68	49,75±7,013	39,46±8,233	49,50±11,97	40,81±13,88

Pode-se observar pela Tabela 10 que os rendimentos dos extratos variaram de acordo com o solvente e o método empregado.

Tabela 10 - Médias dos rendimentos de acordo com o solvente e método de extração (%)

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	41.45 ± 7.43	42.34 ± 14.66	38.94 ± 9.78	45.21 ± 11.68
EMP	49.75 ± 7.01	39.46 ± 8.23	49.5 ± 11.97	40.80 ± 13.88

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os rendimentos de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA (**Tabela 11**).

Tabela 11- ANOVA realizado com os rendimentos dos extratos.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
<i>Amostra</i>	167.389	1	167.389	1.40	0.240209	3.97
<i>Colunas</i>	238.3423	3	79.44743	0.67	0.575881	2.73
<i>Interações</i>	872.2591	3	290.753	2.44	0.071637	2.73
<i>Dentro</i>	8593.57	72	119.3551			
<i>Total</i>	9871.56	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 11, não houve diferença significativa entre as médias das capacidades antioxidantes por FRAP tanto de acordo com o tipo de solvente ($F: 1,40 < F_{\text{crítico}}: 3,97, p > 0,05$) como de acordo com o método de extração ($F: 0,67 < F_{\text{crítico}}: 2,73, p > 0,05$), portanto, não foi constatada variação significativa das médias de acordo com o solvente e o método empregado. Também pode ser observado pela Figura 20 que houve pouca variação entre os rendimentos dos extratos.

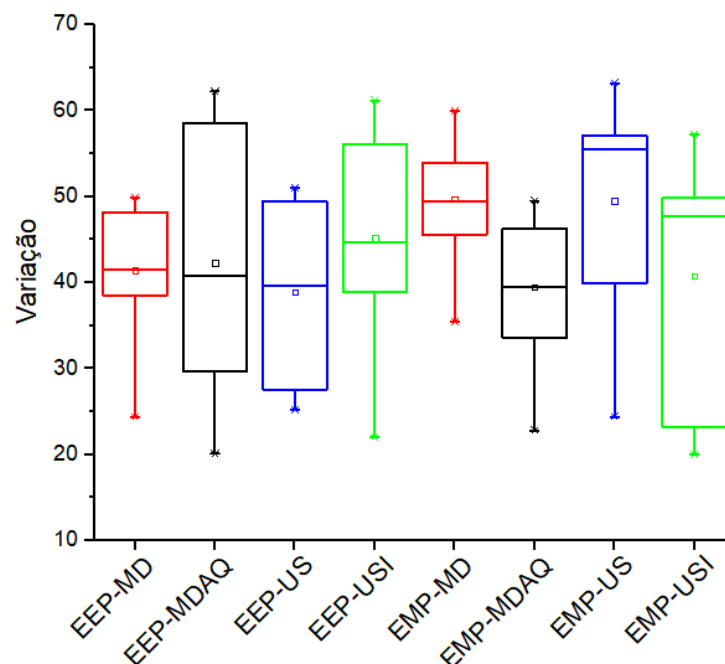


Figura 20- Diagrama de caixa (*box plot*) comparando as médias dos rendimentos utilizando metanol e diferentes métodos de extração.

Utilizando a técnica de ultrassom, foi possível obter médias de extração semelhantes utilizando menor tempo de extração (2h para ultrassom e 30 minutos para ultrassom com sonda de imersão).

O método de extração via ultrassom melhora a eficiência da extração, possibilitando otimização do tempo de extração. O favorecimento da extração por essa técnica está relacionado com a cavitação gerada pelo ultrassom e pela agitação mecânica causada pela onda ao se propagar, promovendo maior geração de turbulência no meio e auxiliando no aumento da transferência de massa (LUZ, 1998 e SILVA 2016).

Ao ser utilizada a extração por ultrassom com sonda de imersão, pode ser observada capacidade extrativa semelhante ao ultrassom convencional (banho de ultrassom), utilizando menor tempo de extração. Na extração por ultrassom convencional o recipiente com a solução é inserido em uma cuba com água onde são geradas as ondas de ultrassom, que são transmitidas à amostra a ser extraída. Neste método, porém, as ondas de ultrassom são atenuadas pela água presente na cuba e pelo vidro do frasco contendo a amostra a ser extraída. Na extração por ultrassom com sonda de imersão, o sonotrodo é inserido diretamente na solução, possibilitando um melhor deslocamento das ondas de ultrassom no meio e consequentemente maior eficácia na extração, proporcionando maior rapidez no processo extrativo (CHEMAT 2017).

5.2. Teores de ceras e bálsamos

A quantificação de ceras na amostra de própolis é um parâmetro importante, pois a própolis é uma mistura complexa, contendo resinas, bálsamos e cera, além de outros componentes como os ácidos fenólicos (comumente mencionados como seus princípios ativos), e essas substâncias fenólicas por serem polares não estão presentes na cera. Na **Tabela 12** estão os teores de ceras totais e bálsamos avaliados para as dez amostras de própolis marrom.

Tabela 12- Teores de ceras totais e bálsamos avaliados para as dez amostras de própolis marrom.

Amostras	Bálsamo mg g ⁻¹ de própolis	Amostras	Ceras %
EEP1	0,506	P1	5,81
EEP2	0,499	P2	3,69
EEP3	0,446	P3	6,9
EEP4	0,479	P4	1,69
EEP5	0,459	P5	3,46
EEP6	0,562	P6	11,65
EEP7	0,492	P7	7,65
EEP8	0,462	P8	42,2
EEP9	0,307	P9	42,7
EEP10	0,489	P10	10,49
Média ± D.P.	0,47 ± 0,07	Média ± D.P.	13,62 ± 15,50

O teor de cera é um dos parâmetros exigidos na legislação brasileira que investiga a qualidade da própolis bruta a ser comercializada. Segundo o Regulamento Técnico, o nível máximo permitido em amostras de própolis é de 25 % (m/m) (BRASIL, 2001).

Os resultados obtidos para o teor de cera mostraram que das dez amostras de própolis bruta, oito estão de acordo o limite exigido pela legislação, por apresentarem valores entre 1,69 % e 11,65 %, e apenas duas amostras, a P8 e P9 estão acima do limite permitido, com valores de 42,2 % e 42,7%, respectivamente. O acréscimo de cera na produção de própolis comercial é considerado uma adulteração do produto (BRASIL, 2001).

A determinação de cera como parâmetro analítico no controle de qualidade da própolis tem sua importância devido ao fato de que as substâncias que compõem as ceras não são consideradas biologicamente ativas, sendo, portanto, sua presença nos extratos e tinturas indesejáveis. Além disso, quantidades significativas de cera conduzem à turvação nos extratos de própolis, inclusive naqueles armazenados em temperatura baixas. (SALGUEIRO, 2016)

A quantidade de bálsamos também é uma característica importante na própolis. Kujumgiev *et al* (1999) afirmaram que quanto maior a porcentagem de bálsamo na amostra, mais altos serão os teores de componentes biologicamente ativos e conseqüentemente, mais baixas os percentuais de cera e matéria insolúvel.

Assim, é desejável um menor teor de cera na amostra (o que pode sinalizar um elevado teor de resinas). Já os teores de bálsamos (comumente chamado “resíduo seco”) estão

relacionados à solubilidade da amostra em um determinado solvente (FUNARI & FERRO, 2006)

5.3. Determinação dos espectros de absorção dos extratos de própolis

Os extratos foram analisados quanto ao seu espectro de absorção por espectrofotometria na região ultravioleta, que é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar qualidade da própolis. De acordo com a legislação brasileira, os extratos de própolis comercializados devem apresentar em seu espectro de absorção (UV-vis) bandas características das principais classes de flavonoides, entre 200 e 500 nanômetros (BRASIL, 2001). Uma típica absorção para flavonoides pode ser observada em duas ban distintas do espectro, com máximos entre 300 e 550 nm, e entre 240 e 285 nm (PAGANOTTI *et al*, 2014). Os espectros de absorção obtidos estão apresentados nas **Figuras 21 e 22**.

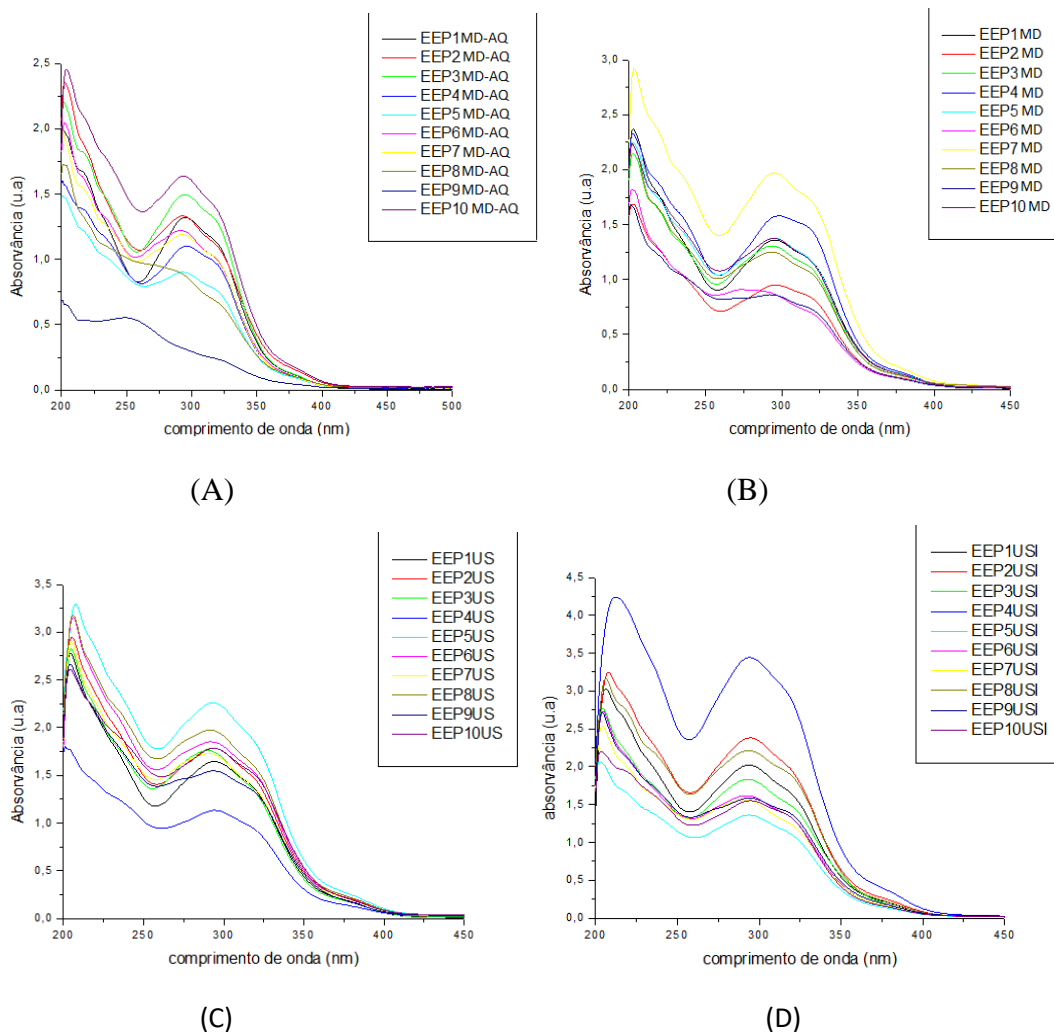


Figura 21 - Espectros de absorção dos extratos etanólicos de própolis: EEP-MD (A), EEP-MDAQ (B), EEP-US (C) e EEP-USI (D) na faixa de 200-500 nm.

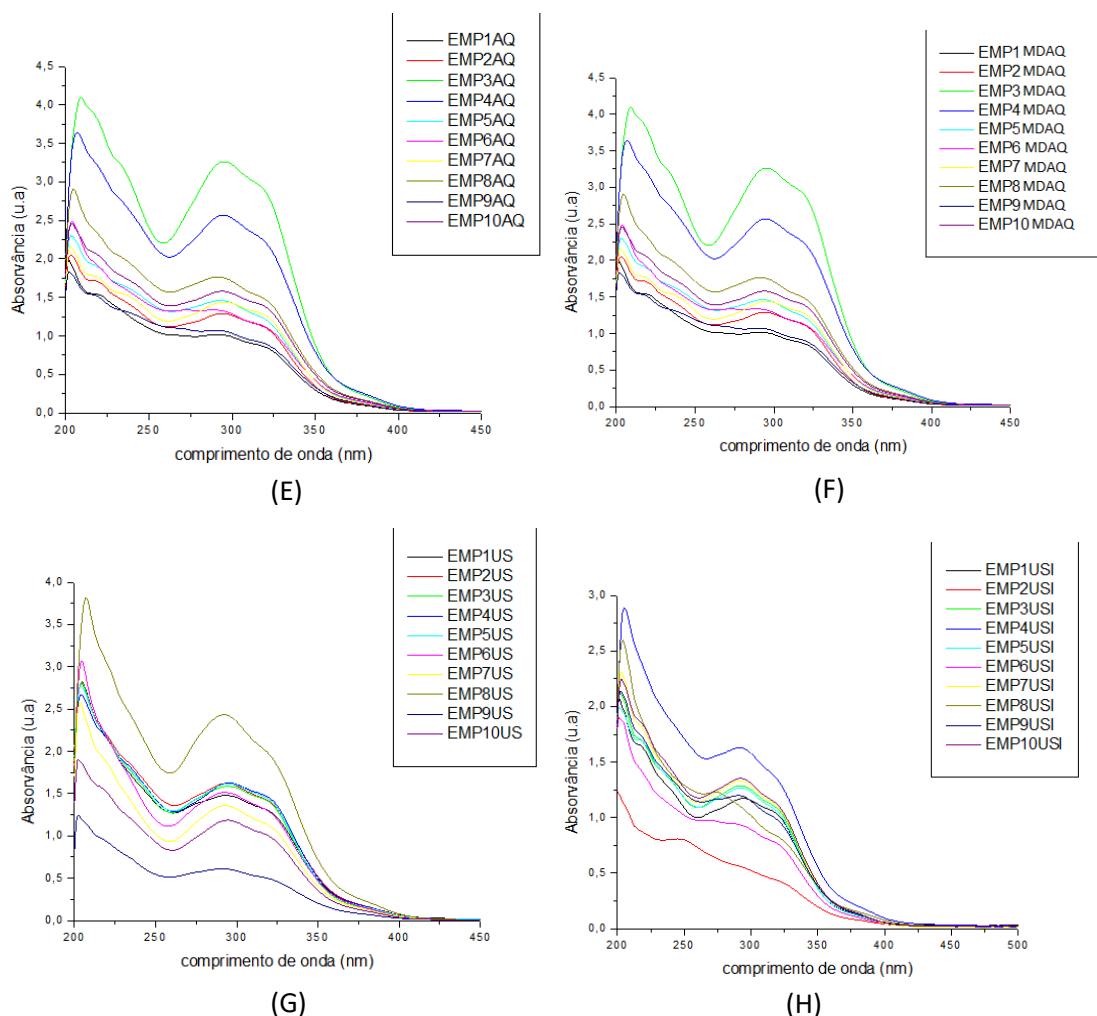


Figura 22 – Espectros de absorção dos extratos metanólicos de própolis: EMP-MD (E), EMP-MDAQ (F), EMP-US (G) e EMP-USI (H) na faixa entre 200-500nm.

Como pode ser observado a maioria das amostras exibiu um perfil semelhante, com máxima absorção a 290 nm, porém uma diferença na intensidade dos espectros das amostras feitas em etanol e metanol. A intensidade de absorção a 290 nm variou, dependendo do método e das condições utilizado para extração. Os extratos metanólicos de própolis por aquecimento apresentaram a maior absorção no UV. A literatura relata a absorção entre os comprimentos de onda de 290 e 330 nm, região onde derivados de ácidos cinâmicos e flavonoides, tais como ácidos cafeoilquínicos, canferide, canferol, pinobanksina são frequentemente identificados, e muitas das suas atividades farmacológicas têm sido relacionadas a estes compostos fenólicos (CARDOZO, 2015; SALGUEIRO, 2016).

Olegário *et al* (2019) realizou uma análise detalhada dos constituintes químicos da própolis marrom, provenientes de quatro diferentes estados (Bahia, Minas Gerais, Paraná e Sergipe) do Brasil. Quanto a análise dos espectros de absorção na região de UV-Vis dos

extratos de própolis marrom é similar aos espectros típicos de polifenóis com faixa centrada em torno de 280 a 330 nm. E observou também que os extratos de própolis marrom do Paraná se assemelham ao espectro de própolis do estado de Minas Gerais. Características semelhantes foram encontradas nos perfis de espectros de própolis marrom da Bahia e Sergipe.

5.4. Teor de fenólicos e flavonoides

O conteúdo em fenólicos e flavonoides totais foram realizados para dez extratos etanólicos e metanólicos de própolis (**P1** a **P10**) obtidos por diferentes métodos de extração (maceração dinâmica -**MD**, maceração dinâmica e aquecimento-**MDAQ**, ultrassom- **US** e ultrassom imersão- **USI**) a fim de buscar uma comparação entre estes diferentes métodos de extração. As médias e os desvios padrão para os teores em flavonoides totais (mg de equivalentes em quercetina por 100mg de extrato) dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos de própolis (EMP) estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Média do teor em flavonoides (mg de equivalentes em quercetina por 100mg de extrato) totais dos diferentes extratos etanólicos e metanólicos de própolis.

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	4,07±0,001	3,61±0,002	5,81±0,001	4,11±0,002	4,99±0,001	6,40±0,001	5,31±0,004	4,34±0,001
P2	4,40±0,000	4,30±0,001	7,03±0,001	6,27±0,000	9,18±0,001	8,99±0,001	5,58±0,001	5,03±0,001
P3	6,36±0,002	3,14±0,001	8,92±0,001	3,63±0,004	12,9±0,003	10,27±0,003	4,47±0,001	4,30±0,002
P4	6,53±0,001	3,77±0,002	9,24±0,000	4,76±0,008	8,34±0,002	8,40±0,000	3,00±0,002	5,50±0,001
P5	6,89±0,002	4,87±0,001	7,39±0,001	5,85±0,000	9,6±0,001	9,98±0,001	4,99±0,001	4,66±0,001
P6	4,64±0,004	2,45±0,001	3,35±0,001	3,25±0,001	5,41±0,001	8,48±0,001	4,74±0,001	4,19±0,001
P7	5,33±0,001	6,78±0,002	3,02±0,001	2,95±0,001	9,47±0,001	7,77±0,008	4,93±0,001	4,82±0,001
P8	4,72±0,001	2,53±0,003	5,92±0,001	3,6±0,000	10,18±0,008	9,55±0,001	5,56±0,001	7,98±0,004
P9	3,50±0,001	2,39±0,001	3,48±0,003	3,48±0,000	9,2±0,004	7,12±0,001	3,96±0,001	6,02±0,001
P10	4,59±0,000	3,79±0,001	4,40±0,001	4,57±0,001	3,77±0,001	13,67±0,086	5,58±0,001	4,26±0,001
Média/D.P.	5,10 ± 1,14	3,76 ± 1,34	5,86 ± 2,28	4,25 ± 1,11	8,3 ± 2,77	9,06 ± 2,03	4,81 ± 0,83	5,11 ± 1,17

O teor de flavonoides totais variou em média de 5,10 mgEq/100mg para os EEP obtidos por agitação magnética, 3,76 mgEq/100mg para os EEP obtidos por agitação magnética e aquecimento, 5,05 mgEq/100mg para os EEP obtidos por ultrassom e 4,24 mgEq/100mg para os EEP por ultrassom imersão. Já para os EMP o teor de flavonoides variou

em média 8,03 mgE_Q/100mg para os EMP obtidos por agitação magnética, 9,06 mgE_Q/100mg para os EMP obtidos por agitação magnética e aquecimento, 4,80 mgE_Q/100mg para os EMP obtidos por ultrassom e 5,11 mgE_Q/100mg para os EMP por ultrassom imersão.

Pode-se observar pela Tabela 14 que as médias de teores de flavonoides foram em geral superiores utilizando metanol como solvente de extração.

Tabela 14 – Médias do teor de flavonoides de acordo com o solvente e método de extração.

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	5,1 ± 1,14	3,76 ± 1,34	5,86 ± 2,28	4,25 ± 1,11
EMP	8,3 ± 2,77	9,06 ± 2,03	4,81 ± 0,83	5,11 ± 1,17

De modo a verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os teores de flavonóides de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA e, rejeitada a hipótese de igualdade, foi realizado o teste *Tukey* para identificar a origem de variação.

Tabela 15- ANOVA realizado com os teores de flavonoides totais.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	86,528	1	86,528	29,63	6,89E-07	3,97
Colunas	53,314785	3	17,7716	6,08	0,000948	2,73
Interações	114,32753	3	38,10918	13,05	6,78E-07	2,73
Dentro	210,29508	72	2,920765			
Total	464,465395	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 15, houve diferença significativa entre as médias dos teores de flavonoides totais tanto de acordo com o tipo de solvente ($F: 29,63 > F_{\text{crítico}}: 3,97, p < 0,05$) como de acordo com o método de extração ($F: 6,08 > F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$), sendo a diferença entre as médias de acordo com o tipo de solvente mais significativa do que de acordo com o método de extração.

No teste *Tukey* foram verificadas diferenças significativas (IC 95%) entre as médias dos teores de flavonoides obtidos por ultrassom (US) e ultrassom com sonda de imersão (USI)

e por maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) e ultrassom (US), no caso da extração com etanol (Figura 23). Com relação a extração com metanol, apenas não houve diferença significativa entre as médias dos teores de flavonoides obtidos por ultrassom (US) e ultrassom com sonda de imersão (USI) e por maceração dinâmica (MD) e maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ), conforme mostrado na Figura 24.

Dessa forma, os métodos que se mostraram mais adequados para a extração de flavonoides das amostras de própolis marrom estudadas nesse trabalho foram a maceração dinâmica à temperatura ambiente (MD) e a maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ), utilizando metanol como solvente. Dentre essas duas opções de extração, considera-se a maceração dinâmica mais prática já que a análise estatística demonstrou que não há necessidade da utilização de aquecimento.

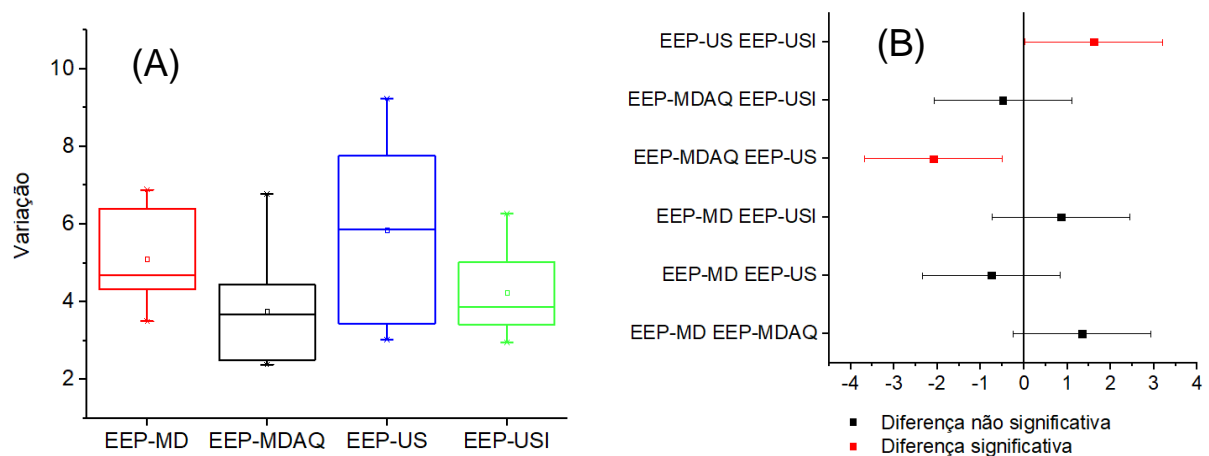


Figura 23- (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação do teor de flavonoides totais utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

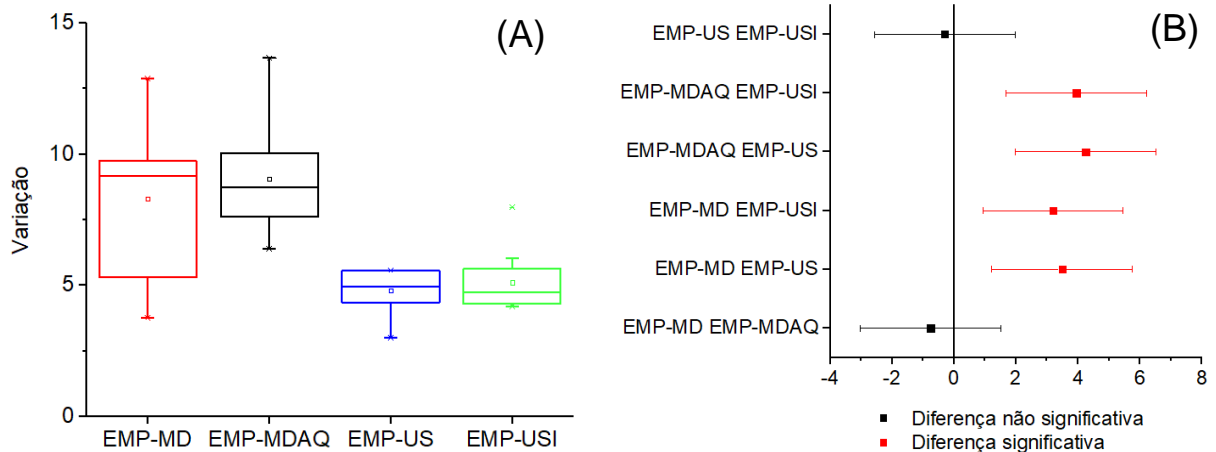


Figura 24- (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação do teor de flavonoides totais utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

Para os teores em fenólicos totais (mg de equivalentes em ácido gálico por 100mg de extrato) as médias e os desvios padrão para dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) de própolis estão apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Média do teor em fenólicos totais (mg de equivalentes em ácido gálico por 100mg de extrato ou %) dos diferentes extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) .

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	5,15±0,016	10,45±0,015	3,73±0,409	4,9±0,001	9,35±0,001	10,66±0,000	14,08±0,001	6,14±0,001
P2	4,71±0,014	11,74±0,008	4,48±0,491	6,61±0,024	16,65±0,002	8,27±0,001	9,70±0,001	5,90±0,001
P3	3,89±0,011	9,14±0,002	2,93±0,322	3,84±0,008	7,52±0,003	7,87±0,002	5,97±0,000	5,93±0,001
P4	6,47±0,007	9,93±0,001	6,47±0,711	5,51±0,032	0,52±0,001	8,55±0,000	10,68±0,001	8,46±0,001
P5	5,83±0,008	11,10±0,012	7,97±0,875	7,1±0,007	10,75±0,001	12,23±0,002	6,89±0,001	5,83±0,001
P6	2,06±0,012	9,11±0,013	2,27±0,250	2,25±0,001	12,70±0,002	12,74±0,000	9,53±0,002	5,25±0,001
P7	3,16±0,020	16,35±0,006	10,07±0,038	2,58±0,004	0,03±0,001	12,46±0,000	9,04±0,001	5,58±0,001
P8	3,52±0,002	6,86±0,002	8,57±0,942	1,67±0,010	3,28±0,001	15,34±0,000	13,72±0,001	13,17±0,003
P9	0,89±0,009	5,60±0,003	0,56±0,062	3,07±0,018	17,26±0,002	12,46±0,002	1,03±0,000	8,97±0,001
P10	9,88±0,003	10,54±0,003	10,08±0,026	10,05±0,009	3,42±0,002	15,76±0,001	7,24±0,000	6,12±0,001
Média/D.P.	4,56 ± 2,52	10,08 ± 2,9	5,71 ± 3,39	4,76 ± 2,62	8,15 ± 6,28	11,63 ± 2,78	8,79 ± 3,82	7,14 ± 2,45

Pode-se observar pela Tabela 17 que as médias de teores de fenólicos totais foram superiores utilizando metanol como solvente de extração.

Tabela 17 - Médias do teor de fenólicos totais de acordo com o solvente e método de extração.

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	4,56 ± 2,52	10,08 ± 2,9	5,71 ± 3,39	4,76 ± 2,62
EMP	8,15 ± 6,28	11,63 ± 2,78	8,79 ± 3,82	7,14 ± 2,45

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os teores de fenólicos totais de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA e, rejeitada a hipótese de igualdade, foi realizado o teste *Tukey* para identificar a origem de variação.

Tabela 18- ANOVA realizado com os teores de fenólicos totais.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	140,34402	1	140,34402	11,13	0,001349	3,97
Colunas	300,56537	3	100,18846	L,94	0,00012	2,73
Interações	11,74059	3	3,91353	0,31	0,817914	2,73
Dentro	908,26818	72	12,614836			
Total	1360,9182	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 18, houve diferença significativa entre as médias dos teores de fenólicos totais tanto de acordo com o tipo de solvente ($F: 11,13 > F_{\text{crítico}}: 3,97, p < 0,05$) como de acordo com o método de extração ($F: 7,94 > F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$), sendo a diferença entre as médias de acordo com o tipo de solvente mais significativa do que de acordo com o método de extração, assim como foi observado para o teor de flavonoides totais.

No teste *Tukey* foram verificadas diferenças significativas (IC 95%) entre as médias dos teores de fenólicos totais obtidos por maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) e ultrassom com sonda de imersão (USI), por maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) e ultrassom (US) e por maceração dinâmica à temperatura ambiente (MD) e maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) no caso da extração com etanol (Figura 25). Com relação a extração com metanol, não houve diferença significativa entre os métodos de extração Figura 26.

Dessa forma, o solvente que se mostrou mais adequado para a extração de fenólicos totais das amostras de própolis marrom estudadas nesse trabalho foi o metanol, sendo estatisticamente indiferente o método de extração utilizado.

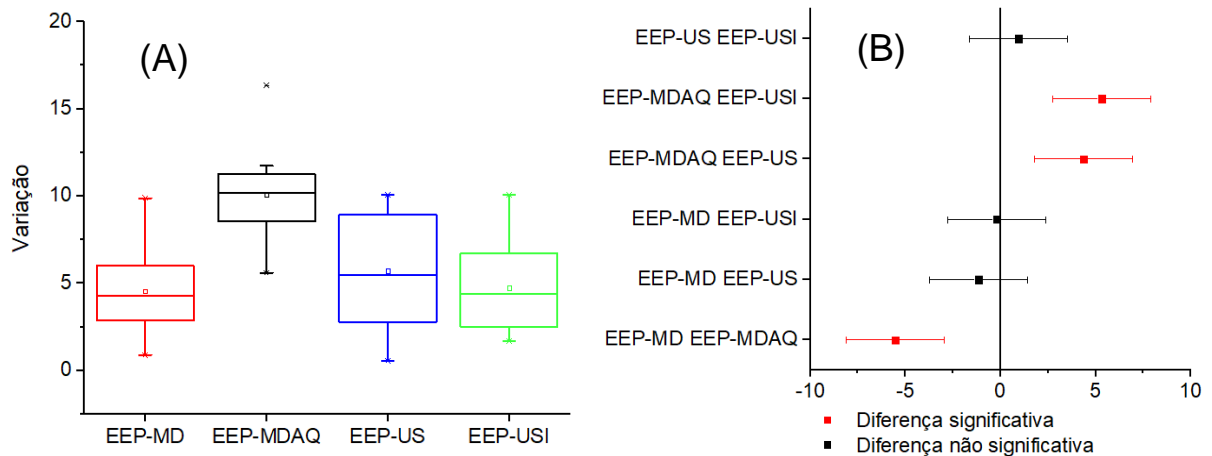


Figura 25 - (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação do teor de fenólicos totais utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

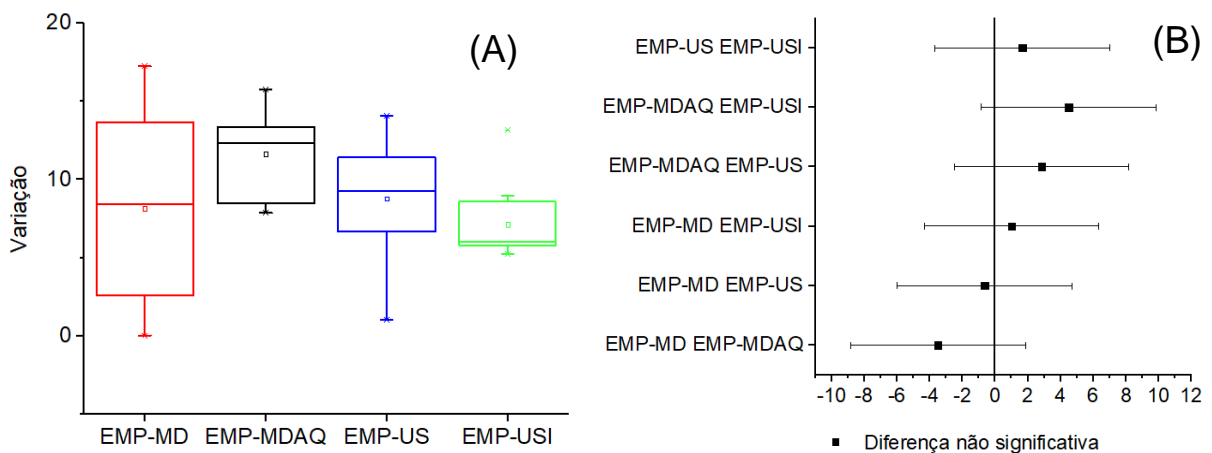


Figura 26 - (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação do teor de fenólicos totais utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

Diversos estudos anteriores já compararam diferentes métodos de extração e solventes em amostras de própolis. Trusheva *et al* (2007) realizaram um estudo da extração de compostos biologicamente ativos da própolis por diversos métodos. No caso da extração por ultrassom, os pesquisadores concluíram que o teor de flavonoides e compostos fenólicos no extrato aumenta com o tempo de processamento até 30 minutos a 300 W e 25 °C, sendo o

método mais apropriado comparando-se à extração por micro-ondas e maceração convencional, devido ao menor tempo de processo e seletividade de extração. Não houve diferença significativa para este processamento na extração entre o uso da relação sólido: solvente (etanol 70%) 1:10 e 1:20.

No estudo de extração de “poplar propolis” (tipo europeia), Trusheva *et al* (2007) não realizaram análise de flavonoides totais, porém, para flavonas e flavonóis, no processamento por tempo de 30 minutos em banho de ultrassom a 300 W, obtiveram 0,96 mg/g destes compostos, correspondente a 9% a mais que na maceração convencional por 72 horas.

No estudo de Kacha-ananda *et al* (2013), utilizando própolis da China, com etanol 70% como solvente na relação de 1:10 (m/v) de sólido: solvente, em banho de ultrassom por 30 minutos, foi obtido o teor de 20,49 mg/g de flavonoides totais, valor 10% superior ao teor obtido através da maceração convencional por 72 horas.

Kothai e Jayanthi (2014) estudaram própolis indiana extraída com solvente etanol 70% na relação sólido: solvente 1:10 submetida a banho de ultrassom por 3 horas e encontraram o valor de 6,0 mg/g de flavonoides totais.

Hojo (2017) observou que no processamento por ultrassom (480 W/40minutos/40 °C/relação sólido: solvente 1:3 m/m) em 40 minutos foi extraído um teor de flavonoides totais maior que 9 horas de maceração por agitação e correspondente ao teor obtido entre 6 e 7 dias de maceração estática, teor de compostos fenólicos totais correspondente a mais de 8 horas de agitação ou 10 dias de maceração estática e teor de Artepelin-C correspondente a 4,5 horas de maceração por agitação ou 5,5 dias de forma estática.

Os resultados apresentados nesse trabalho foram inferiores quanto ao conteúdo de fenólicos totais e semelhantes quanto ao teor de flavonoides quando comparados aos valores relatados por Machado *et al* (2016) para extratos etanólicos de oito amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil: vermelha (Alagoas e Sergipe), verde (Paraná e Minas Gerais) e marrom (Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná). No trabalho de Machado e colaboradores (2016) o conteúdo de fenólicos totais dos extratos de própolis verde variou entre 16,09 e 18,17 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato, para própolis marrom variou de 11,09 a 11,70 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e para própolis vermelha variou entre 19,87 e 30,03 mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato. Quanto ao teor de flavonoides os resultados variaram de 2,55 a 4,68 mgE_Q 100 mg⁻¹ de extrato para a própolis verde, de 2,44 a 2,79 mgE_Q 100 mg⁻¹ de extrato para própolis marrom e de 5,81 a 5,76 mgE_Q 100 mg⁻¹ de extrato para própolis vermelha.

Os resultados obtidos para flavonoides totais foram semelhantes aos reportados por Silva *et al.* (2006) que obtiveram valores entre 0,50 a 6,5 mg E_{QE}/100 mg de extrato, para extratos de própolis do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Ceará e Piauí.

Olegário *et al.* (2019) realizou uma análise detalhada dos constituintes químicos da própolis marrom, provenientes de quatro diferentes estados (Bahia, Minas Gerais, Paraná e Sergipe) do Brasil. A amostra de própolis do Paraná obteve o teor de fenólicos de 45,84±0,82 mg E_{AG}.g⁻¹ de própolis, Minas Gerais (41,51 ± 1,46 mg E_{AG}.g⁻¹ de própolis), Sergipe (17,51 ± 0,14 mg E_{AG}.g⁻¹ própolis) e Bahia (6,12 ± 0,34 mg E_{AG}.g⁻¹ própolis). Resultados semelhantes e consistentes foram encontrados para os teores totais de flavonóides, a amostra de própolis do Paraná (25,43 ± 0,19 mg E_{QE}.g⁻¹ de própolis), Minas Gerais (21,10 ± 0,49 mg E_{QE}.g⁻¹ de própolis), Sergipe (11,97 ± 0,47 mg de E_{QE}.g⁻¹ de própolis) e Bahia (5,71 ± 0,20 mg de E_{QE}.g⁻¹ própolis).

A legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2001) indica que o padrão de qualidade requer um teor mínimo de 0,5% (m/m) para flavonoides e de 5,0% (m/m) para fenólicos totais para a própolis bruta, enquanto 0,25% (m/m) para flavonoides e 0,50% (m/m) para fenólicos totais nos extratos etanólicos de própolis. Todos os extratos etanólicos de própolis analisados encontram-se nessa faixa, variando de 0,95% a 9,24% (m/m) para teor de flavonoides e de 0,56% a 10,08% (m/m) em relação ao teor de fenólicos totais.

Andrade e colaboradores (2017) analisaram amostras de própolis verde, marrom e vermelha obtidas no estado de Alagoas, observando menores teores de fenóis totais (55,74%) e flavonóides (30,89%), para os extratos de própolis marrom quando comparados com os extratos de própolis verde (90,55% e 59,45%, respectivamente) e vermelha (91,32% e 31,48%, respectivamente).

A fim de comparar os resultados dos teores de fenólicos e flavonoides totais obtidos neste trabalho para os extratos de própolis marrom com os resultados obtidos anteriormente com os extratos de própolis verde avaliados por Salgueiro (2016), criou-se um gráfico comparativo com os resultados observados (**Figuras 27 e 28**), utilizando como método de extração maceração dinâmica à temperatura ambiente.

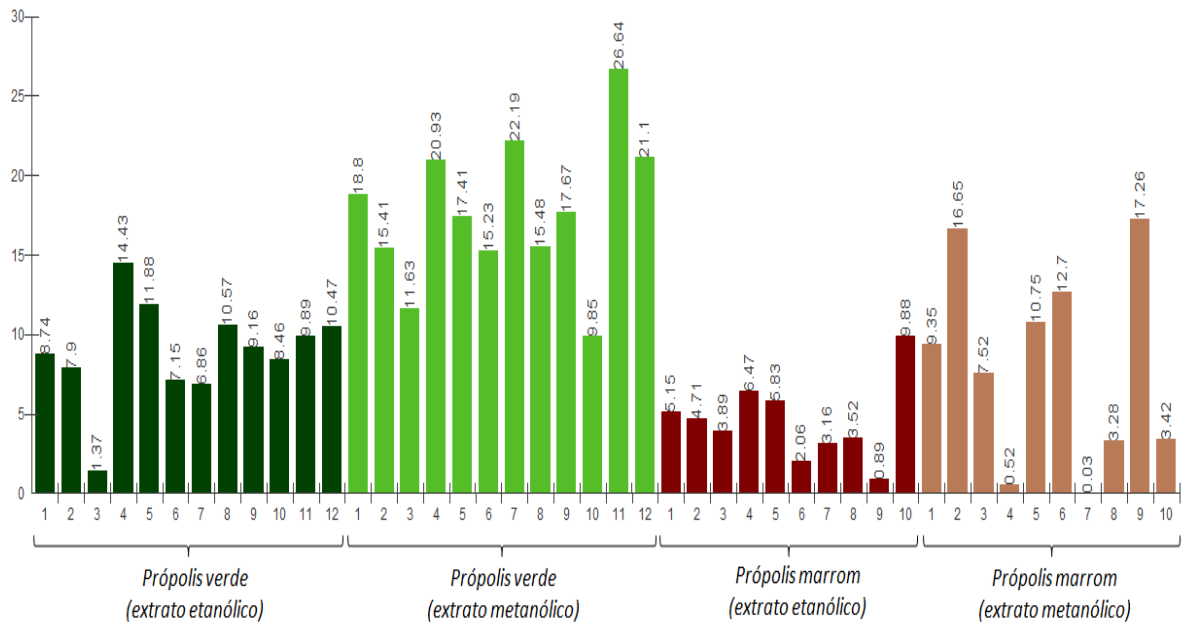


Figura 27- Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde para teor de Fenólicos Totais (mgEAG.100mg⁻¹).

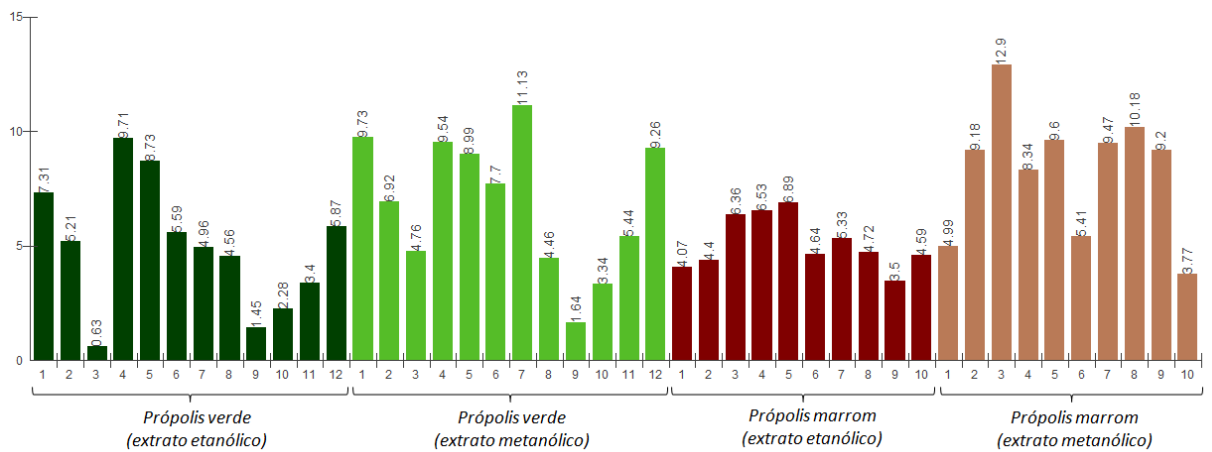


Figura 28- Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde para o teor de Flavonoides (mgEQE.100mg⁻¹)

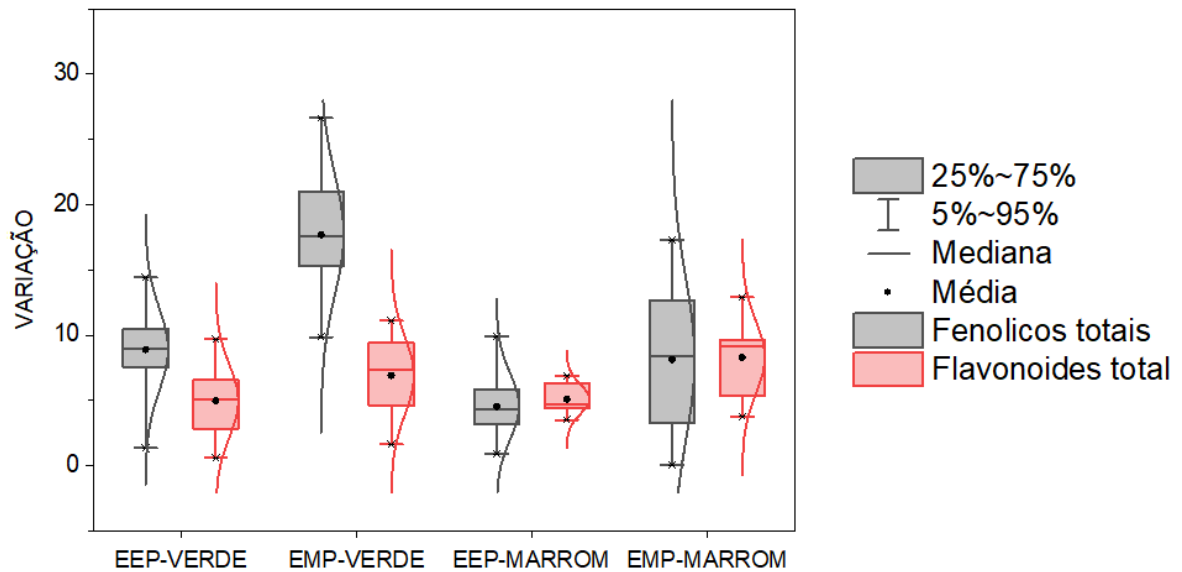


Figura 29 - Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação do teor de fenólicos totais e flavonóides utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.

Pode-se observar pela **Figura 29** que os extratos de própolis verde apresentaram maiores médias quanto aos teores de substâncias fenólicas quando comparados aos extratos de própolis marrom. Já para os teores de flavonoides a diferença entre as médias foi menor.

A variação no teor de substâncias fenólicas na própolis pode estar relacionada a fatores como a flora visitada pelas abelhas, origem geográfica e tipo de abelha. Conforme observado neste trabalho e em outros relatos da literatura, a própolis marrom tem origem de grande variabilidade de espécies vegetais e o teor de substâncias fenólicas costuma variar e ser inferior aos relatados para outros tipos de própolis (verde e vermelha).

Dados descritos na literatura sinalizam que a própolis verde brasileira é o tipo que apresenta o maior teor de substâncias fenólicas (DE MELLO et al., 2014). A **Tabela 19** apresenta a variação no teor de fenólicos e flavonoides totais para a própolis produzida nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil.

Tabela 19 - Variação no teor de fenólicos flavonoides totais de acordo com a região brasileira produtora (DE MELLO et al., 2014).

Região Brasileira	Fenóis Totais	Flavonoides
Nordeste	5,09% - 29,52%	0,36% - 33,15%
Sudeste	7,89% - 19,43%	25,05% - 50,52%
Sul	5,15% - 12,80%	3,91% - 40,70%
Centro-Oeste	3,37% - 13,22%	5,30% - 41,14%

5.5. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de própolis

Neste trabalho a avaliação da atividade antioxidante foi realizada por três métodos: captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - DPPH, captura do radical livre - ABTS^{•+} e método de redução do ferro – FRAP, a fim de determinar a capacidade antioxidante dos dez extratos etanólicos e metanólicos de própolis (**P1** a **P10**) obtidos por diferentes métodos de extração (maceração dinâmica-**MD**, maceração dinâmica e aquecimento- **MDAQ**, ultrassom-**US** e ultrassom imersão-**USI**).

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização é responsável por sua coloração violeta.

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) é baseado na captura do radical DPPH[•] por antioxidantes que agem como doadores de hidrogênio, reduzindo-o a hidrazina (**Figura 30**). Este processo leva a um decréscimo da absorbância a 520nm causado pela mudança na coloração de violeta à amarelo claro.

A capacidade antiradicalar expressa pelo parâmetro EC₅₀ é definida como a quantidade do antioxidante necessário para diminuir 50% da concentração do DPPH[•] inicial.

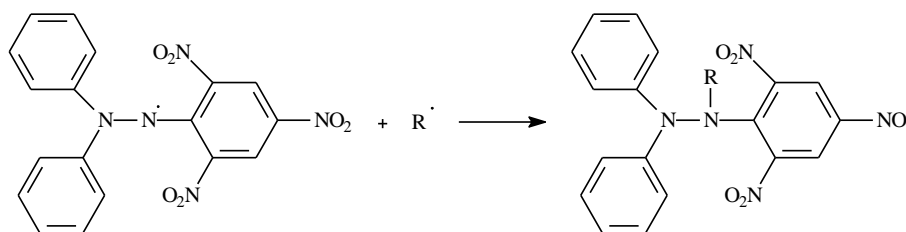


Figura 30 - Estabilização do radical livre DPPH (MOLYNEUX, 2004).

Embora seja um teste amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de alimentos, extratos vegetais e substâncias puras, tanto pela simplicidade e rapidez quanto pela

reprodutibilidade, os resultados devem ser interpretados com cuidado. A presença de determinadas substâncias, tais como os carotenoides, que absorvem por volta de 515 nm, podem interferir nos resultados devido à sobreposição dos seus espectros ao do DPPH (ALVES, *et al.*, 2010).

As médias e os desvios padrão para a avaliação capacidade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (**DPPH- CE₅₀** = µg/mL) dos extratos (EEP e EMP) estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20- Capacidade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (**DPPH- CE₅₀** = µg/mL) dos extratos (EEP e EMP).

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	77,30±2,12	27,53±0,41	82,92±0,98	26,73±0,57	18,66±0,095	23,68±0,87	26,8±1,59	14,88±1,09
P2	63,74±5,23	37,61±1,35	79,57±5,38	30,44±0,58	16,22±0,84	26,61±1,20	23,76±1,33	13,25±0,72
P3	11,46±2,43	28,04±0,7	84,97±2,18	37,5±2,43	14,79±0,44	34,04±1,7	57,92±2,52	16,47±1,58
P4	28,46±0,46	28,65±0,68	30,97±0,7	34,03±0,02	21,65±3,88	14,12±2,9	24,91±1,08	14,01±0,8
P5	43,9±0,44	24,21±0,17	41,9±0,65	36,21±0,41	14,84±1,59	24,24±0,75	59,44±2,94	14,98±1,07
P6	58,88±4,36	47,43±1,01	40,41±0,63	38,33±1,94	21,21±0,15	27,11±1,28	25,44±1,42	23,89±0,40
P7	33,68±2,15	36,93±1,42	47,91±2,76	40,30±1,83	10,06±1,00	26,78±0,47	25,83±0,17	20,93±0,13
P8	31,90±0,53	44,01±0,67	35,17±2,02	33,68±1,03	16,79±2,53	21,81±0,51	33,14±1,19	16,54±0,43
P9	22,19±1,34	31,13±0,77	69,64±1,95	42,93±1,04	18,26±2,31	20,85±2,31	50,14±1,82	55,41±1,84
P10	35,41±0,33	28,35±0,51	30,95±2,36	27,53±1,54	22,53±1,30	45,17±1,15	19,88±1,02	56,89±1,17
Média/D.P	40,70±20,31	33,39±7,75	54,44±22,3	34,77±5,34	17,50± 3,80	26,44±8,34	34,73±15,1	24,73±16,8

Pode-se observar pela Tabela 21 que as capacidades antioxidantes por DPPH foram superiores utilizando metanol como solvente de extração.

Tabela 21 - Médias das capacidades antioxidantes por DPPH de acordo com o solvente e método de extração (**DPPH- CE₅₀** = µg/mL).

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	40,69 ± 20,31	33,39 ± 7,75	54,44 ± 22,3	34,77 ± 5,34
EMP	17,5 ± 3,8	26,44 ± 8,34	34,73 ± 15,11	24,73 ± 16,88

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre capacidades antioxidantes utilizando DPPH de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de

acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA e, rejeitada a hipótese de igualdade, foi realizado o teste *Tukey* para identificar a origem de variação. (Tabela 22)

Tabela 22- ANOVA realizado com os resultados de capacidade antioxidante por DPPH.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	4484,563	1	4484,563	22,48	1,04E-05	3,97
Colunas	3381,347	3	1127,116	5,65	0,001558	2,73
Interações	893,638	3	297,8793	1,49	0,223623	2,73
Dentro	14362,12	72	199,4738			
Total	23121,66	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 22, houve diferença significativa entre as médias das capacidades antioxidantes por DPPH tanto de acordo com o tipo de solvente ($F: 22,48 > F_{\text{crítico}}: 3,97, p < 0,05$) como de acordo com o método de extração ($F: 5,65 > F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$), sendo a diferença entre as médias de acordo com o tipo de solvente mais significativa do que de acordo com o método de extração, assim como foi observado para o teor de flavonoides e fenólicos totais.

No teste *Tukey* foram verificadas diferenças significativas (IC 95%) entre as médias da capacidade antioxidante por DPPH obtidas por ultrassom (US) e ultrassom com sonda de imersão (USI) e por maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) e ultrassom (US) no caso da extração com etanol (Figura 31). Com relação a extração com metanol, houve diferença significativa entre as médias obtidas por maceração dinâmica (MD) e ultrassom (US), conforme mostrado na Figura 32.

Dessa forma, o solvente que se mostrou mais adequado para a obtenção de extratos de própolis marrom com maior capacidade antioxidante foi o metanol, e os métodos de extração mais adequados foram a maceração dinâmica (MD), maceração dinâmica com aquecimento (MDAQ) e ultrassom com sonda de imersão (USI), por apresentarem as menores médias de CE_{50} (maiores capacidades antioxidantes), que não foram consideradas estatisticamente diferentes.

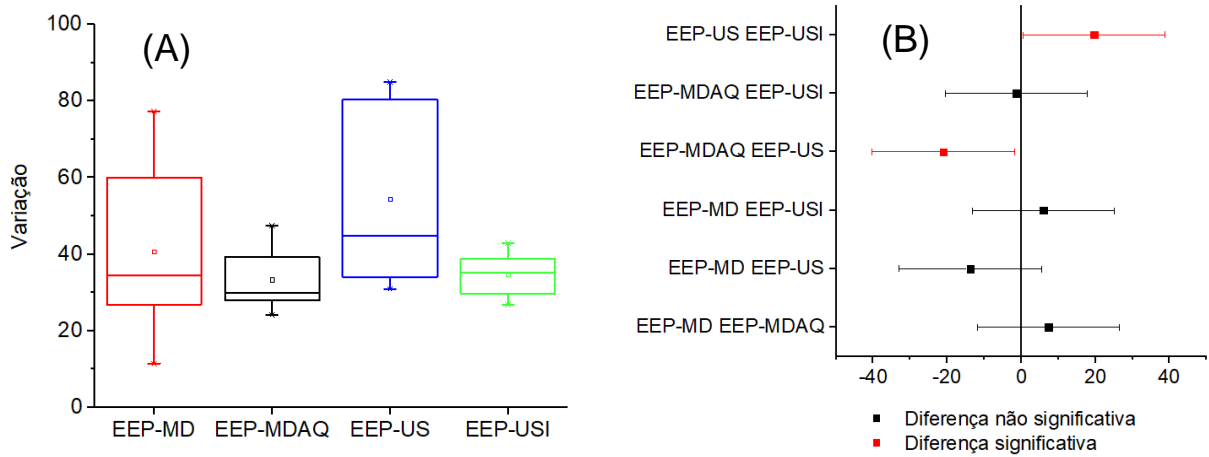


Figura 31- (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando etanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

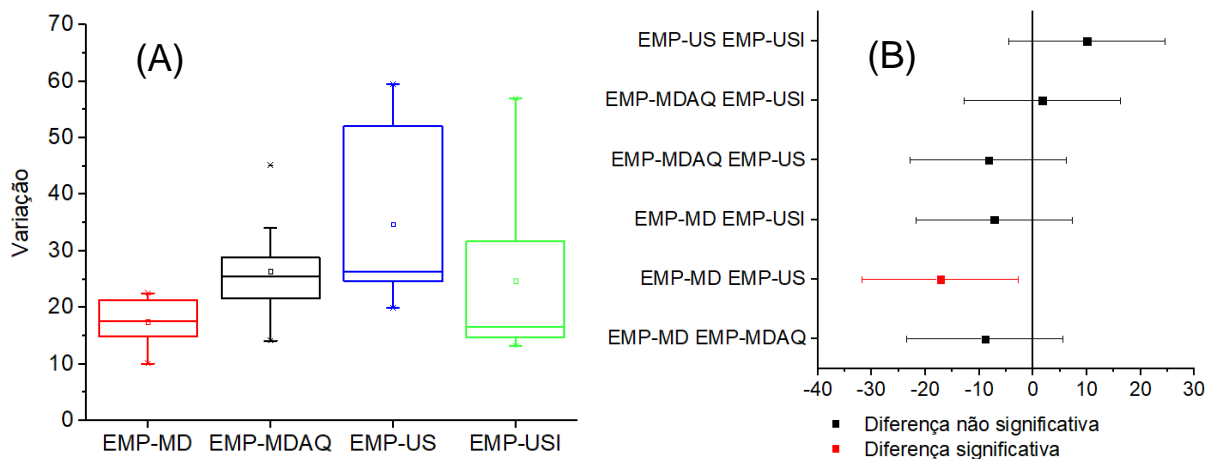


Figura 32- (A) Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando metanol e diferentes métodos de extração. (B) Gráfico de diferença de médias (IC 95%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Yeo *et al* (2015) que observaram que os extratos etanólicos de própolis da Malásia obtidos pelo método extrativo convencional por maceração apresentaram maior atividade de captura de radicais livres pelo método de DPPH ($8,91 \pm 0,48$ g / mL), comparada com o extrato obtido no processo de extração com ajuste de pH e realce ultrassônico ($27,89 \pm 1,27$ g / mL).

A fim de comparar os resultados obtidos neste trabalho quanto capacidade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH- CE_{50} =

$\mu\text{g/mL}$), utilizou-se os resultados da capacidade antioxidante (DPPH- CE_{50}) dos extratos de própolis verde, anteriormente avaliados por Salgueiro (2016) (Figura 33).

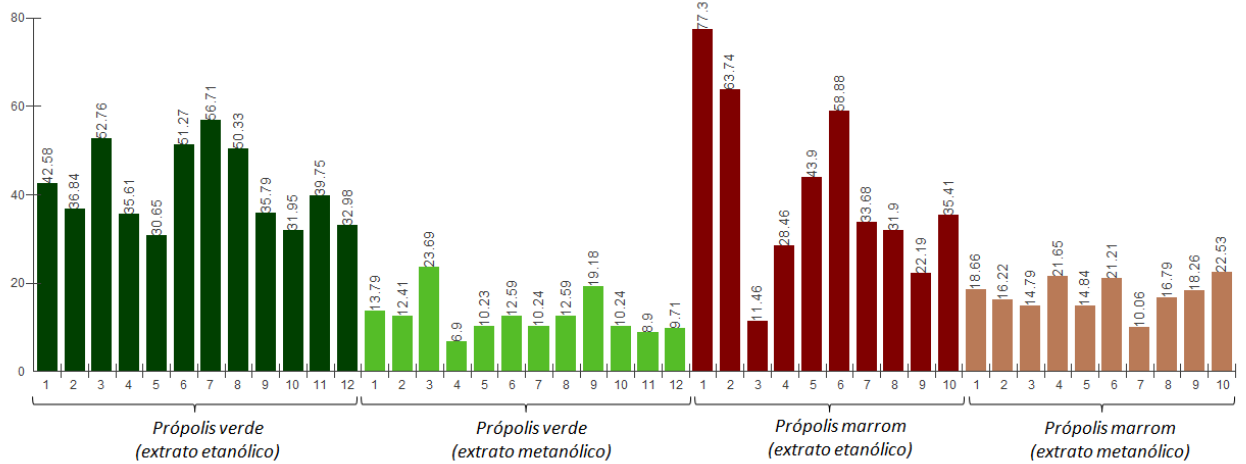


Figura 33 - Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo radical DPPH ($\text{CE}_{50} = \mu\text{g/mL}$).

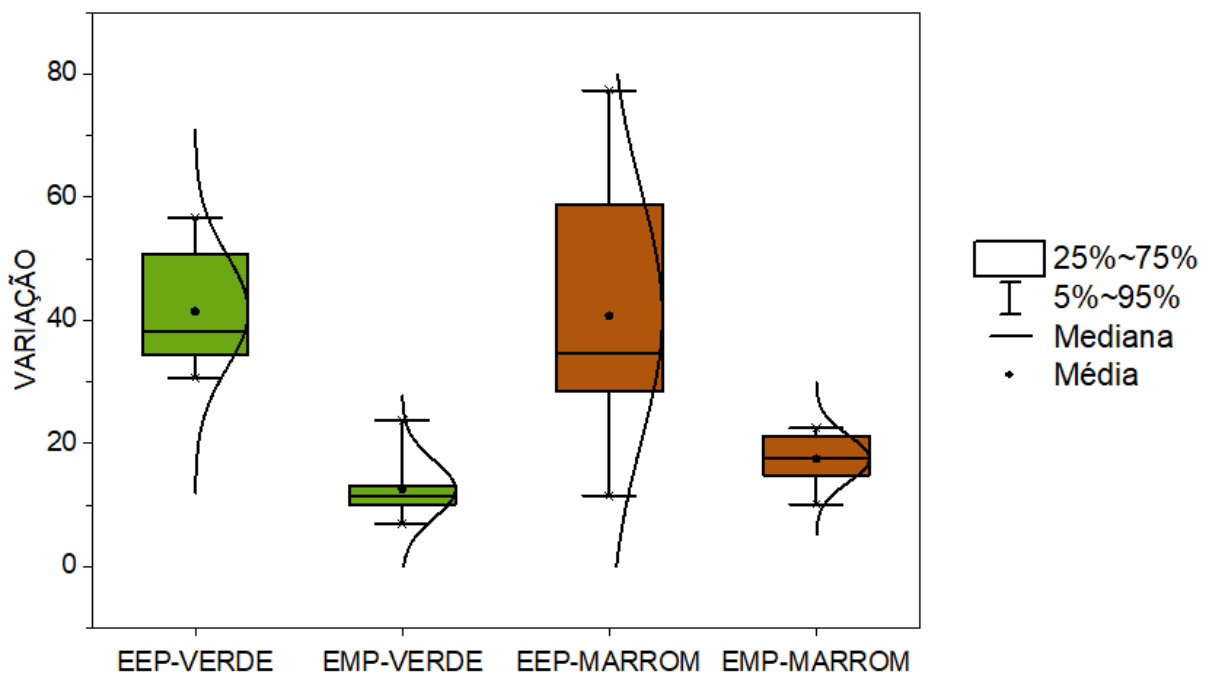


Figura 34 - Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por DPPH utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.

Quando comparados os EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde (Figura 33 e 34), observou-se que os extratos de própolis verde (principalmente, os extratos metanólicos),

possuem melhor capacidade antioxidante (menor CE_{50}) quando comparados aos extratos de própolis marrom.

A literatura aponta correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de substâncias fenólicas na própolis (CABRAL *et al*, 2009; COTTICA *et al*, 2011), principalmente pela presença de flavonoides (ALENCAR *et al*, 2007), ácidos fenólicos e fenilpropanoides prenilados (SALATINO *et al*, 2005), como o ácido cafeico (GREGORIS e STEVANATO, 2010) e o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) (MATSUDA e ALMEIDA-MURADIAN, 2008), respectivamente. Essa justificativa pode explicar a diferença da capacidade antioxidante (DPPH- CE_{50}) entre os extratos de própolis marrom e verde, uma vez que os extratos de própolis verde apresentaram maiores valores em substâncias fenólicas comparados aos extratos de própolis marrom.

Andrade (2017) comparou as atividades antioxidantes de própolis marrom, vermelha e verde através de matriz de correlação, também observando forte correlação ($r = 0,9$) entre o teor de fenóis totais com a capacidade antioxidante através do método de DPPH.

Cottica e colaboradores (2011) avaliaram extratos hidroalcoólicos de própolis verde (Maringá, Paraná) através do teor de substâncias fenólicas e capacidade antioxidante, onde a capacidade antioxidante através do método DPPH (CE_{50}) variou entre 47,00 a 160,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, significativamente inferior ao observado neste trabalho.

Devequi-Nunes e colaboradores (2018) avaliaram os três tipos de extratos etanólicos de própolis (marrom, verde e vermelha), observando menor CE_{50} (maior capacidade antioxidante) para a própolis vermelha (89,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido da própolis verde (133,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e da própolis marrom (159,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Bittencourt *et al* (2015) analisaram a capacidade antioxidante (DPPH) de extratos etanólicos de própolis verde e marrom brasileira. Entre os extratos de própolis verde, a capacidade antirradicalar em CE_{50} variou entre 21,50 a 78,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto para própolis marrom variou de 31,72 a 60,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Neste ensaio, quanto maior a capacidade do extrato de reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} , mais intensa é a mudança da cor verde-amarelada para tons de azul. Essa conversão do complexo de Fe^{3+} do TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) à forma ferrosa (Fe^{2+}) ocorre devido à presença de redutores (antioxidantes), conforme mostrado na **Figura 35**. Ao se medir a formação da intensidade da cor azul no comprimento de onda de 593 nm, é possível medir a concentração de complexo- Fe^{2+} formado. Nesse sentido, quanto maior for a absorbância das amostras a 593

nm, maior o poder de redução. As propriedades de redução são geralmente associadas com a presença de redutores, que têm mostrado exercer ação antioxidante pela quebra da reação em cadeia dos radicais livres por doação de um átomo de hidrogênio (SHIMADA, 1992).

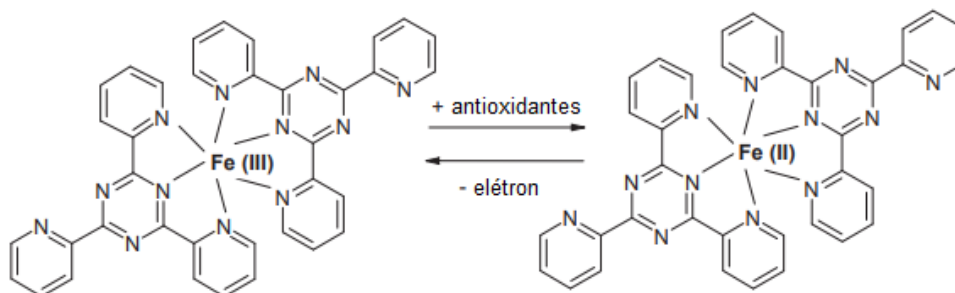


Figura 35- Redução do íon Fe (III) pelo TPTZ.

As médias e os desvios padrão para a avaliação da capacidade antioxidante pelo método de Redução do Íon Férrico (FRAP = mmol Fe(II)/100 mg de extrato) dos extratos (EEP e EMP) estão apresentados na **Tabela 23**.

Tabela 23- Capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP= mmol Fe(II)/100 mg de extrato).

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	212,18±0,001	553,85±0,001	231,63±0,010	375,15±0,004	368,11±0,036	285,15±0,041	376,44±0,028	285,70±0,050
P2	207,55±0,011	271,07±0,018	306,81±0,003	342,92±0,002	365,70±0,043	289,59±0,035	355,70±0,007	264,96±0,008
P3	250,15±0,010	535,33±0,017	296,63±0,004	375,33±0,010	304,41±0,024	147,92±0,005	313,11±0,047	298,48±0,030
P4	294,78±0,009	325,15±0,017	341,44±0,004	438,48±0,009	297,74±0,029	325,15±0,017	395,52±0,021	244,41±0,009
P5	237,55±0,006	278,85±0,004	258,85±0,009	455,7±0,009	331,44±0,005	278,85±0,004	308,29±0,028	246,63±0,030
P6	232,37±0,002	315,15±0,008	251,07±0,020	404,59±0,014	350,89±0,053	315,15±0,008	382,18±0,035	228,66±0,014
P7	285,52±0,008	280,89±0,017	219,04±0,009	359,04±0,004	365,89±0,054	280,89±0,017	398,11±0,016	314,96±0,015
P8	274,22±0,004	305,15±0,010	329,96±0,002	384,96±0,009	292,18±0,037	305,15±0,010	141,81±0,001	481,26±0,019
P9	308,29±0,013	337,55±0,008	342,55±0,00	233,29±0,004	343,11±0,007	337,55±0,008	295,70±0,019	272,92±0,083
P10	347,20±0,006	364,31±0,010	373,83±0,014	355,83±0,005	270,52±0,078	168,66±0,013	288,11±0,018	239,22±0,008
Média/D.P.	264,98±44,91	356,73±103,13	295,18±52,72	372,53±60,73	329,00±35,4	273,41±63,9	325,5±77,01	287,72±73,38

Pode-se observar pela Tabela 24 que as médias das capacidades antioxidantes por FRAP variou de acordo com o solvente e o método empregado.

Tabela 24 - Médias das capacidades antioxidantes por FRAP de acordo com o solvente e método de extração (mmol Fe(II)/100 mg de extrato).

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	264,98 ± 44,91	356,73 ± 103,13	295,18 ± 52,72	372,53 ± 60,73
EMP	329,00 ± 35,4	273,41 ± 63,90	325,5 ± 77,01	287,72 ± 73,38

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre capacidades antioxidantes utilizando FRAP de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA. (Tabela 25)

Tabela 25 - ANOVA realizado com os resultados de capacidade antioxidante por FRAP.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	6807,866	1	6807,866	1,52	0,221248	3,97
Colunas	11217,16	3	3739,054	0,84	0,478386	2,73
Interações	88956,23	3	29652,08	6,63	0,000511	2,73
Dentro	321939,8	72	4471,386			
Total	428921,1	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 25, não houve diferença significativa entre as médias das capacidades antioxidantes por FRAP tanto de acordo com o tipo de solvente ($F: 1,52 < F_{\text{crítico}}: 3,97, p > 0,05$) como de acordo com o método de extração ($F: 0,84 < F_{\text{crítico}}: 2,73, p > 0,05$), portanto, não foi constatada variação significativa das médias de acordo com o solvente e o método empregado. No entanto, ao associar os solventes com determinados métodos, houve diferença significativa na capacidade antioxidante ($F: 6,63 < F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$). Ou seja, embora as escolhas isoladas do solvente e do método de extração não apresentaram diferenças estatísticas significativas, a combinação do solvente com o método empregado foi importante para o aumento da capacidade antioxidante do extrato.

Foi, portanto, verificada a variação e as diferenças das médias entre os extratos obtidos por extração com metanol e etanol utilizando os diferentes métodos (Figuras 36 e 37). Dessa forma, observou-se que os extratos obtidos pelo método EEP-USI (ultrassom com sonda de imersão utilizando etanol como solvente), que apresentou a maior média de capacidade antioxidante por FRAP ($372,53 \pm 60,73$ mmol Fe(II)/100 mg), se diferenciou apenas dos

métodos que apresentaram as duas menores médias (EEP-MD e EMP-MDAQ: $264,98 \pm 44,91$ e $273,41 \pm 63,90$ mmol Fe(II)/100 mg, respectivamente), indicando que a combinação da extração etanólica com maceração dinâmica e a extração metanólica com maceração dinâmica e aquecimento foram as menos indicadas em termos de capacidade antioxidante por FRAP.

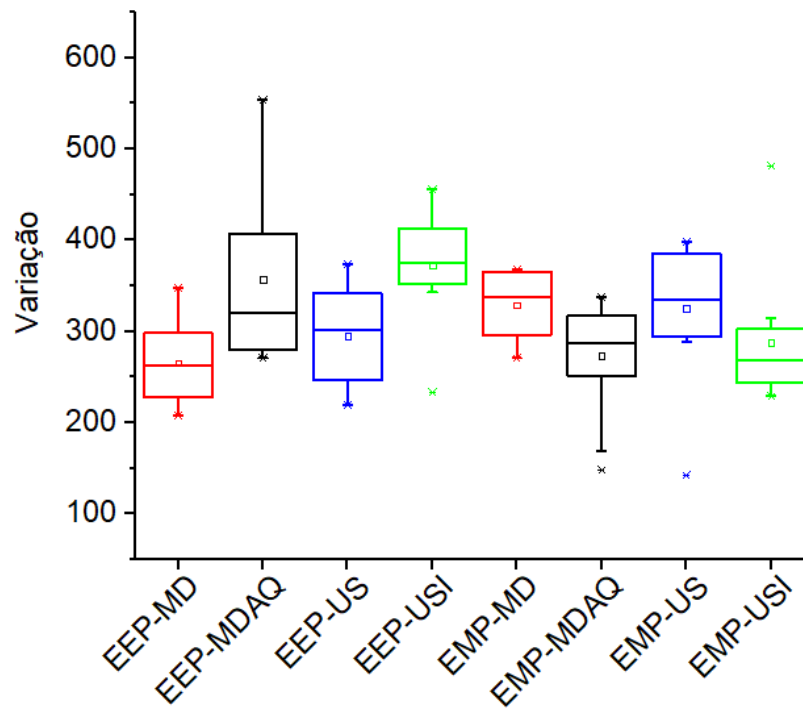


Figura 36- Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando metanol e diferentes métodos de extração.

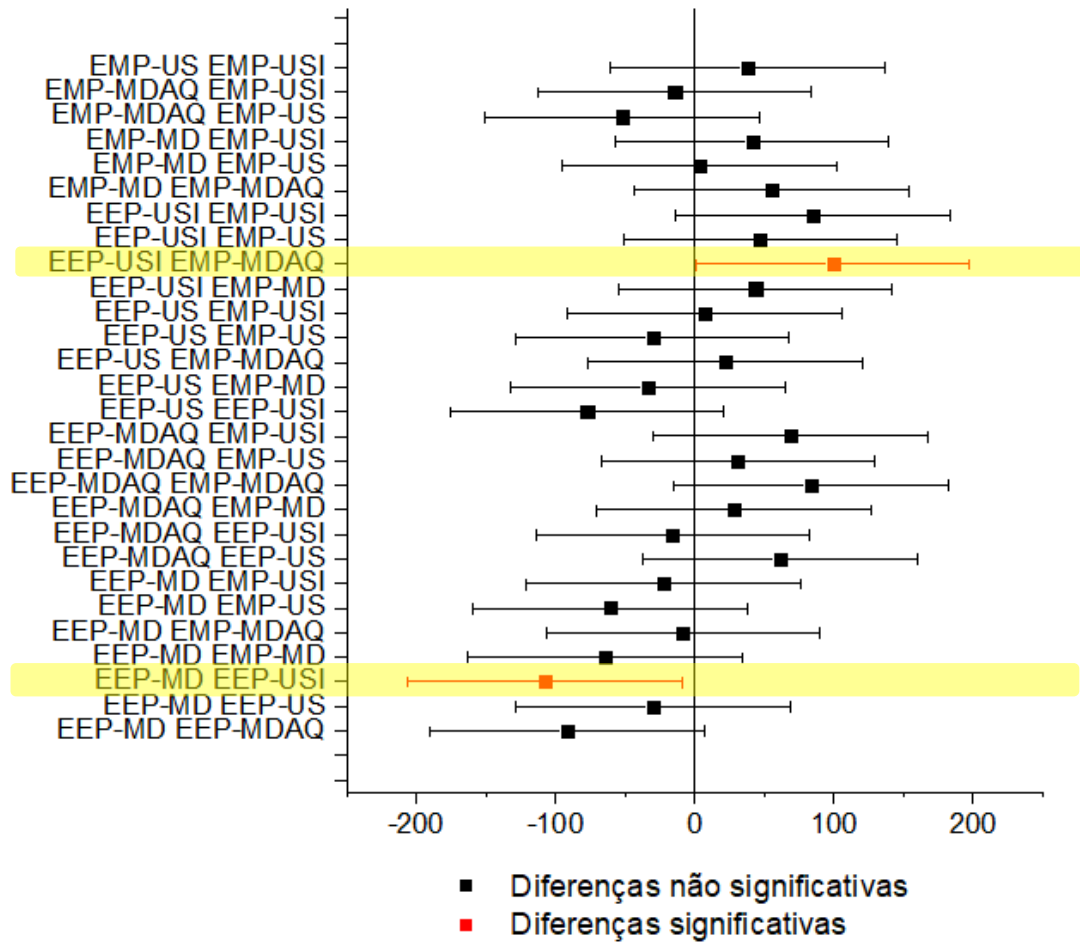


Figura 37- Gráfico de diferenças de médias (IC 95%).

Os valores de FRAP variaram de acordo com os diferentes tipos de extração. Em média os valores variaram de 264,98 mmol Fe(II)/100mg para os EEP obtidos por maceração dinâmica, 356,73 mmol Fe(II)/100mg para os EEP obtidos por maceração dinâmica e aquecimento, 295,18 mmol Fe(II)/100mg para os EEP obtidos por ultrasson e 372,53 mmol Fe(II) /100mg para os EEP por ultrasson de imersão. Já para os EMP os valores de FRAP variaram em média 329,00 mmol Fe(II)/100mg para os EMP obtidos por maceração dinâmica, 273,41 mmol Fe(II)/100mg para os EMP obtidos por maceração dinâmica e aquecimento, 325,50 mmol Fe(II)/100mg para os EMP obtidos por ultrasson e 287,72 mmol Fe(II)/100mg para os EMP por ultrasson de imersão.

Para comparar os resultados obtidos neste trabalho quanto capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP= mmol Fe(II)/100 mg de extrato), utilizou-se os resultados da capacidade antioxidante (FRAP) dos extratos de própolis marrom, anteriormente avaliados por Salgueiro (2016). (**Figura 38**).

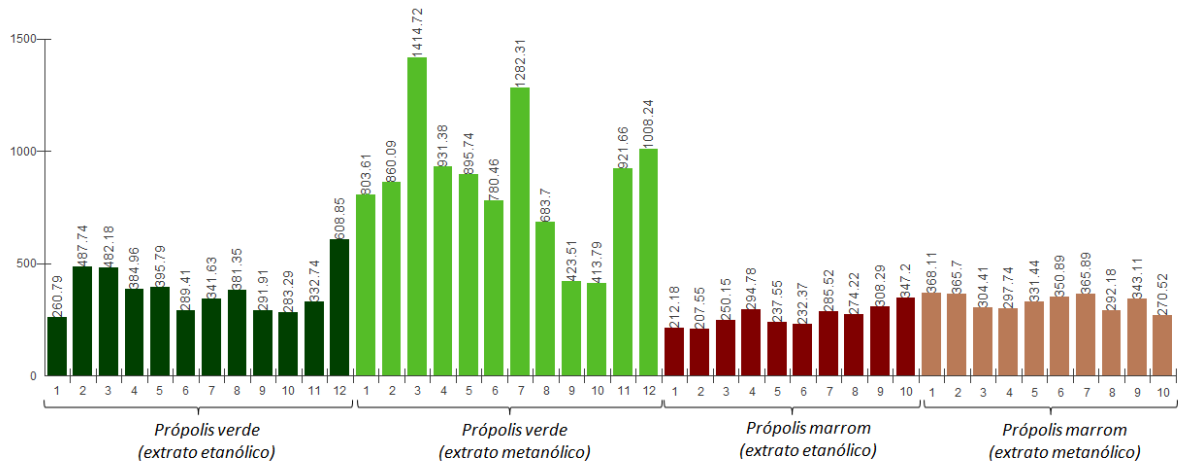


Figura 38 - Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP= mmol Fe(II)/100 mg de extrato)

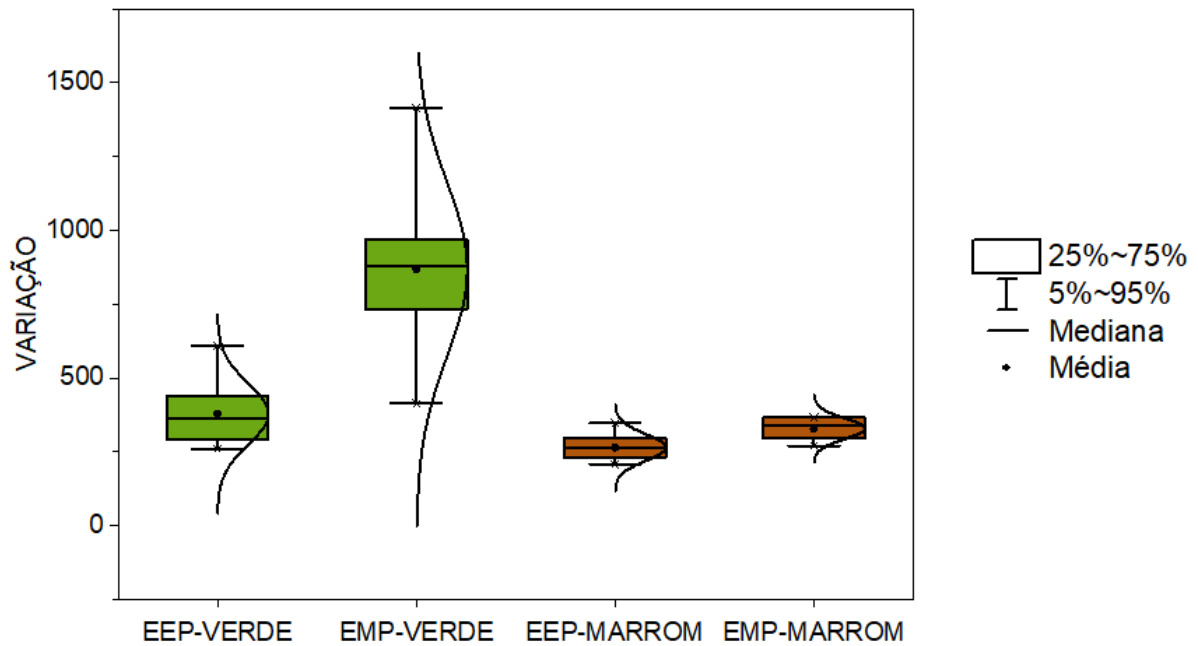


Figura 39 - Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.

Quando comparados os EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde (**Figura 38 e Figura 39**), observa-se que os extratos de própolis verde possuem maiores valores de capacidade antioxidante pelo método de redução do Íon Férrico (FRAP) quando comparados aos extratos de própolis marrom.

Cottica e colaboradores (2011) avaliaram extratos hidroalcoólicos de própolis verde (Maringá, Paraná) através do teor de substâncias fenólicas e atividade antioxidante, quanto ao ensaio com FRAP mostrou valores entre 52,8 - 136,5 $E_{Fe(II)}.100mg^{-1}$ de extrato.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram valores acima (0,41-0,77 mmol) dos valores encontrados para os extratos em $CHCl_3$, EtOH e acetona de própolis da Itália. (PAPOTTI *et al*, 2012). Em comparação aos valores encontrados para extratos etanólicos e em etileno glicol de própolis da Espanha, os extratos EEP e EMP apresentaram valores superiores (BONVEHÍ *et al*, 2011).

A capacidade antioxidante usando o teste do ABTS é determinada a partir da leitura (415nm) da inibição causado por antioxidantes ao cátion radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio, $ABTS^{+}$, produzido nesta reação (VASCONCELOS *et al*, 2007).

O método original baseia-se na ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. O complexo perferril da heme proteína produziria o cátion radical ($ABTS^{+}$) de cor azul esverdeada. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo. Alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio, uma vez que outros antioxidantes podem contribuir para reduzir o radical ferrimioglobina formado durante a reação. O percentual de inibição de ($ABTS^{+}$) é determinado em função da concentração e do tempo. Esse método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (VASCONCELOS *et al*, 2007).

As médias e os desvios padrão para a avaliação capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^{+}$ = mmolTE/100mg de extrato) dos extratos (EEP e EMP) estão apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26. Capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion (ABTS^{•+}= mmolTE/100mg de extrato).

Amostras	EEP-MD	EEP-MDAQ	EEP-US	EEP-USI	EMP-MD	EMP-MDAQ	EMP-US	EMP-USI
P1	102,48±0,016	82,31±0,004	98,01±0,018	117,03±0,026	131,92±0,001	81,5±0,001	158,58±0,001	69,75±0,001
P2	103,76±0,003	74,40±0,012	112,05±0,016	127,49±0,026	154,67±0,002	73,66±0,001	97,29±0,002	46,49±0,001
P3	106,82±0,002	95,08±0,009	129,15±0,018	104,9±0,034	128,25±0,003	94,13±0,001	63,43±0,001	82,26±0,001
P4	97,37±0,019	86,91±0,006	136,43±0,007	107,2±0,032	146,07±0,001	86,05±0,001	129,77±0,001	61,03±0,001
P5	97,37±0,017	86,40±0,021	126,73±0,015	130,69±0,021	103,61±0,005	85,54±0,002	120,29±0,003	109,55±0,001
P6	81,29±0,002	113,46±0,035	95,33±0,001	102,22±0,002	141,02±0,001	112,33±0,004	138,11±0,001	85,92±0,003
P7	85,38±0,007	95,84±0,006	104,9±0,003	90,74±0,022	164,52±0,001	94,89±0,001	112,96±0,001	85,54±0,002
P8	85,76±0,005	85,50±0,02	122,64±0,004	98,39±0,021	138,11±0,001	84,66±0,003	126,99±0,003	48,77±0,004
P9	67,76±0,003	51,55±0,004	62,15±0,002	67,76±0,003	99,95±0,001	51,04±0,001	79,86±0,001	96,91±0,001
P10	88,79±0,001	98,65±0,011	87,01±0,010	87,48±0,015	140,89±0,002	97,67±0,001	129,77±0,001	108,54±0,002
Média/D.P	91,68±12,11	87,01±16,40	107,44±22,72	103,39±18,97	134,90±20,36	86,15±16,23	115,71±28,40	79,48±22,62

Pode-se observar pela Tabela 27 que as capacidades antioxidantes por ABTS foram superiores utilizando metanol como solvente de extração através dos métodos de maceração dinâmica e ultrassom.

Tabela 27 - Médias das capacidades antioxidantes por ABTS de acordo com o solvente e método de extração (mmolTE/100mg de extrato).

	MD	MDAQ	US	USI
EEP	91,68 ± 12,11	87,01 ± 16,40	107,44 ± 22,72	103,39 ± 18,97
EMP	134,9 ± 20,36	86,15 ± 16,23	115,71 ± 28,38	79,48 ± 22,62

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre capacidades antioxidantes utilizando ABTS de acordo com o solvente utilizado (metanol e etanol) e de acordo com os métodos de extração, foi realizado o teste ANOVA e, rejeitada a hipótese de igualdade, foi realizado o teste *Tukey* para identificar a origem de variação. (Tabela 28)

Tabela 28- ANOVA realizado com os resultados de capacidade antioxidante por ABTS.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	891,8469	1	891,8469	2,17	0,145	3,97
Colunas	11239,99	3	3746,663	9,12	3,42E-05	2,73
Interações	11653,96	3	3884,655	9,46	2,41E-05	2,73
Dentro	29578,59	72	410,8137			
Total	53364,39	79				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 28, não houve diferença significativa entre as médias das capacidades antioxidantes por ABTS de acordo com o tipo de solvente ($F: 2,17 < F_{\text{crítico}}: 3,97, p > 0,05$). No entanto, a diferença foi significativa de acordo com o método de extração ($F: 9,12 > F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$) e quanto ao método de extração associado ao solvente ($F: 9,46 < F_{\text{crítico}}: 2,73, p < 0,05$).

No diagrama de caixa (Figura 40) e no gráfico de diferenças de médias (Figura 41) observou-se que o método EMP-MD, que apresentou a maior média de capacidade antioxidante por ABTS, apenas não se diferenciou do método EMP-US, sendo, portanto, os métodos que se mostraram mais efetivos para a obtenção de extratos com maior capacidade antioxidante por ABTS.

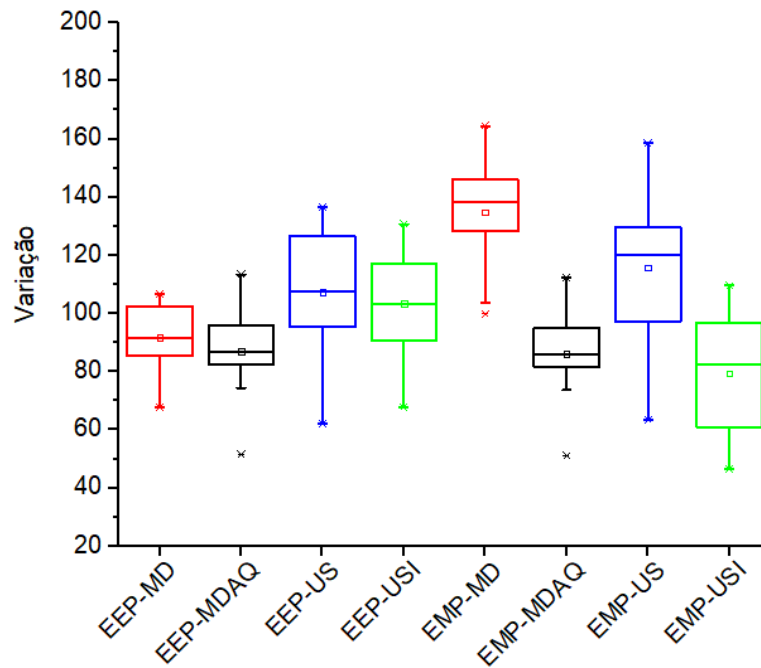


Figura 40 -Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por FRAP utilizando metanol e diferentes métodos de extração.

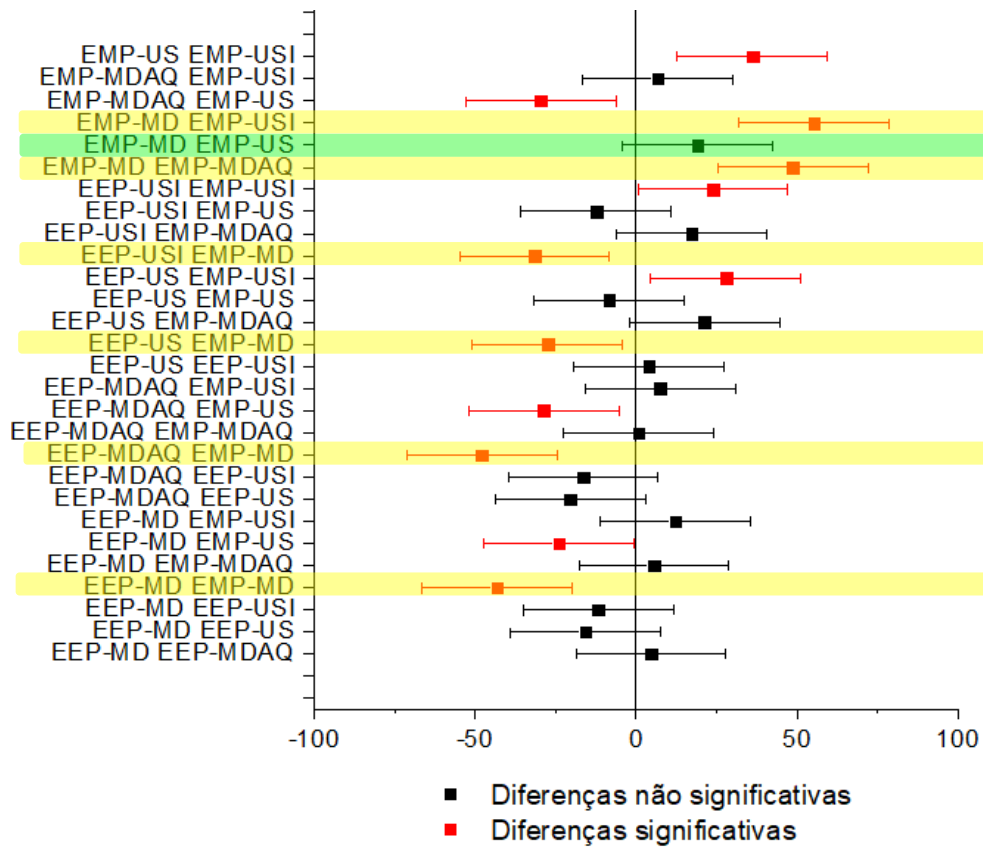


Figura 41- Gráfico de diferenças de médias (IC 95%).

Os valores de ABTS variaram de acordo com os diferentes tipos de extração. Em média os valores variaram de 91,68 mmolTE /100mg para os EEP obtidos por agitação magnética, 87,01 mmolTE /100mg para os EEP obtidos por agitação magnética e aquecimento, 107,44 mmolTE /100mg para os EEP obtidos por ultrassom e 103,39 mmolTE /100mg para os EEP por ultrassom imersão. Já para os EMP os valores de ABTS variaram em média 134,90 mmolTE /100mg para os EMP obtidos por agitação magnética, 86,15 mmolTE /100mg para os EMP obtidos por agitação magnética e aquecimento, 115,71 mmolTE /100mg para os EMP obtidos por ultrassom e 79,48 mmolTE /100mg para os EMP por ultrassom imersão.

Para comparar os resultados obtidos neste trabalho quanto a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^{\cdot+}$ mmolTE/100mg de extrato), utilizou-se os resultados dos extratos de própolis verde, anteriormente avaliados por Salgueiro (2016), (Figura 42).

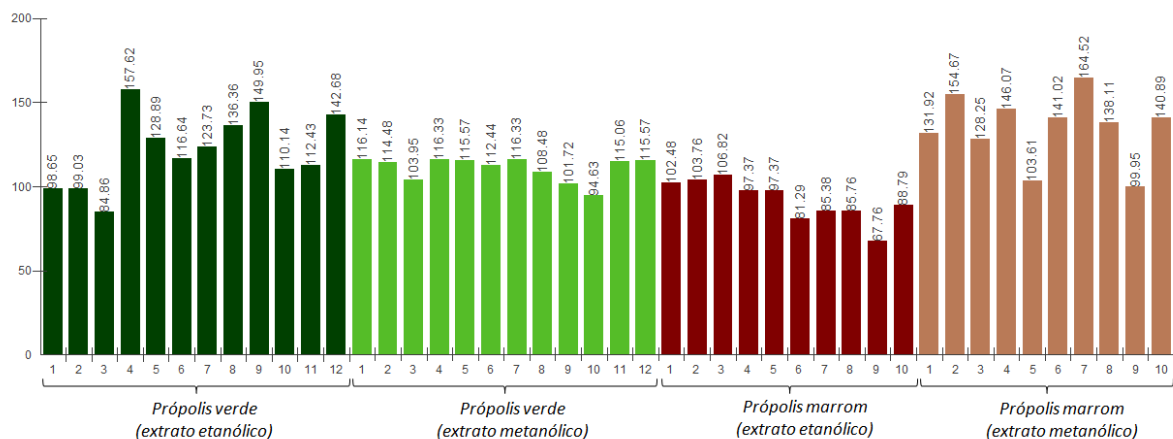


Figura 42 - Comparação dos EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde quanto a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^{\cdot+}$ mmolTE/100mg de extrato)

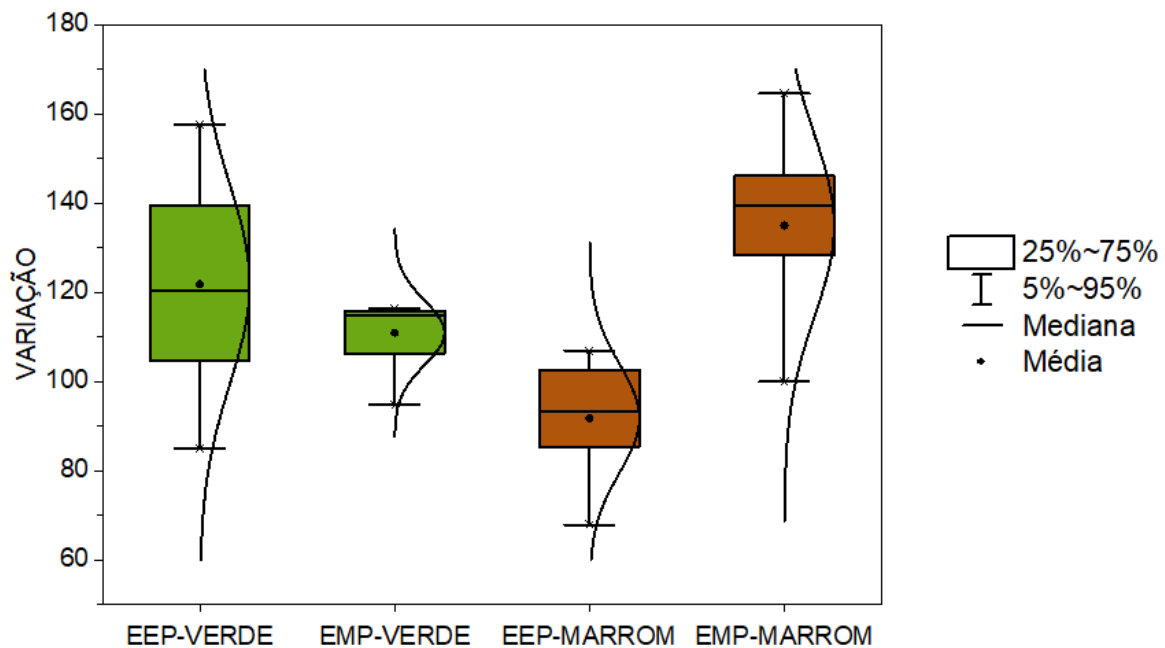


Figura 43 - Diagrama de caixa (*box plot*) comparando a variação da capacidade antioxidante por ABTS utilizando etanol e metanol para a própolis verde e marrom.

Quando comparados os EEP e EMP de própolis marrom e própolis verde (**Figuras 42 e 43**), observa-se que os extratos de própolis verde possuem valores semelhantes aos obtidos para os extratos metanólicos da própolis marrom pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^+$), porém levemente superiores aos extratos etanólicos da própolis marrom.

Amostras de própolis bruta foram coletadas de colméias localizadas em Valpara Chile e os extrato etanólicos em diferentes concentrações (0,05, 0,15 e 0,25 mg / mL) foram avaliados quanto a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical-cátion ($ABTS^+$) obtendo os valores de 0,79, 1,14 e 1,49 mmolTE/100mg, respectivamente (refe). Os resultados obtidos com a própolis marrom foram superiores aos descrito para essa própolis chilena.

Nina e colaboradores (2015) avaliaram extratos metanólicos de amostras de própolis coletadas nos principais centros de produção de mel na Bolívia. Para atividade antioxidante utilizando o método de captura do radical-cátion ($ABTS^+$) obtiveram valores 0,225 a 8,15 mmolTE/100mg também inferiores ao descrito neste trabalho.

Após a análise estatística de todos os extratos de própolis marrom estudados nesse trabalho (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI, EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI) quanto aos teores de fenólicos (TP), teores de flavonoides (TF) e os teores obtidos

pelos três métodos de capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS), observou-se que a extração metanólica com maceração dinâmica (EMP-MD) foi o único tipo de extração que apresentou os melhores resultados para todas as análises realizadas (Tabela 29).

Tabela 29 - Métodos que apresentaram maiores rendimentos de flavonoides totais, fenólicos totais e atividades antioxidantes.

ANÁLISES	MÉTODOS EXTRAÇÃO
Teor de Flavonoides	EMP-MD , EMP-MDAQ
\Teor de Fenólicos totais	EMP-MD , EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI
DPPH	EMP-MD , EMP-MDAQ, EMP-USI
FRAP	EMP-MD , EEP-USI, EEP-MDAQ, EEP-US, EMP-US, EMP-USI
ABTS	EMP-MD , EMP-US

Para compreender melhor a relação entre o teor de bálsamo, ceras, atividade antimicrobiana, flavonoides totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS) dos extratos EMP-MD (extrato que obteve os melhores resultados), foi criada uma matriz de correlação de Pearson para correlacionar os parâmetros (Tabela 30). Pode-se observar uma correlação significativa entre bálsamo e ABTS ($r = 0,67$). Os teores de bálsamo estão relacionados com o conteúdo de substâncias fenólicas presente na própolis, o que justifica a correlação com o ABTS uma vez que essas substâncias são responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos de própolis. Uma correlação significativa também foi observada entre teor de ceras e bálsamos ($r = -0,63$). O coeficiente de correlação de Pearson (r) negativo significa uma correlação inversa, ou seja, quanto maior a quantidade de ceras menor a quantidade de bálsamos. Conforme esperado, uma correlação significativa entre flavonoides e DPPH foi observada ($r = -0,67$), já que maiores teores de flavonoides estão relacionados com melhores resultados de capacidade antioxidante.

5.6. Quantificação das substâncias fenólicas por CLAE-DAD

Na **Tabela 31** foram reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão utilizado para facilitar a comparação com os dados obtidos nos extratos de própolis. No desenvolvimento do método analítico para análise por CLAE-DAD foi possível separar as substâncias fenólicas presentes nos extratos e com isso quantificá-las. As substâncias foram identificadas nos extratos por comparação dos seus t_R e da curva no ultravioleta com padrões autênticos comerciais.

Tabela 31 – Tempo de retenção e máximo de absorção das substâncias utilizadas como padrão.

	Padrões	t_R (min)	λ_{max} (nm)
1-	Ácido clorogênico	4,17	327
2-	Ácido cafeico	5,74	325
3-	Vanilina	7,03	270, 309
4-	Ácido sinapico	7,79	324
5-	Ácido ferulico	8,19	240, 322
6-	Ácido <i>p</i> -cumárico	8,46	310
7-	Ácido rosmarínico	9,16	330
8-	Ácido 2,3 dimetoxi- benzoico	9,55	295
9-	Hesperidina	9,56	283
10-	Ac 2,5 dimetoxi- benzóico	9,70	295
11-	Naringenina	14,55	288
12-	Pinobanksina	14,90	291
13-	Canferol	11,02	267, 365
14-	Pinocembrina	13,58	289
15-	Acacetina	21,83	268, 332
16-	Canferide	22,54	266, 364
17-	Galangina	22,17	285, 359
18-	Pinostrumbina	25,65	289
19-	Tectocrisina	26,09	267,310

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando coluna de fase reversa (C18 – octadecil) é uma das técnicas mais utilizadas para separação e caracterização de ácidos fenólicos e flavonoides em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (KALIL e DE VILLIERS, 2011; CHEN *et al* 2011, STALIKAS, 2007; NACZK e SHAHIDI, 2004; ROBBINS, 2003; MERKEN e BEECHER, 2000, SALGUEIRO, 2016)

Neste trabalho, as análises por CLAE-DAD dos extratos (etanólicos e metanólicos) de própolis marrom foram realizadas em coluna de fase reversa (C-18) de acordo com a

metodologia descrita por Salgueiro e Castro (2016). A fase móvel foi acidificada com ácido acético com objetivo de aumentar a resolução e restringir a ionização das substâncias fenólicas que possuem vários grupos hidroxila na sua estrutura. Para auxiliar a identificação das substâncias presentes nos extratos foram utilizados 19 padrões comerciais, que já tinham sido previamente avaliados pelo nosso grupo: ácidos clorogênico, cafeico, sinápico, ferulico, *p*-cumárico, rosmarínico, 2,3 dimetoxi-benzóico e 2,5 dimetoxi-benzóico; os flavonoides: hesperidina, naringenina, pinobanksina, acacetina, canferide, canferol, pinocembrina, galangina, pinostrombina e tectocrisina; e a vanilina.

Cada padrão foi analisado, individualmente por CLAE-DAD para terem seus tempos de retenção e as suas curvas no UV determinadas, sendo posteriormente utilizadas para identificar as substâncias desconhecidas presentes nos diferentes extratos de própolis. Todas as substâncias utilizadas apresentaram elevado grau de pureza cromatográfica (~98%).

Nos extratos **EEP (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI)** e **EMP (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI)** de própolis marrom avaliados neste trabalho foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, ferulico, *p*-cumárico e rosmarínico, além dos flavonoides pinobanksina, canferol e canferide. A **Figura 44** ilustra as estruturas químicas das principais substâncias identificadas por CLAE-DAD nos extratos.

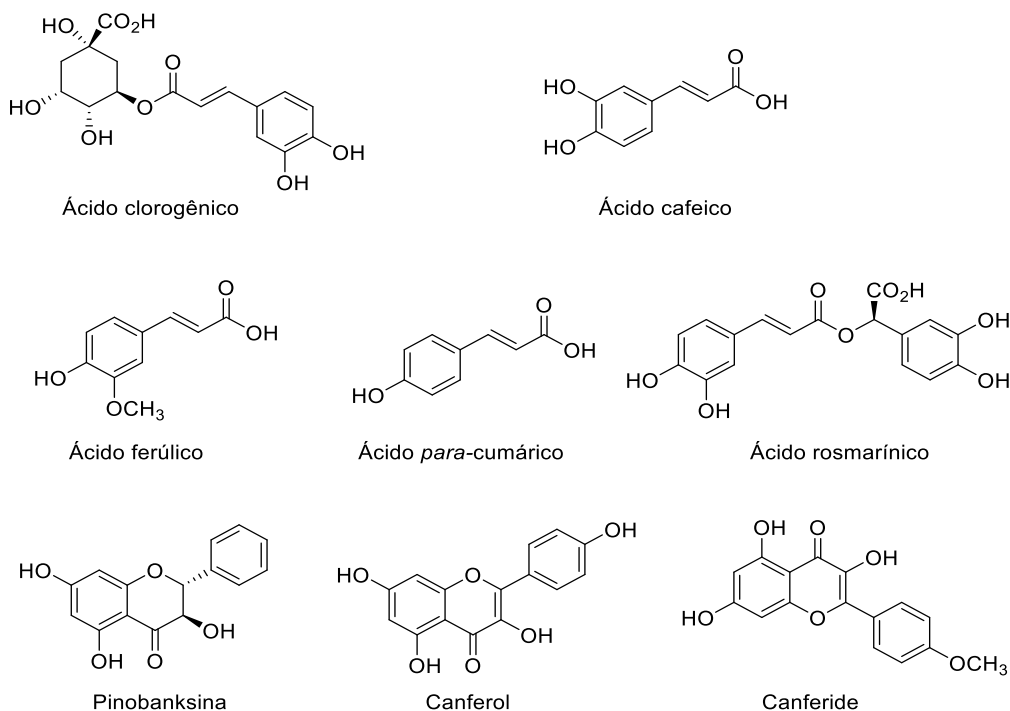


Figura 44 - Estruturas das substâncias identificadas nos extratos de própolis marrom **EEP (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI)** e **EMP (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI)**.

A maioria dos extratos analisados (**EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI, EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI**) apresentou um perfil químico semelhante, diferindo apenas na concentração das substâncias identificadas. A quantificação individual das substâncias fenólicas identificadas nos extratos de própolis foi expresso em mg por 100 mg de extrato.

As **Figuras 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 e 52** apresentam a sobreposição dos extratos etanólicos e metanólicos de própolis marrom (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI, EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI) para a melhor comparação dos seus perfis cromatográficos.

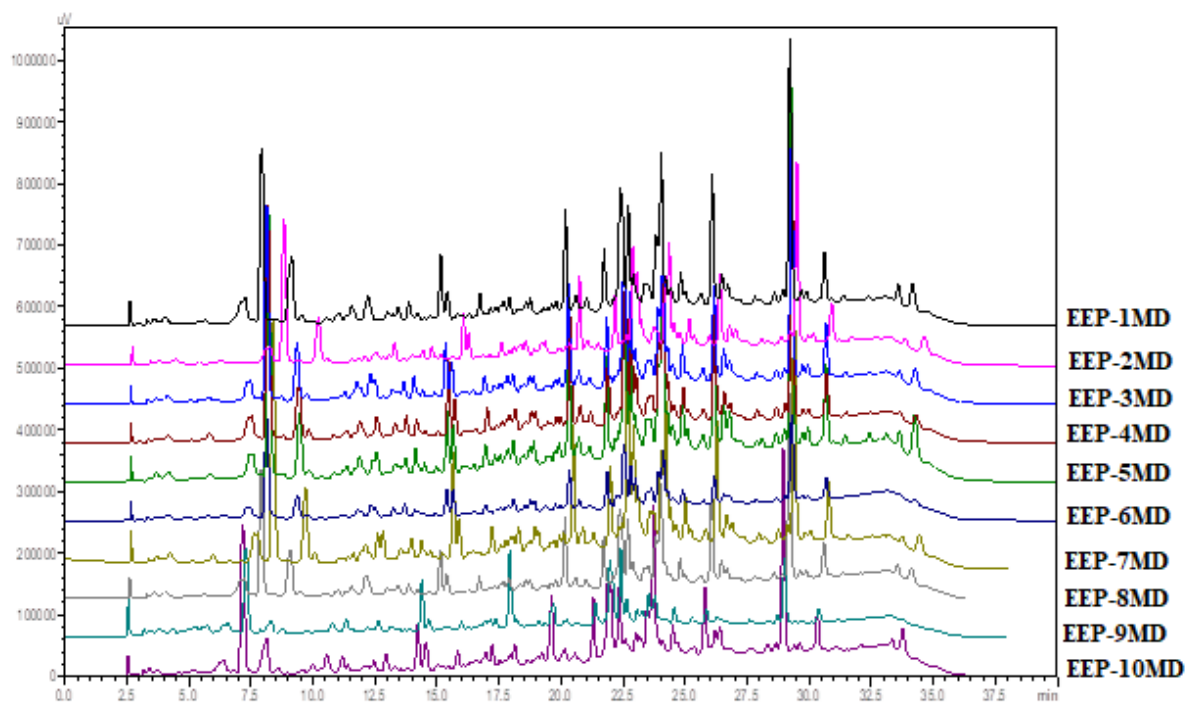


Figura 45 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por maceração dinâmica a temperatura ambiente EEP-1MD a EEP-10MD.

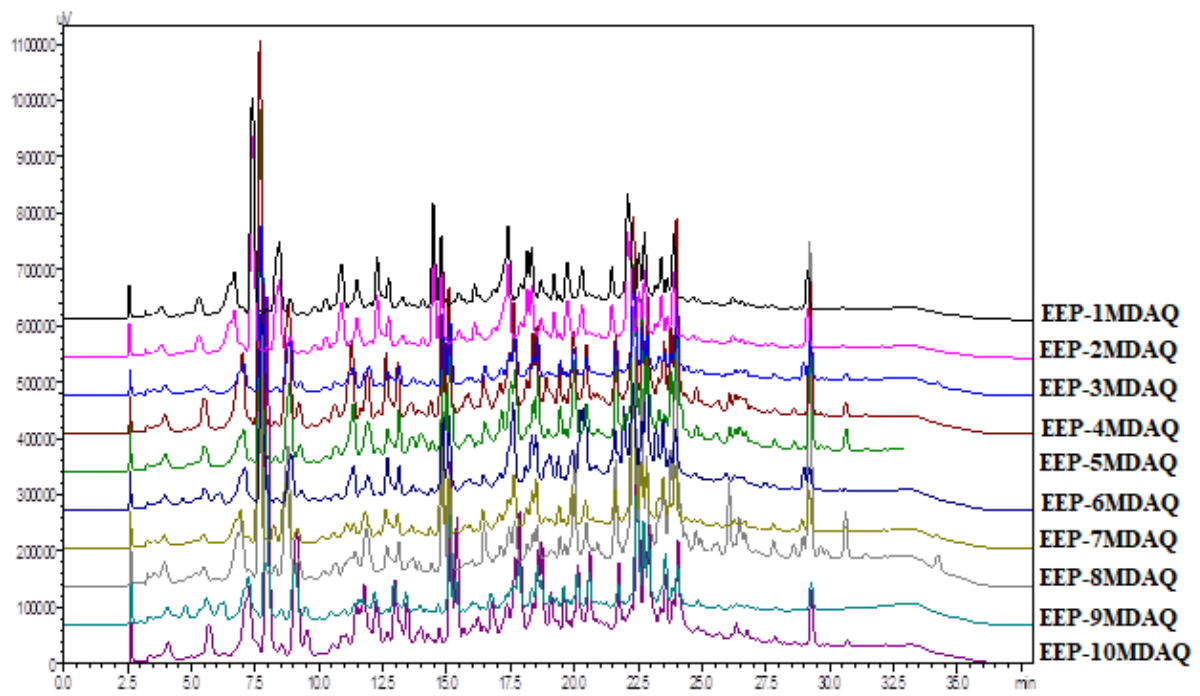


Figura 46 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por maceração dinâmica à 50°C EEP-1MDAQ a EEP-10MDAQ.

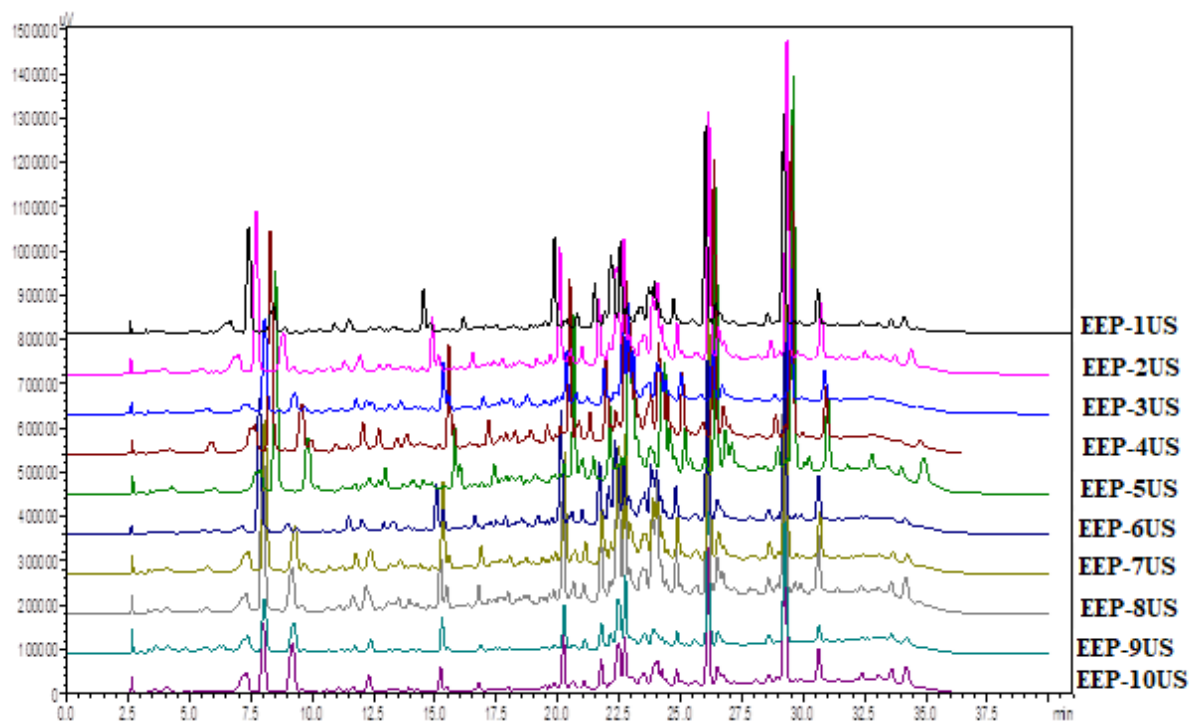


Figura 47- Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por ultrassom EEP-1US a EEP-10US.

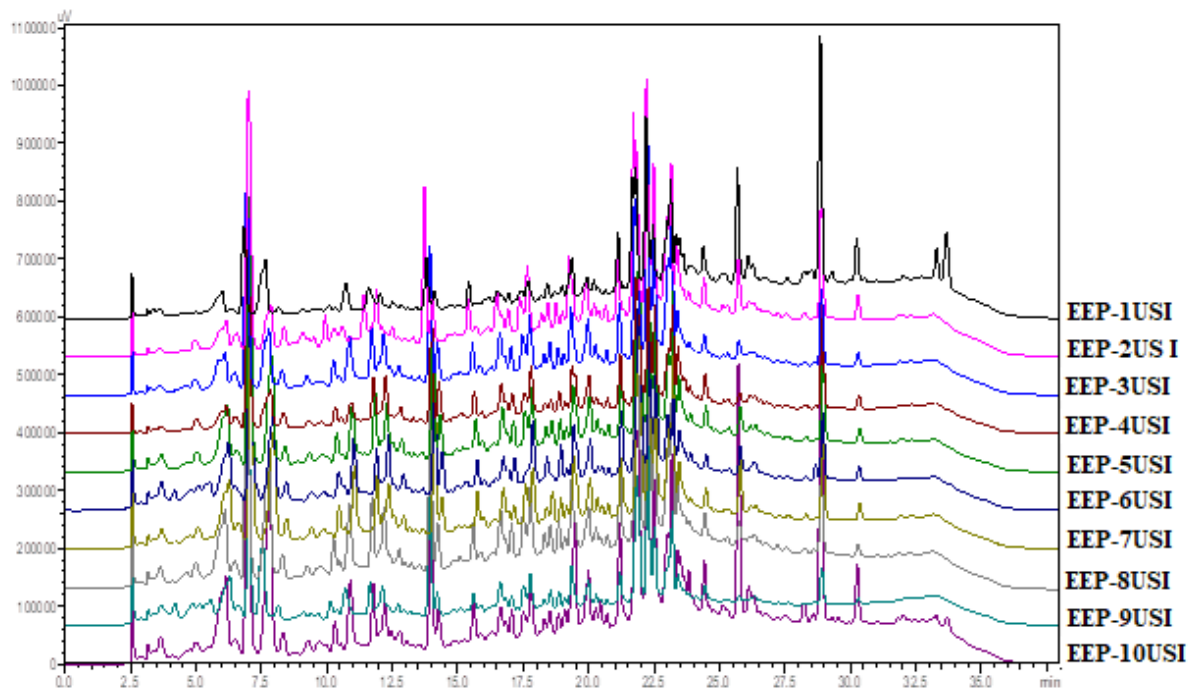


Figura 48- Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis por ultrassom com sonda de imersão EEP-1USI a EEP-10USI.

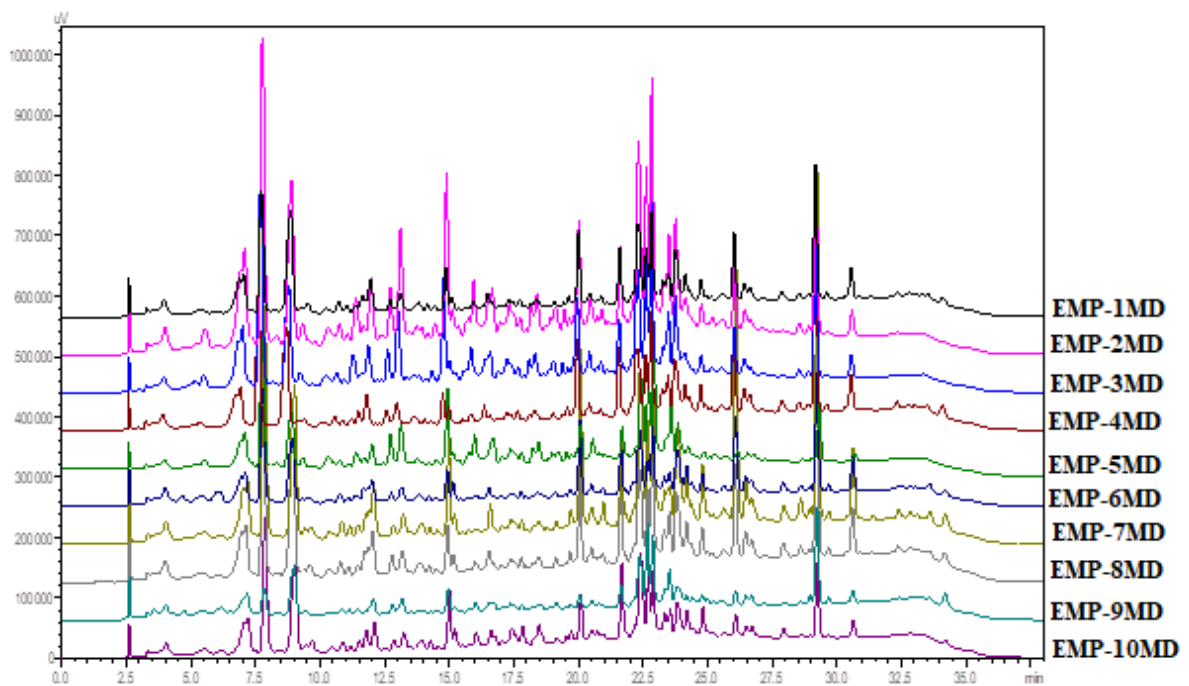


Figura 49- Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por maceração dinâmica a temperatura ambiente EMP-1MD a EMP-10MD.

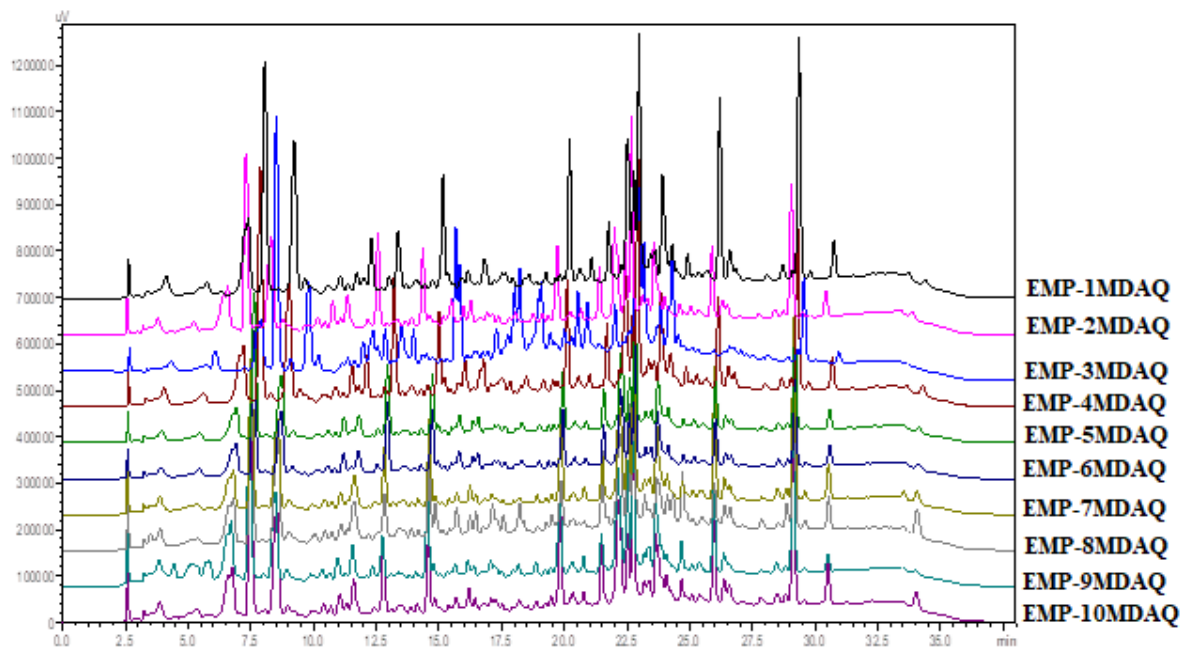


Figura 50 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por maceração dinâmica à 50°C EMP-1MDAQ a EMP-10MDAQ.

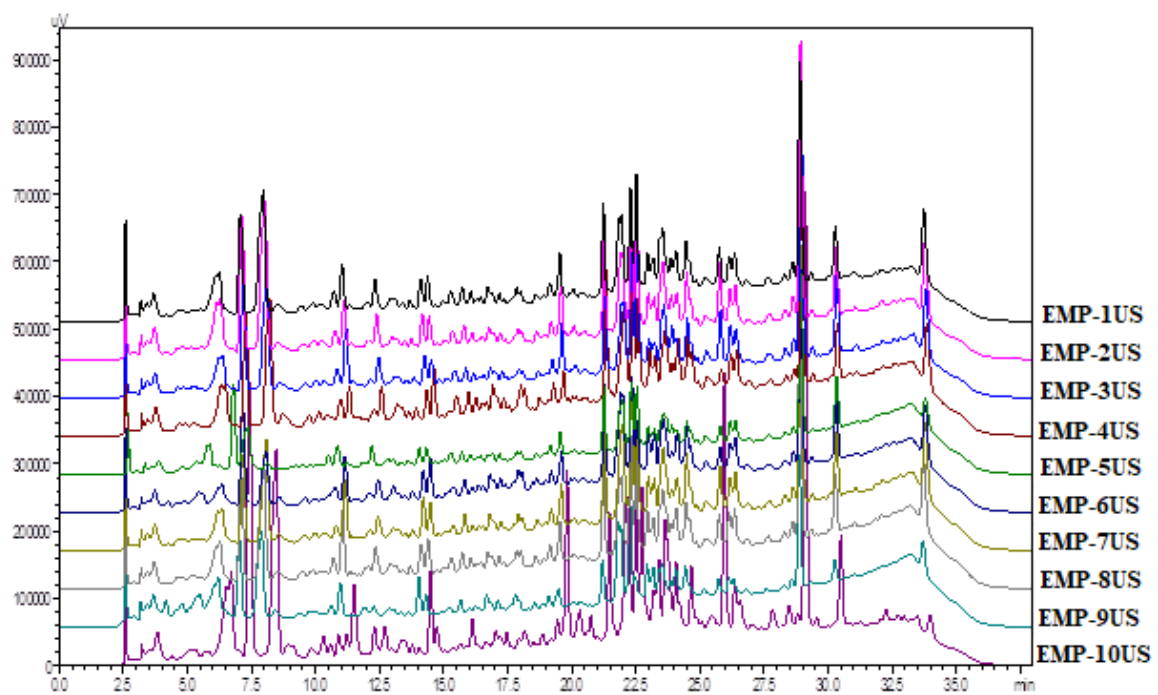


Figura 51- Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por ultrassom EMP-1US a EMP-10US.

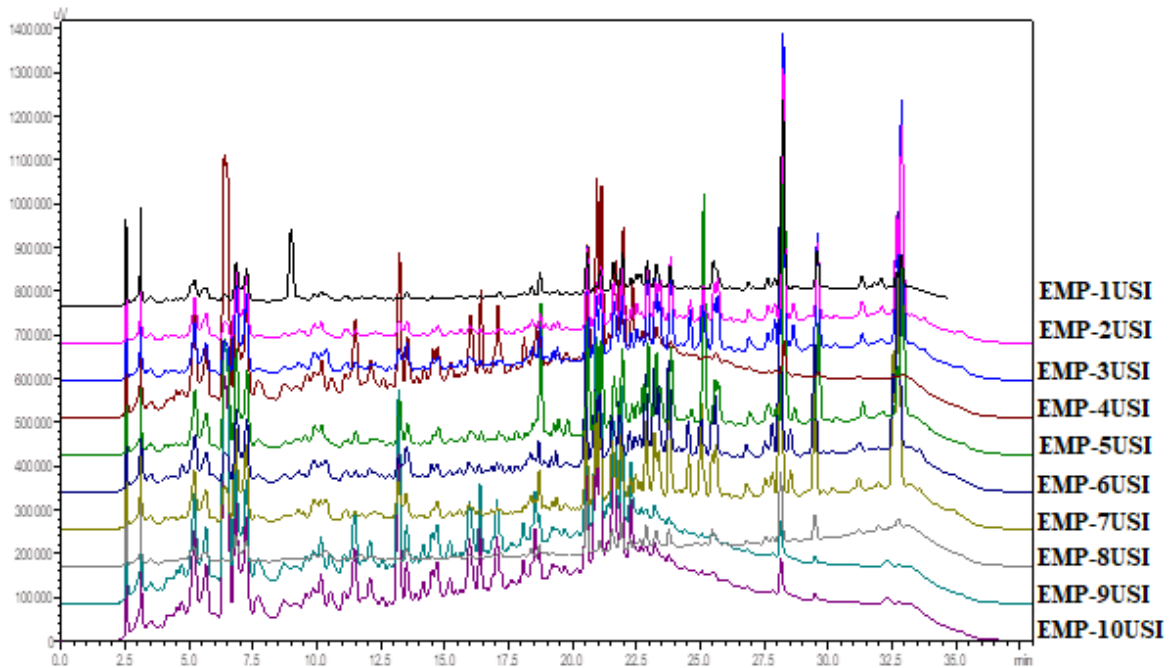


Figura 52- Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis por ultrassom EMP-1USI a EMP-10USI.

A **Figura 53** apresenta o cromatograma do extrato metanólico obtido por maceração dinâmica a temperatura ambiente da amostra de própolis marrom P1 de própolis P1(EMP-1MD). Neste extrato foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico e rosmarínico. Além de pinobanksina, canferol e canferide,

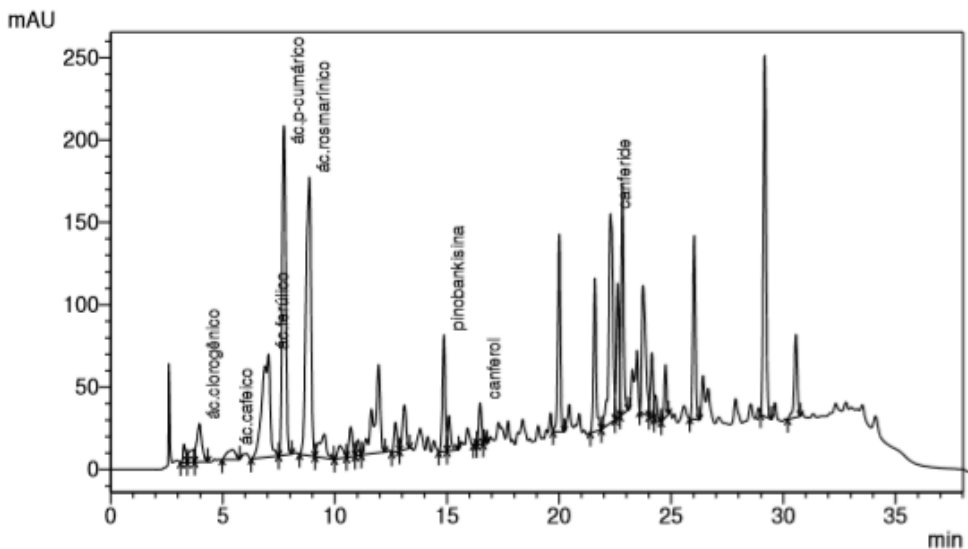


Figura 53– Cromatograma do extrato metanólico de própolis **EMP-1MD** obtidos por CLAE-DAD.

Nas **Tabelas 32 e 33** estão as concentrações das substâncias identificadas nos extratos etanólicos e metanólicos de própolis marrom, destacando-se os ácidos fenólicos como componentes majoritários.

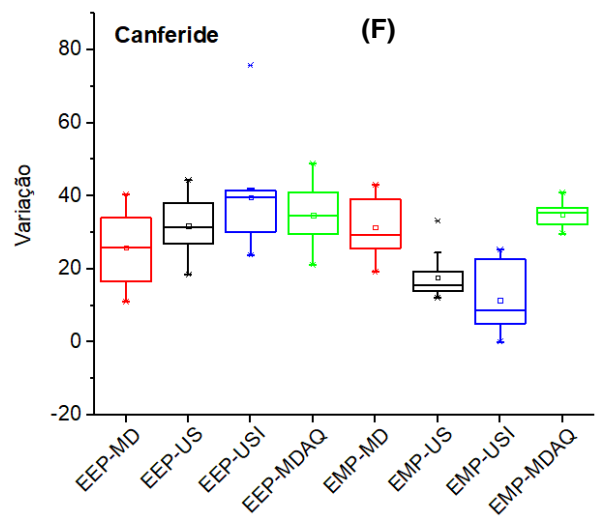
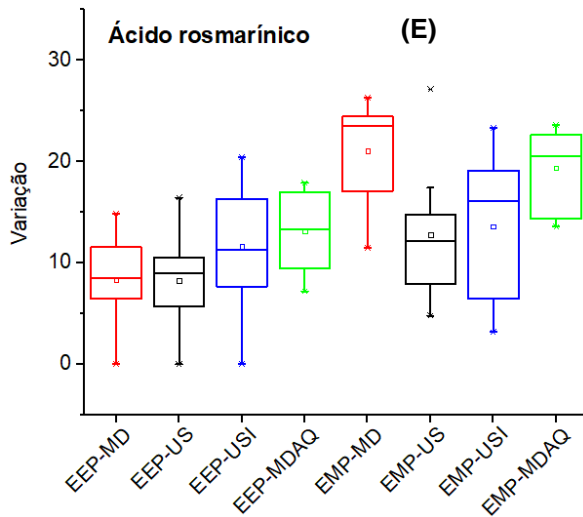
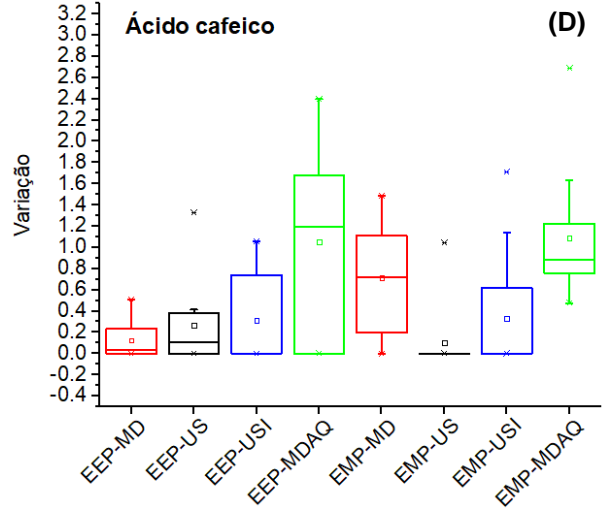
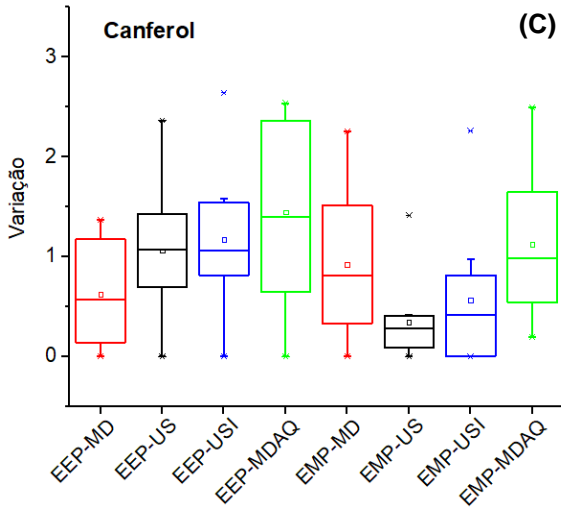
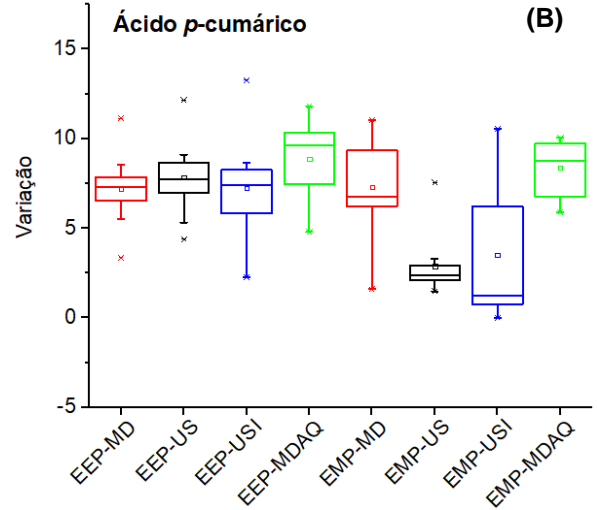
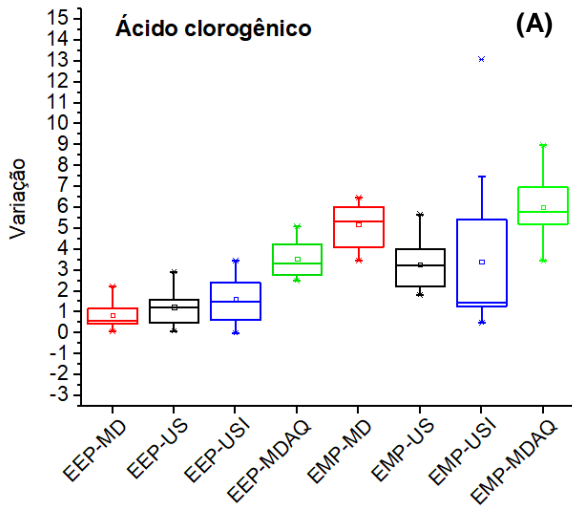
Tabela 32 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EEP (mg 100 mg⁻¹ de extrato).

	Ác. clorogênico	Ác. p-cumárico	Canferol	Ác. cafeico	Ác. rosmarínico	Canferide	Ác. Ferúlico	Pinobankisina
EEP-1MD	2,236 ± 0,275	8,541 ± 0,034	1,367 ± 0,005	0,066 ± 0,005	14,887 ± 0,061	40,523 ± 0,431	4,796 ± 0,030	5,830 ± 0,004
EEP-2MD	1,769 ± 0,215	7,372 ± 0,276	0,437 ± 0,067	0,249 ± 0,011	8,174 ± 0,028	26,968 ± 1,415	3,081 ± 0,024	4,052 ± 0,157
EEP-3MD	0,505 ± 0,106	7,438 ± 0,028	0,515 ± 0,041	-	9,062 ± 0,054	24,798 ± 0,512	0,719 ± 0,053	3,99 ± 0,026
EEP-4MD	0,488 ± 0,021	11,135 ± 0,033	1,331 ± 0,086	0,512 ± 0,001	11,500 ± 0,046	40,187 ± 2,354	2,191 ± 0,053	6,756 ± 0,041
EEP-5MD	0,443 ± 0,080	7,223 ± 0,005	0,631 ± 0,015	-	7,780 ± 0,001	23,207 ± 1,078	0,800 ± 0,005	3,262 ± 0,001
EEP-6MD	0,964 ± 0,004	5,516 ± 0,010	-	0,188 ± 0,003	4,486 ± 0,087	17,167 ± 0,001	0,412 ± 0,011	2,439 ± 0,005
EEP-7MD	0,646 ± 0,070	6,864 ± 0,083	1,124 ± 0,096	0,230 ± 0,025	8,885 ± 0,162	31,904 ± 0,984	1,464 ± 0,078	5,972 ± 0,073
EEP-8MD	0,085 ± 0,031	7,107 ± 0,017	0,187 ± 0,002	-	11,761 ± 0,044	28,189 ± 0,039	1,196 ± 0,092	3,776 ± 0,032
EEP-9MD	0,419 ± 0,049	3,359 ± 0,019	-	-	-	14,714 ± 0,583	1,266 ± 0,110	3,328 ± 0,195
EEP-10MD	0,970 ± 0,146	7,640 ± 0,164	0,672 ± 0,001	-	7,085 ± 0,511	11,047 ± 0,323	0,752 ± 0,031	4,510 ± 0,006
Média ± D.P.	0,853 ± 0,668	7,220 ± 1,980	0,617 ± 0,522	0,125 ± 0,171	8,362 ± 4,105	25,870 ± 9,949	1,668 ± 1,356	4,392 ± 1,376
EEP-1US	0,525 ± 0,025	7,740 ± 0,005	1,105 ± 0,040	0,366 ± 0,016	8,656 ± 0,190	37,063 ± 0,098	0,903 ± 0,065	5,551 ± 0,017
EEP-2US	1,240 ± 0,042	8,538 ± 0,060	1,041 ± 0,048	0,214 ± 0,008	9,293 ± 0,058	31,503 ± 1,046	1,415 ± 0,028	5,173 ± 0,006
EEP-3US	0,079 ± 0,015	7,529 ± 0,015	0,879 ± 0,006	-	6,888 ± 0,238	31,594 ± 0,709	2,128 ± 0,037	6,785 ± 0,081
EEP-4US	1,275 ± 0,054	12,147 ± 0,006	2,364 ± 0,010	1,330 ± 0,013	11,423 ± 0,249	44,297 ± 3,042	6,788 ± 0,012	10,413 ± 0,076
EEP-5US	0,440 ± 0,011	9,104 ± 0,033	1,216 ± 0,021	-	9,321 ± 0,019	29,568 ± 0,084	3,664 ± 0,022	4,589 ± 0,070
EEP-6US	0,888 ± 0,090	7,602 ± 0,039	0,871 ± 0,004	0,337 ± 0,006	2,025 ± 0,008	27,413 ± 0,360	1,315 ± 0,015	4,472 ± 0,003
EEP-7US	1,310 ± 0,064	7,717 ± 0,010	1,562 ± 0,000	0,415 ± 0,024	10,212 ± 0,021	41,290 ± 4,020	2,151 ± 0,049	8,168 ± 0,003
EEP-8US	1,189 ± 0,021	8,344 ± 0,005	1,382 ± 0,001	-	8,551 ± 0,427	31,529 ± 0,302	2,918 ± 0,002	4,941 ± 0,003
EEP-9US	2,911 ± 0,232	4,380 ± 0,119	-	-	-	25,006 ± 4,565	1,727 ± 0,123	4,438 ± 0,040
EEP-10US	2,429 ± 0,012	5,308 ± 0,032	0,176 ± 0,016	-	16,441 ± 0,079	18,459 ± 0,190	2,767 ± 0,027	3,225 ± 0,010
Média ± D.P.	1,229 ± 0,872	7,841 ± 2,094	1,060 ± 0,671	0,266 ± 0,412	8,281 ± 4,621	31,772 ± 7,619	2,578 ± 1,697	5,776 ± 2,128
EEP-1USI	0,681 ± 0,100	2,252 ± 0,049	0,757 ± 0,016	-	6,803 ± 0,125	23,812 ± 1,438	1,932 ± 0,046	2,635 ± 0,017
EEP-2USI	1,342 ± 0,008	13,258 ± 0,264	2,641 ± 0,122	0,908 ± 0,002	11,881 ± 0,024	75,742 ± 0,994	5,907 ± 0,213	15,804 ± 0,175
EEP-3USI	0,394 ± 0,015	6,347 ± 0,036	1,083 ± 0,000	-	9,565 ± 0,216	38,366 ± 1,433	4,295 ± 0,053	7,841 ± 0,487
EEP-4USI	0,002 ± 0,015	7,748 ± 0,015	0,943 ± 0,043	0,686 ± 0,004	7,984 ± 0,086	35,280 ± 0,368	3,312 ± 0,047	7,331 ± 0,015
EEP-5USI	1,766 ± 0,090	8,678 ± 0,029	1,044 ± 0,010	-	17,25 ± 0,014	40,945 ± 0,729	7,421 ± 0,095	7,579 ± 0,587
EEP-6USI	3,264 ± 0,054	6,742 ± 0,035	0,835 ± 0,084	1,058 ± 0,064	10,618 ± 0,110	31,655 ± 0,081	4,333 ± 0,083	5,628 ± 0,025
EEP-7USI	1,448 ± 0,055	7,098 ± 0,224	1,530 ± 0,009	0,489 ± 0,013	16,045 ± 0,424	42,089 ± 0,057	6,374 ± 0,053	9,996 ± 0,082
EEP-8USI	1,504 ± 0,178	7,904 ± 0,039	1,303 ± 0,005	-	15,865 ± 0,299	41,162 ± 0,154	6,797 ± 0,081	8,419 ± 0,484
EEP-9USI	2,114 ± 0,150	4,251 ± 0,055	-	-	-	25,538 ± 0,160	3,658 ± 0,058	6,609 ± 0,003
EEP-10USI	3,462 ± 0,262	8,139 ± 0,062	1,580 ± 0,059	-	20,437 ± 0,060	41,238 ± 0,363	7,500 ± 0,149	7,962 ± 0,043
Média ± D.P.	1,598 ± 1,129	7,242 ± 2,880	1,172 ± 0,684	0,314 ± 0,430	11,645 ± 5,998	39,583 ± 14,336	5,153 ± 1,910	7,980 ± 3,367
EEP-1MDAQ	2,665 ± 0,006	9,732 ± 0,020	0,613 ± 0,049	1,396 ± 0,012	14,506 ± 0,096	35,315 ± 0,071	8,990 ± 0,014	8,390 ± 0,001
EEP-2MDAQ	4,672 ± 0,329	9,617 ± 0,028	1,922 ± 0,040	1,464 ± 0,031	16,744 ± 0,243	40,169 ± 1,671	8,651 ± 0,087	7,325 ± 0,000
EEP-3MDAQ	2,783 ± 0,068	7,964 ± 0,007	1,190 ± 0,104	-	12,128 ± 0,044	32,315 ± 0,004	6,240 ± 0,026	6,554 ± 0,007
EEP-4MDAQ	4,115 ± 0,075	11,806 ± 0,049	2,536 ± 0,005	2,399 ± 0,040	17,894 ± 0,055	43,632 ± 0,007	10,691 ± 0,311	8,994 ± 0,019
EEP-5MDAQ	3,453 ± 0,017	10,176 ± 0,021	1,418 ± 0,002	1,529 ± 0,055	10,575 ± 0,049	33,657 ± 0,372	4,531 ± 0,037	7,725 ± 0,016
EEP-6MDAQ	2,807 ± 0,075	8,159 ± 0,074	0,657 ± 0,119	0,990 ± 0,065	8,483 ± 0,229	21,147 ± 0,447	6,704 ± 0,073	5,901 ± 0,529
EEP-7MDAQ	2,497 ± 0,000	5,983 ± 0,059	1,372 ± 0,021	0,613 ± 0,037	9,848 ± 0,465	31,827 ± 0,002	4,926 ± 0,079	7,563 ± 0,013
EEP-8MDAQ	5,089 ± 0,071	9,671 ± 0,042	2,399 ± 0,063	-	17,449 ± 0,356	48,881 ± 0,254	8,502 ± 0,084	8,698 ± 0,102
EEP-9MDAQ	3,206 ± 0,029	4,807 ± 0,005	-	-	7,182 ± 0,139	22,747 ± 0,311	5,47 ± 0,073	6,082 ± 0,006
EEP-10MDAQ	4,104 ± 0,179	10,805 ± 0,152	2,342 ± 0,138	2,145 ± 0,046	16,842 ± 0,081	36,705 ± 2,023	9,659 ± 0,542	10,543 ± 0,49
Média ± D.P.	3,539 ± 0,908	8,872 ± 2,165	1,445 ± 0,857	1,054 ± 0,885	13,165 ± 4,019	34,640 ± 8,542	7,436 ± 2,138	7,778 ± 1,434

Tabela 33 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EMP (mg 100 mg⁻¹ de extrato).

	Ác. clorogênico	Ác. p-cumárico	Canferol	Ác. cafeico	Ác. rosmarínico	Canferide	Ác. Ferúlico	Pinobankisina
EMP-1MD	5,116 ± 0,033	6,220 ± 0,019	0,841 ± 0,085	0,596 ± 0,028	23,844 ± 0,187	29,012 ± 0,228	9,478 ± 0,013	3,958 ± 0,097
EMP-2MD	6,316 ± 0,239	9,933 ± 0,049	2,256 ± 0,097	1,378 ± 0,031	24,118 ± 0,121	38,150 ± 0,755	14,983 ± 0,029	10,964 ± 0,107
EMP-3MD	5,343 ± 0,166	11,057 ± 0,059	1,272 ± 0,016	1,486 ± 0,017	25,357 ± 0,121	42,995 ± 1,721	15,354 ± 0,121	11,693 ± 0,015
EMP-4MD	5,303 ± 0,165	6,891 ± 0,116	0,782 ± 0,013	0,670 ± 0,056	23,873 ± 0,434	26,360 ± 2,335	9,994 ± 0,220	2,809 ± 0,031
EMP-5MD	3,442 ± 0,216	9,136 ± 0,024	-	0,990 ± 0,044	17,227 ± 0,027	34,426 ± 0,754	10,976 ± 0,130	10,259 ± 0,080
EMP-6MD	6,467 ± 0,199	6,627 ± 0,007	0,442 ± 0,010	1,023 ± 0,04	16,621 ± 0,083	23,617 ± 0,429	7,455 ± 0,054	3,114 ± 0,011
EMP-7MD	5,705 ± 0,253	8,823 ± 0,002	1,577 ± 0,060	0,260 ± 0,001	26,291 ± 0,024	42,093 ± 0,971	10,808 ± 0,009	7,085 ± 0,016
EMP-8MD	5,939 ± 0,160	6,203 ± 0,008	1,492 ± 0,088	-	23,121 ± 0,093	29,434 ± 0,007	9,637 ± 0,003	3,342 ± 0,033
EMP-9MD	4,116 ± 0,597	1,592 ± 0,020	-	-	11,493 ± 0,099	19,150 ± 0,018	3,275 ± 0,139	2,183 ± 0,036
EMP-10MD	4,096 ± 0,204	6,419 ± 0,020	0,546 ± 0,002	0,760 ± 0,008	18,88 ± 0,094	28,381 ± 0,024	7,483 ± 0,588	5,170 ± 0,071
Média ± D.P.	5,184 ± 1,010	7,290 ± 2,648	0,921 ± 0,727	0,716 ± 0,522	21,083 ± 4,781	31,362 ± 7,875	9,944 ± 3,551	6,058 ± 3,672
EMP-1US	3,351 ± 0,043	2,276 ± 0,006	0,276 ± 0,006	-	13,289 ± 0,122	15,389 ± 0,293	3,700 ± 0,038	1,22 ± 0,005
EMP-2US	4,462 ± 0,000	3,302 ± 0,000	0,296 ± 0,017	-	17,431 ± 0,040	17,649 ± 0,180	5,361 ± 0,090	1,407 ± 0,006
EMP-3US	3,168 ± 0,011	2,663 ± 0,015	0,12 ± 0,015	-	12,644 ± 0,037	14,583 ± 0,460	3,498 ± 0,055	1,46 ± 0,028
EMP-4US	3,243 ± 0,072	2,244 ± 0,026	0,405 ± 0,078	-	11,669 ± 0,091	16,113 ± 0,370	3,997 ± 0,103	1,032 ± 0,009
EMP-5US	1,820 ± 0,129	2,799 ± 0,024	-	-	7,924 ± 0,032	14,223 ± 0,264	2,188 ± 0,225	0,904 ± 0,010
EMP-6US	1,946 ± 0,025	1,946 ± 0,055	0,197 ± 0,003	-	4,783 ± 0,023	15,485 ± 0,339	1,482 ± 0,000	1,018 ± 0,014
EMP-7US	3,868 ± 0,155	2,526 ± 0,015	0,415 ± 0,003	-	13,899 ± 0,000	24,463 ± 0,006	4,318 ± 0,054	2,268 ± 0,02
EMP-8US	2,843 ± 0,012	2,169 ± 0,006	0,306 ± 0,020	-	11,05 ± 0,032	12,094 ± 0,085	3,395 ± 0,004	1,246 ± 0,028
EMP-9US	2,305 ± 0,076	1,471 ± 0,007	-	-	7,838 ± 0,040	12,787 ± 0,026	3,882 ± 0,031	1,329 ± 0,002
EMP-10US	5,662 ± 0,042	7,532 ± 0,091	1,415 ± 0,051	1,046 ± 0,061	27,135 ± 0,485	33,157 ± 2,035	12,086 ± 0,694	4,628 ± 0,062
Média ± D.P.	3,267 ± 1,178	2,893 ± 1,704	0,343 ± 0,405	0,105 ± 0,331	12,766 ± 6,195	17,594 ± 6,452	4,391 ± 2,909	1,651 ± 1,112
EMP-1USI	0,494 ± 0,074	0,373 ± 0,002	0,342 ± 0,002	-	7,641 ± 0,124	0,172 ± 0,130	1,000 ± 0,023	0,302 ± 0,009
EMP-2USI	1,126 ± 0,048	0,891 ± 0,001	0,364 ± 0,008	-	16,84 ± 0,053	6,589 ± 0,294	5,84 ± 0,037	1,205 ± 0,053
EMP-3USI	1,308 ± 0,019	1,239 ± 0,004	0,517 ± 0,089	-	15,457 ± 0,271	7,256 ± 0,043	5,272 ± 0,062	1,110 ± 0,098
EMP-4USI	1,674 ± 0,046	10,554 ± 0,333	2,262 ± 0,146	-	22,232 ± 1,923	22,874 ± 0,351	10,833 ± 0,106	8,940 ± 0,047
EMP-5USI	1,310 ± 0,000	4,743 ± 0,208	0,977 ± 0,031	-	18,110 ± 1,120	11,812 ± 0,155	7,271 ± 0,035	2,991 ± 0,003
EMP-6USI	1,468 ± 0,199	0,980 ± 0,009	0,463 ± 0,099	-	5,242 ± 0,275	7,675 ± 0,086	2,972 ± 0,032	0,989 ± 0,020
EMP-7USI	1,410 ± 0,044	1,213 ± 0,002	0,762 ± 0,031	-	6,845 ± 0,047	9,524 ± 0,210	2,902 ± 0,030	2,341 ± 0,000
EMP-8USI	7,478 ± 0,011	-	-	1,142 ± 0,145	3,173 ± 0,038	-	0,637 ± 0,081	0,780 ± 0,025
EMP-9USI	4,753 ± 0,081	4,807 ± 0,201	-	1,71 ± 0,140	17,143 ± 0,881	22,695 ± 0,861	8,176 ± 0,262	10,114 ± 0,071
EMP-10USI	13,090 ± 0,590	10,38 ± 0,494	-	0,447 ± 0,023	23,317 ± 2,635	25,238 ± 0,248	10,598 ± 0,528	11,762 ± 0,163
Média ± D.P.	3,411 ± 4,019	3,518 ± 4,026	0,500 ± 0,736	0,330 ± 0,609	13,600 ± 7,269	11,384 ± 9,217	5,550 ± 3,680	4,053 ± 4,410
EMP-1MDAQ	6,432 ± 0,298	8,442 ± 0,144	2,495 ± 0,013	0,880 ± 0,080	22,939 ± 0,468	36,498 ± 2,727	11,964 ± 0,459	8,882 ± 0,161
EMP-2MDAQ	5,147 ± 0,120	9,396 ± 0,028	1,125 ± 0,074	0,892 ± 0,014	22,541 ± 0,146	36,656 ± 0,169	10,040 ± 0,071	8,335 ± 0,042
EMP-3MDAQ	3,437 ± 0,133	9,720 ± 0,057	2,142 ± 0,164	1,631 ± 0,042	13,554 ± 0,219	34,598 ± 0,606	8,0180 ± 0,565	9,387 ± 0,369
EMP-4MDAQ	8,967 ± 0,390	10,052 ± 0,038	1,076 ± 0,126	0,811 ± 0,021	22,591 ± 0,202	32,944 ± 0,412	10,511 ± 0,045	8,115 ± 0,005
EMP-5MDAQ	5,238 ± 0,246	9,720 ± 0,021	0,518 ± 0,041	1,092 ± 0,039	19,410 ± 0,040	37,191 ± 0,113	8,982 ± 0,007	8,712 ± 0,082
EMP-6MDAQ	7,120 ± 0,244	8,348 ± 0,022	0,194 ± 0,018	0,972 ± 0,051	14,306 ± 0,028	32,459 ± 0,081	7,865 ± 0,020	5,124 ± 0,037
EMP-7MDAQ	5,351 ± 0,132	6,923 ± 0,004	0,794 ± 0,050	0,598 ± 0,001	18,930 ± 0,055	35,975 ± 0,009	7,930 ± 0,007	8,195 ± 0,125
EMP-8MDAQ	5,520 ± 0,024	6,218 ± 0,023	0,883 ± 0,130	0,475 ± 0,006	21,632 ± 0,145	31,598 ± 0,014	8,578 ± 0,084	5,836 ± 0,071
EMP-9MDAQ	6,102 ± 0,037	5,891 ± 0,006	0,548 ± 0,023	2,692 ± 0,038	14,343 ± 0,076	29,660 ± 0,001	9,899 ± 0,008	7,270 ± 0,026
EMP-10MDAQ	6,909 ± 0,320	9,037 ± 0,025	1,481 ± 0,048	0,838 ± 0,017	23,608 ± 0,031	40,995 ± 0,105	10,555 ± 0,017	7,592 ± 0,004
Média ± D.P.	6,022 ± 1,476	8,375 ± 1,522	1,126 ± 0,729	1,088 ± 0,643	19,385 ± 3,961	34,857 ± 3,290	9,434 ± 1,377	7,745 ± 1,349

Na Figura 54 estão os diagramas de caixa (*box plot*) comparando a variação dos conteúdos das substâncias identificadas e quantificadas utilizando diferentes métodos de extração e os solventes etanol e metanol.



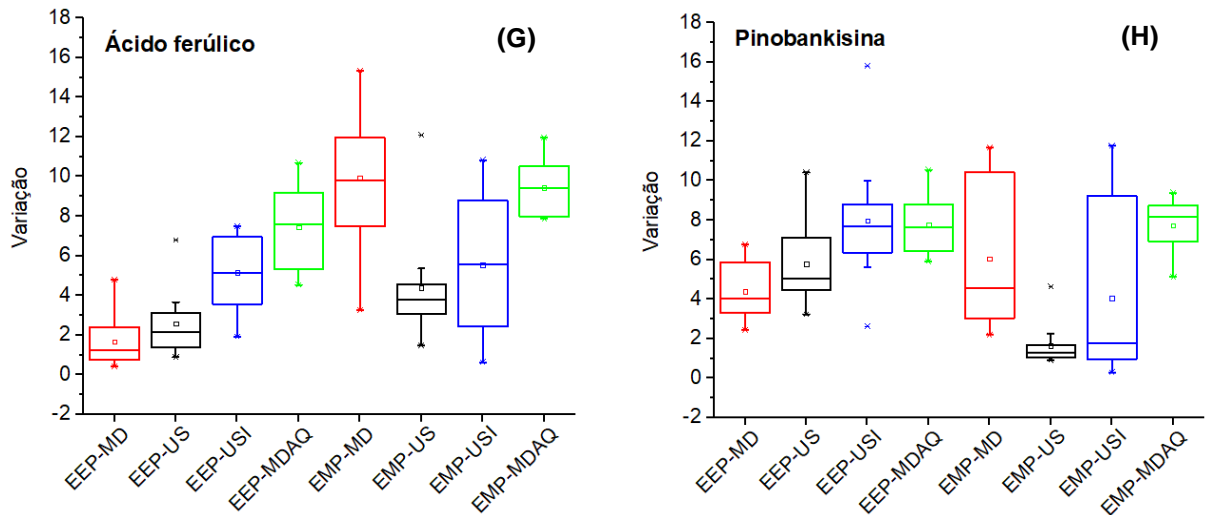


Figura 54. Diagramas de caixa (*box plots*) comparando a variação do teor de cada substância fenólica quantificada para cada tipo de extração, sendo: (A) ácido clorogênico, (B) ácido *p*-cumárico, (C) canferol, (D) ácido cafeico, (E) ácido rosmarínico, (F) canferide, (G) ácido ferúlico e (H) pinobankisina.

Existe uma diferença quanto a concentração das substâncias identificadas nos extratos de própolis marrom, que pode ser consequência da metodologia empregada e do tipo de solvente aplicados na extração. A extração utilizando a maceração dinâmica com aquecimento (50°C) e o metanol como solvente permitiu a obtenção de maior quantidade das substâncias quantificadas em mg.100 mg⁻¹ de extrato: ácido clorogênico (6,022 ± 1,476), ácido. cafeico (1,088 ± 0,643), ácido ferúlico (9,434 ± 1,377), ácido. *p*-cumárico (8,375 ± 1,522), ácido rosmarínico (19,385 ± 3,961), pinobankisina (7,745 ± 1,349), canferol (1,126 ± 0,729), canferide (34,857 ± 3,290). Os valores de concentrações indicados são uma média estabelecida entre os dez extratos EMP-MDAQ.

O perfil quantitativo demonstrou que a extração por (MDQA) extraiu maior quantidade de substâncias fenólicas para os EEP; já para os EMP foi a extração por (MD). Dentre as substâncias fenólicas quantificadas nos extratos de própolis marrom a que obteve maior valor foi o canferide tanto para os extratos EEP (EEP-USI 39,58 ± 14,33 mg100mg⁻¹ de extrato) quanto para os EMP (EMP-MDAQ 34,86 ± 3,29 m100mg⁻¹ de extrato). O que pode caracterizar o canferide como um biomarcador das amostras de própolis estudadas nesse trabalho.

Comparando o perfil quantitativo dos extratos de própolis marrom estudada nesse trabalho com os extratos de própolis verde analisados por Salgueiro (2016) observa-se que a própolis verde possui um maior teor em substâncias fenólicas. Na tabela 34 estão o conteúdo de substâncias quantificadas da amostra de extratos de própolis marrom (EEP-1MD e EMP-

1MD) e do extrato de própolis verde (EEP-2MD e EMP-2MD) estudada por Salgueiro (2016), pelo método de extração por maceração dinâmica (MD) e com os solventes etanol e metanol, assim como o CE_{50} dessas substâncias.

Tabela 34 - Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos EEP e EMP da própolis marrom *versus* própolis verde ($mg/100\ mg^{-1}$ de extrato).

Substâncias	$CE_{50}(\mu g\ mL^{-1})$	EEP1MD- marrom	EMP1MD - marrom	EEP2MD- verde	EMP2MD- verde
Ácido clorogênico	5,85	2,236	5,116	0,215	-
Ácido cafeico	9,3	0,066	0,596	0,08	0,186
Ácido ferúlico	24,71	4,796	9,478	0,714	2,629
Ácido <i>p</i> -cumárico	39,31	8,541	6,22	1,129	2,722
Ácido rosmarínico	> 20	14,887	23,844	1,927	6,864
Hesperidina	106,55	-	-	0,171	0,213
Naringenina	>1000	-	-	0,36	-
Pinobanksina	>500	5,83	3,958	0,482	0,562
Canferol	6,1	1,367	0,841	0,232	0,622
Canferide	>10	40,523	29,012	2,644	4,621
Artepillin C	7,38	-	-	1,568	8,982
Pinostrombina	>500	-	-	0,205	0,805

A tabela 34 mostra que o extrato de própolis verde EEP2 apresenta um perfil mais “rico” em substâncias fenólicas quando comparados ao extrato de própolis marrom EEP1. A avaliação da atividade antioxidante (expressa como CE_{50}) das substâncias fenólicas identificadas nos extratos de própolis ajuda correlacionar a contribuição para o potencial antioxidante dos extratos. Como já foi descrito anteriormente os extratos de própolis verde, estudados por Salgueiro (2016), de modo geral, apresentaram melhor capacidade antioxidante quando comparados aos extratos de própolis marrom o que pode estar relacionado a maior quantidade substâncias identificadas e quantificadas presentes na própolis verde assim como o CE_{50} dessas substâncias, como por exemplo o biomarcador Artepillin C ($CE_{50}= 7,38\ \mu g\ mL^{-1}$).

Fernandes-Silva e colaboradores (2013) avaliaram seis amostras de própolis brasileira dos Estados de Minas Gerais e Paraná que foram analisadas para identificar e determinar os constituintes químicos (CG-EM e LC-EM) presentes nas amostras. Todas as amostras continham substâncias característicos da própolis verde, mas as amostras de Minas Gerais apresentaram maiores teores de fenilpropanoides prenilados e ácidos cafeoilquínicos.

Canferide e dois outros flavonoides estavam entre os principais constituintes das amostras de Minas Gerais. Luteolina 5-*O*-metil éter foi detectada apenas em amostras do Paraná.

Machado e colaboradores (2016b) analisaram a composição química e a atividade biológica de uma amostra de própolis amarela de Mato Grosso do Sul que foi comparada com as própolis brasileiras verde, marrom e vermelho e com uma amostra de própolis amarela de Cuba. Um total de vinte e nove substâncias conhecidas foram identificados nas própolis brasileira verde, vermelha e marrom e na própolis amarela cubana. Todos estas substâncias foram previamente identificadas na própolis e correspondem a substâncias fenólicas, como derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, flavonoides e compostos fenólicos prenilados.

Em estudo recente Waller e colaboradores (2017) analisaram amostras de própolis de Pelotas/RS, frente a cepas resistentes de *Sporothrix brasiliensis* isoladas de gatos e cachorros. A análise química revelou um maior conteúdo fenólicos totais, em que 17 substâncias foram detectadas, sendo que as substâncias que mais prevaleceram foram o ácido *p*-cumárico, rutina, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido cafeico.

Recentemente, um trabalho de comparação química e biológica (atividade antioxidante) foi realizado utilizando extratos etanólicos e supercrítico de própolis vermelha (2 amostras do Nordeste – Alagoas e Sergipe), própolis marrom (3 amostras do Sul- Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná) e a própolis verde brasileira (3 amostras do Sul e Sudeste - Paraná e Minas Gerais). Além disso, a quantificação de artepilin C e ácido cumárico nas amostras demonstrou que todas as própolis verde e marrom de Paraná e Santa Catarina apresentaram artepilin C, porém em concentrações menores do que as observadas em própolis verdes brasileiras (MACHADO *et al*, 2016a).

Para uma melhor interpretação sobre o comportamento dos extratos quanto ao efeito do solvente extrator e o método de extração foi realizado um ACP entre os extratos obtidos EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI, EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI. Todos os extratos, EEP e EMP apresentaram um perfil químico semelhante quando comparados em função de substâncias identificadas por CLAE-DAD, assim foi criada uma matriz utilizando como variáveis as concentrações de cada substância quantificada em cada extrato. Os conjuntos de dados experimentais utilizados para análise exploratória ACP permitiu a construção de um gráfico de *scores* (**Figura 55**).

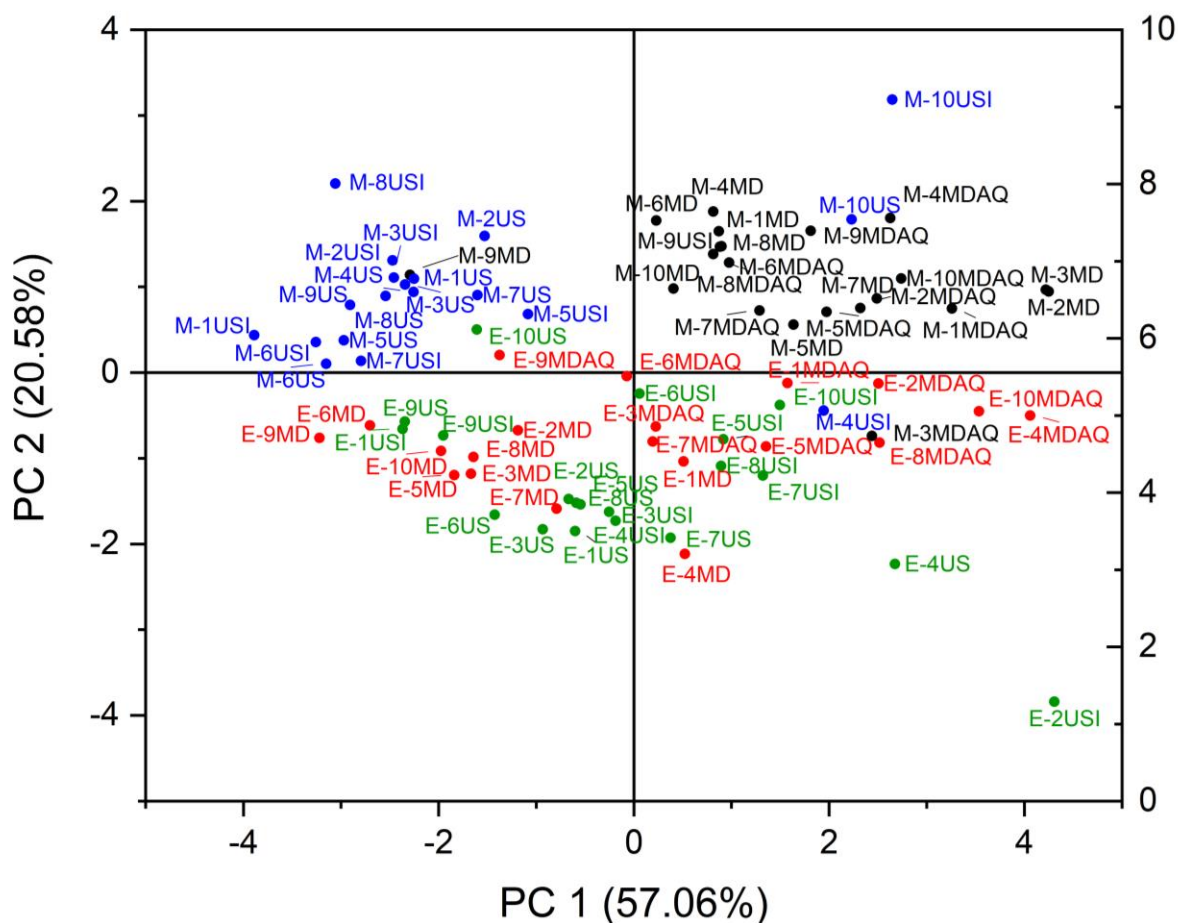


Figura 55 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos de própolis marrom (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI) e metanólicos de própolis marrom (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI).

A **Figura 55** apresenta o gráfico de *scores* que permite a visualização da separação das amostras em dois grupos. Os extratos de própolis metanólicos de própolis marrom (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI) estão em geral localizados na parte superior, enquanto os extratos etanólicos de própolis marrom (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI) estão em geral localizados na parte inferior.

No caso dos extratos metanólicos de própolis marrom observou-se a formação de dois subgrupos: um grupo com os extratos EMP-MD e EMP-MDAQ e outro grupo com extratos EMP-US e EMP-USI. Já para os extratos etanólicos houve agrupamento dos extratos obtidos por maceração dinâmica (EEP-MD) no terceiro quadrante e dos extratos obtidos por maceração dinâmica com aquecimento (EEP-MDAQ) no quarto quadrante.

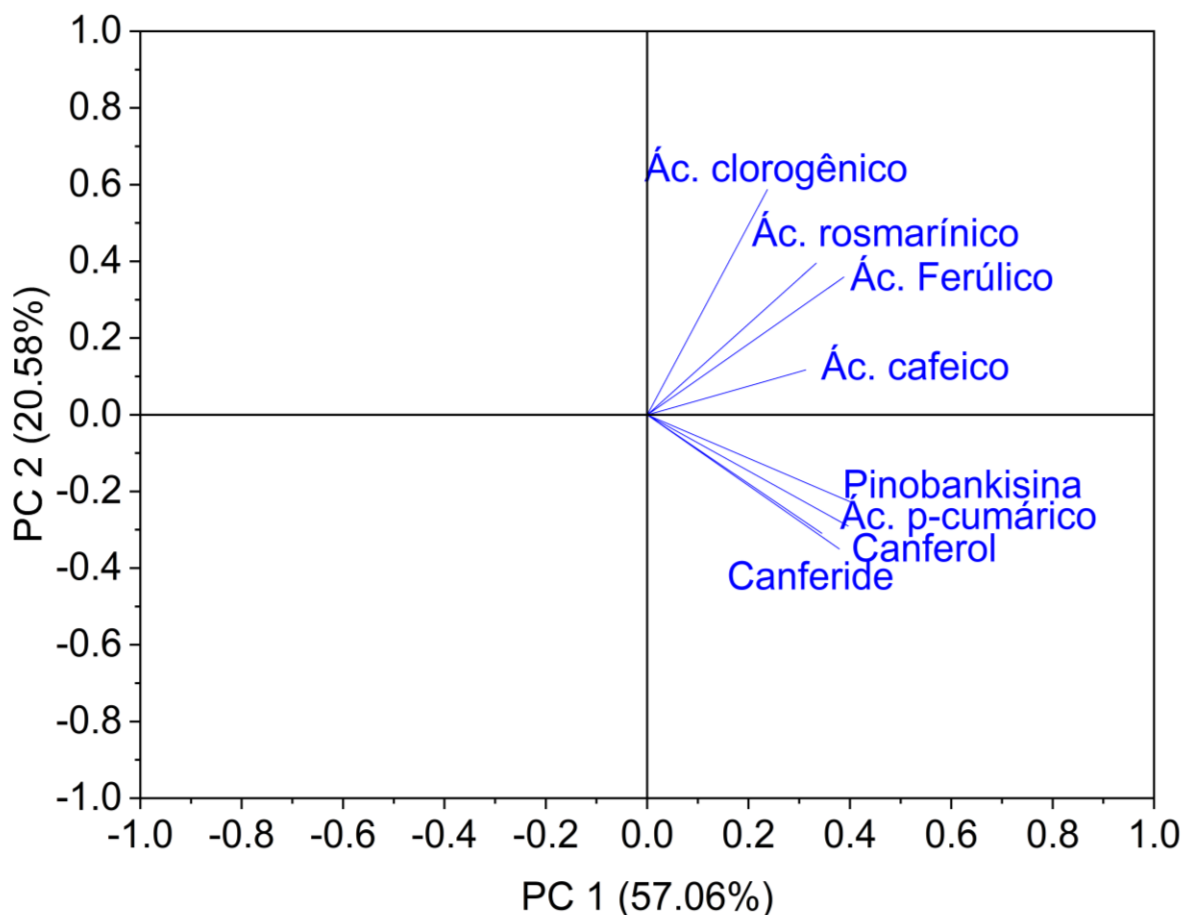


Figura 56 - Gráfico de *loadings* de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos (EEP-MD, EEP-MDAQ, EEP-US, EEP-USI) e metanólicos (EMP-MD, EMP-MDAQ, EMP-US, EMP-USI).

Pelo gráfico de *loadings* (**Figura 56**) observou-se que as concentrações do ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido ferúlico e ácido cafeico foram as variáveis que mais exerceram um poder discriminante para a separação dos extratos metanólicos de própolis marrom (EMP). Já para os extratos etanólicos de própolis marrom (EEP) as concentrações da pinobankisina, ácido *p*-cumárico, canferol e canferide tiveram maior influência na discriminação desses extratos.

O gráfico de *loadings* (**Figura 56**) indicou que os extratos metanólicos (EMP), no geral, favoreceram a extração dos ácidos fenólicos. E a extração foi melhor utilizando os métodos: maceração dinâmica em temperatura ambiente (MD) e maceração dinâmica com aquecimento à 50 °C (MDAQ). Então provavelmente o aquecimento não fez diferença para extrair os ácidos fenólicos.

Já os extratos etanólicos (EEP) favoreceram a extração do ácido *p*-cumárico e os flavonoides. Neste caso o aquecimento fez diferença para extrair o ácido *p*-cumárico e os flavonoides. O aquecimento melhorou a solubilidade dos flavonoides e do ácido *p*-cumárico (substâncias menos polares comparadas aos outros ácidos fenólicos), favorecendo a extração, por isso o método de extração por maceração dinâmica com aquecimento à 50 °C (MDAQ) teve melhor resultado do que maceração dinâmica em temperatura ambiente (MD) se separando no gráfico de *scores*.

A análise exploratória dos dados ACP se mostrou uma ferramenta útil na obtenção de informações sobre a metodologia extrativa e os solventes usados na extração da própolis bruta. Através da análise dos gráficos de loadings das amostras foi possível estabelecer relações entre metodologia/solvente extrator e as substâncias identificadas e quantificadas nos extratos.

5.7. Atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo com importância clínica por colonizar a pele e mucosas, sendo frequentemente causador de infecção em feridas (HADDAD KASHANI *et al*, 2018) Devido a crescente preocupação com a resistência antibiótica desenvolvida por bactérias, a busca de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem recebido especial atenção.

Por uma questão de tempo e disponibilidade apenas dos extratos etanólicos de própolis (EEP-MD) foram avaliados e se mostraram capazes em promover a inibição do crescimento de *S. aureus* no teste de difusão em ágar (**Tabela 35**). O percentual de inibição foi semelhante entre as amostras. Portilho e colaboradores (2013) obtiveram halos de 10 cm em média, enquanto De Araújo e colaboradores (2011) obtiveram halos de inibição próximos aos encontrados no presente trabalho, entretanto, em concentrações de 50 mg. mL⁻¹ e volume de amostragem de 10µL.

Tabela 35- Médias dos diâmetros dos halos de inibição de extratos etanólicos de própolis marrom extratos etanólicos por maceração dinâmica (EEP-MD) de própolis marrom ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *S. aureus* e a percentagem relativa ao antibiótico ampicilina.

Amostras	Média dos halos (mm)	Inibição (%)
EEP-1	$17,0 \pm 0,00$	43,8
EEP-2	$16,3 \pm 0,06$	43,8
EEP-3	$16,7 \pm 0,06$	43,8
EEP-4	$16,7 \pm 0,06$	41,2
EEP-5	$15,7 \pm 0,06$	41,2
EEP-6	$13,7 \pm 0,06$	36,1
EEP-7	$16,0 \pm 0,00$	41,2
EEP-8	$15,0 \pm 0,00$	38,7
EEP-9	$15,3 \pm 0,06$	41,2
EEP-10	$14,3 \pm 0,06$	38,7
Ampicilina	$38,8 \pm 1,44$	100
Solvente	Sem halo	-

Machado *et al* (2016) avaliaram os extratos de própolis verde, vermelha e marrom contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e mostraram maior atividade contra a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) do que contra a Gram negativa (*E. coli*).

Estão disponíveis na literatura diversos trabalhos relatando a atividade antimicrobiana da própolis frente cepas de *S. aureus*, tendo estes, em semelhança aos encontrados neste trabalho, resultados positivos para a inibição do crescimento bacteriano desta bactéria (PROBST *et al.*, 2011; MONZOTE *et al.*, 2012; BARBOSA, 2014; BITTENCOURT *et al.*, 2015).

A fim de comparar os resultados obtidos neste trabalho, utilizou-se os resultados conforme avaliado por Salgueiro (2016) para a atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* para os extratos etanólicos de própolis verde (**Figura 57**)

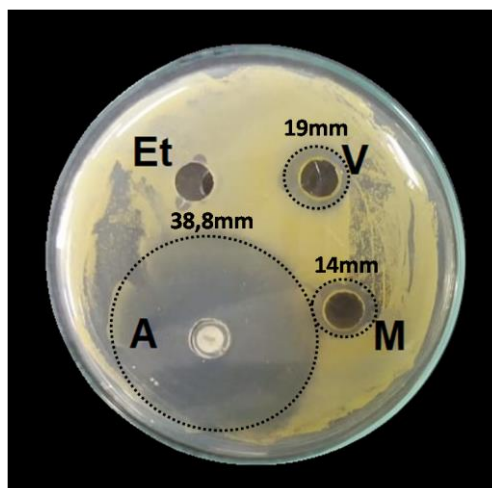


Figura 57. Halos de inibição (método de difusão em ágar): extrato etanólico de própolis verde (V) ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$), extrato etanólico de própolis marrom (M) ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$), solvente (Et-Etanol) e o antibiótico (A-ampicilina).

Na **Figura 58** está apresentado uma comparação do percentual de inibição dos extratos etanólicos de própolis marrom com os extratos etanólicos de própolis verde percebe-se que em média os valores são próximos variando de $37,62\pm 5,98\%$ para os extratos etanólicos de própolis verde e $40,46\pm 2,78\%$ para os extratos etanólicos de própolis marrom (EEP-MD).

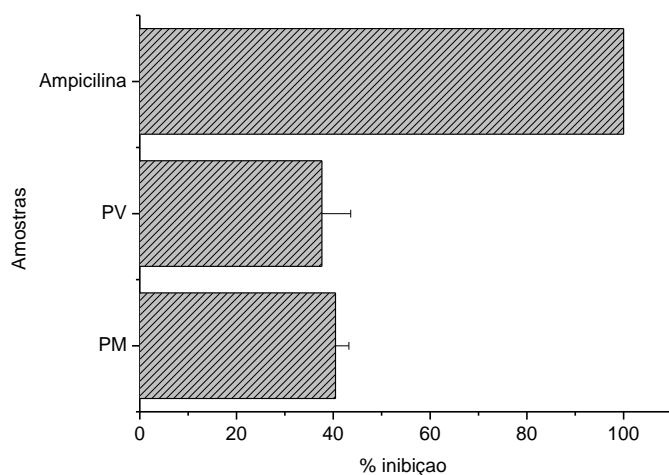


Figura 58. Gráfico de comparação do percentual de inibição própolis marrom (PM) versus própolis verde (PV).

Para verificar se foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças das médias dos halos de inibição da própolis verde e marrom foi realizado o teste ANOVA (Tabela 36).

Tabela 36- ANOVA realizado com os rendimentos dos extratos.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,08297	1	0,08297	2,88	0,10505	4,35
Dentro dos grupos	0,575667	20	0,028783			
Total	0,658636	21				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Conforme mostrado na Tabela 36, não houve diferença significativa entre as médias dos halos de inibição de acordo com o tipo de própolis (verde e marrom), já que $F: 2,88 < F_{\text{crítico}}: 4,35$, $p > 0,05$. Portanto, ambos os tipos de própolis apresentaram características semelhantes quanto ao teste de atividade antimicrobiana realizado. Também pode ser observado pela Figura 59 (diagrama de caixa) que houve pouca variação entre as médias dos halos dos extratos etanólicos.

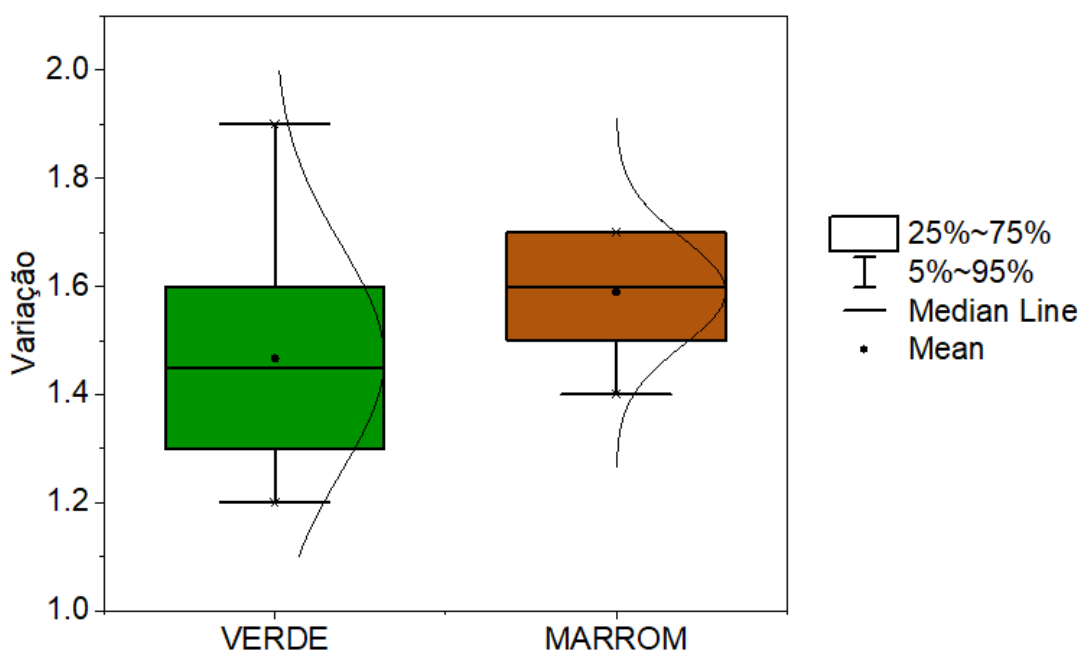


Figura 59- Diagrama de caixa (*box plot*) comparando as médias dos halos de inibição das amostras de própolis verde e marrom.

A atividade antimicrobiana de extratos de própolis é frequentemente relacionada ao seu conteúdo fenólico (TORRES *et al*, 2018; SOUSA *et al*, 2016). Segundo Sousa e colaboradores (2016) as substâncias fenólicas são capazes de interferir na estrutura e no funcionamento das membranas de bactérias, tornando-as mais suscetíveis à permeabilidade de prótons, resultando a morte celular por perda do material citoplasmático.

Alguns estudos têm demonstrado que substâncias antioxidantes podem contribuir para o aumento da oxidação (funcionando como pró-oxidantes) na presença de alguns íons metálicos e radicais fenóxidos, produzindo espécies como O_2 e H_2O_2 (EGHBALIFERIZ *et al.*, 2016), que podem ser responsáveis pelo efeito antimicrobiano de extratos com elevada capacidade antioxidante.

Baseando-se nos resultados obtidos em diferentes estudos (YU, 2015; CARDOSO, 2016; HARFOUCHT *et al*, 2017, SELVARAJ *et al*, 2018) pode-se sugerir que a própolis tenha valor clínico no combate a infecções; propriedade biológica de grande importância na atualidade, onde a emergência de bactérias multirresistentes tem limitado, consideravelmente, a eficiência dos fármacos antibacterianos usuais, gerando assim, uma necessidade para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (DJEUSSI,2013).

A própolis torna-se potencialmente interessante no contexto da resistência bacteriana por haver variações na composição química de acordo com a região em que é coletada e com a variabilidade genética das abelhas (MENEZES,2005), uma vez que essas diferenças estruturais lhe conferem atividades bacterianas distintas, dificultando o surgimento de mecanismos de resistência por parte das bactérias (WOJTYCZKA, 2013).

5.8. Caracterização dos hidrogéis

Foi utilizado o extrato etanólico de própolis verde obtido pelo método extrativo de maceração dinâmica em temperatura ambiente avaliado por Salgueiro (2016) para a impregnação dos hidrogéis de NaCMC. Como relatado na literatura os extratos de própolis verde são mais ricos em substâncias polifenólicas comparados aos extratos de própolis marrom, por este motivo foi escolhido o extrato de própolis verde que já tinha sido estudado e caracterizado previamente por Salgueiro (2016).

Os hidrogéis de NaCMC sintetizados apresentaram aspecto de filme levemente rugoso, maleável e flexível. Quando os mesmos foram submetidos à impregnação dos extratos etanólicos de própolis verde (EEP-MD) apresentaram aspectos mais rígidos (**Figura 60**).

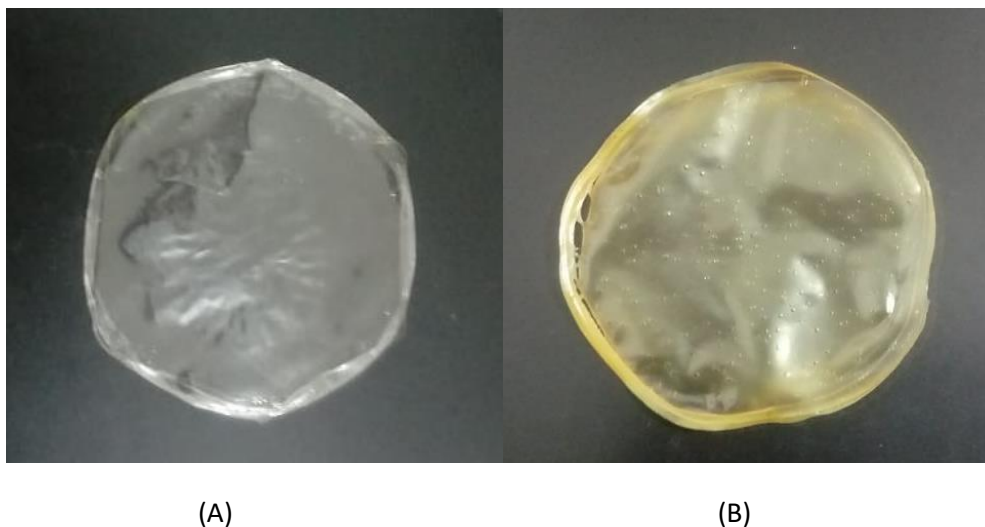


Figura 60. Filmes de NaCMC (A); Filme de NaCMC impregnados com extrato de própolis (B).

Na avaliação de membranas poliméricas preparadas com NaCMC com e sem extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) Basílio (2018) observou macroscopicamente que apresentaram flexibilidade e coloração adequadas, isto é, as membranas sem a presença do EEPV apresentaram transparência, o que indica uma homogeneidade na distribuição das partículas do extrato por toda a membrana.

Soares (2019) obteve filmes de hidrogéis de NaCMC com flexibilidade, transparência e capacidade de incorporação de agentes para administração e liberação de fármacos, como óleos essenciais e extratos.

Os resultados do teste do grau de intumescimento dos filmes de NaCMC e do filme impregnado com extrato de própolis estão dispostos na **figura 61**.

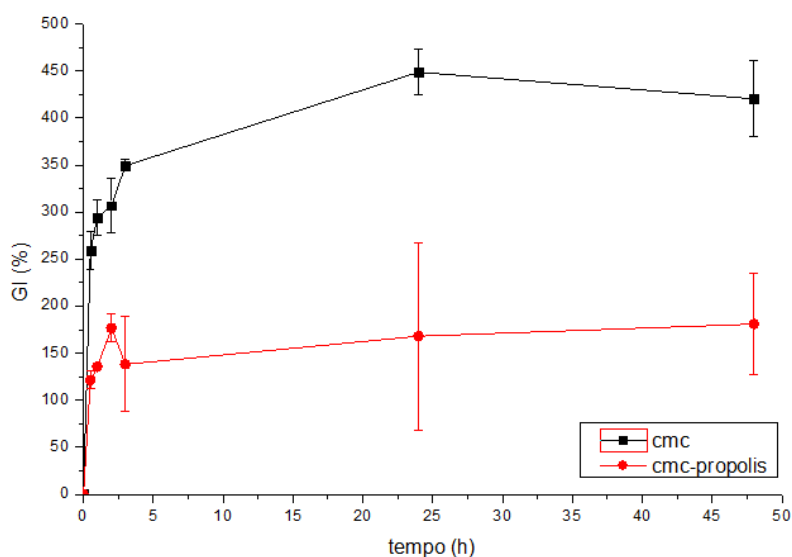


Figura 61 - Grau de intumescimento dos filmes obtidos

Quanto maior o grau de intumescimento maior é a capacidade do filme em absorver fluidos. Pode-se observar no gráfico acima que o filme de Na-CMC tem um maior grau de intumescimento comparado ao filme impregnado com extrato etanólico de própolis. Os grupos hidroxilas formam ligações de hidrogênio com as hidroxilas do ácido cítrico que foi utilizado como reticulante e os grupos carboxila na Na-CMC, aumentando consideravelmente a sensibilidade às moléculas de água na matriz polimérica, fazendo a Na-CMC ser mais hidrossolúvel (ALMASI, 2010)

Segundo Miranda & Carvalho (2011) o intumescimento, bem como a solubilidade são maiores conforme existam domínios hidrofílicos na molécula do polímero (MIRANDA & CARVALHO, 2011).

O intumescimento de polímeros hidrofílicos como a NaCMC pode ser atribuído a ruptura de ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero. Quando a água penetra, insere-se nas ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias poliméricas adjacentes. À medida que aumentam as interações água-polímero as forças de interação entre as cadeias poliméricas diminuem. A água que penetra no sistema preenche os espaços entre as cadeias poliméricas e difundem-se para as regiões mais densas do polímero, “forçando as restantes cadeias do polímero a se separar. Consequentemente, as cadeias ganham liberdade rotacional e começam a ocupar mais espaço. Isso explica o grau de intumescimento apresentado pela NaCMC. (SILVA, 2016)

O filme impregnado com extrato etanólico de própolis verde (EEP-MD) possui menor grau de intumescimento, o que pode ser explicado pelo fato do extrato estar preenchendo os poros do polímero, uma vez que o extrato etanólico de própolis é bastante resinoso e pode estar formando uma barreira hidrofóbica que dificulta a absorção de umidade pelos poros do polímero o que promove seu menor grau de intumescimento.

Outro fato que pode explicar o menor grau de intumescimento decorre que o extrato de própolis, rico em substâncias fenólicas, pode estar formando ligações na cadeia polimérica da NaCMC e, assim, contribuir para a reticulação do polímero dificultando a expansão da NaCMC pela água.

Segundo Fiori (2014), quanto mais flexíveis estiverem as cadeias, maior será a retenção hidrofílica. O que pode explicar também o menor grau de intumescimento dos filmes impregnados de extrato de própolis, uma vez que após a impregnação dos extratos os filmes poliméricos ficaram menos flexíveis, o que pode ter ajudado a dificultar a permeação de água.

Um baixo intumescimento da matriz polimérica permite uma liberação mais lenta do princípio ativo (OSHIRO JUNIOR, 2014), o que é uma boa característica para filmes poliméricos utilizados no tratamento de feridas.

Soares (2019) observou que o grau de intumescimento dos filmes de hidrogéis de NaCMC foi maior na primeira hora apresentando um ganho de massa de 30%. Os filmes de hidrogéis de NaCMC apresentam hidrofiliabilidade, o que é uma característica importante quando se almeja obter hidrogel para curativo.

Oliveira *et al* (2017) observaram resultados semelhantes a este trabalho utilizando blendas de hidrogéis de PVA-NaCMC incorporados a própolis. Oliveira *et al* (2017) observaram que a própolis nas amostras de PVA-NaCMC pode estar localizada entre as cadeias de polímeros e pode ocupar parcialmente os poros. No último caso, há menos espaço disponível para ocupação da água quando as amostras são imersas em meio aquoso.

Os resultados para perda de massa e fração gel dos filmes estão dispostos na **figura 62**.

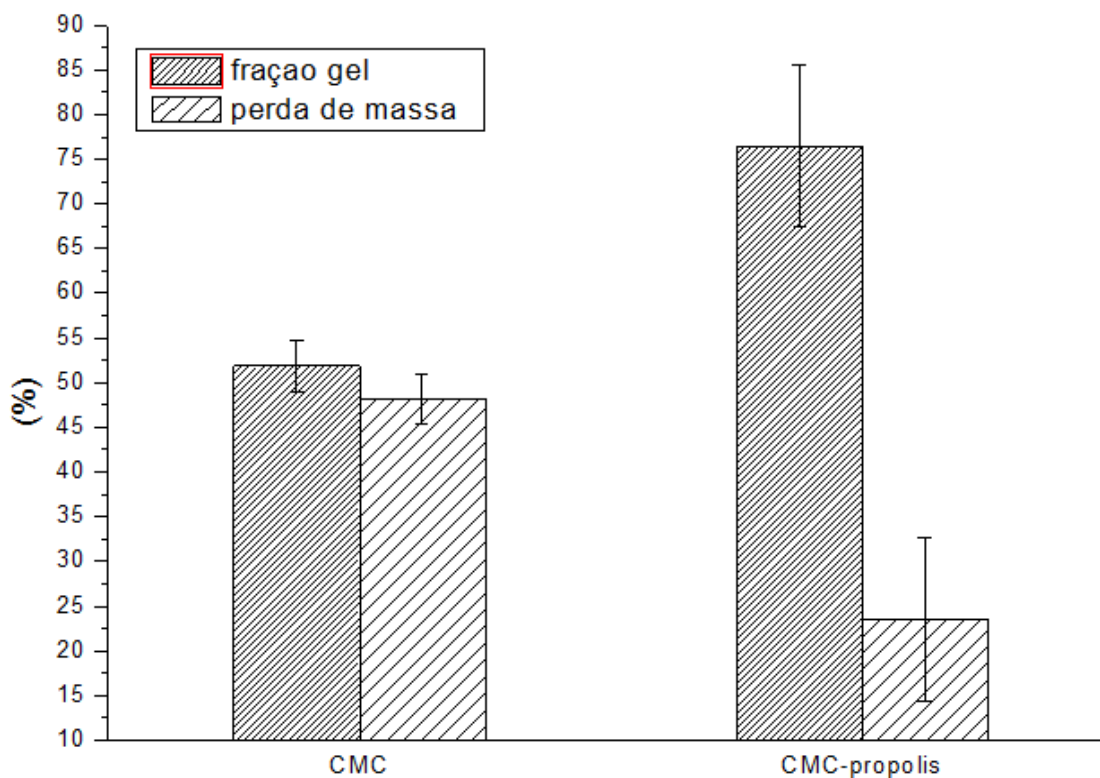


Figura 62 - Perda de massa e fração gel dos filmes obtidos

O teste de intumescimento permitiu também análise da perda de massa do filme polimérico, ou seja, degradação hidrolítica dos filmes. Observa-se no gráfico acima que a fração gel é inversamente proporcional a perda de massa. Quanto maior a capacidade do filme em absorver fluidos maior será sua perda de massa. O filme de NaCMC provavelmente apresenta cadeias mais livres (menos ancoradas) permitindo que muitas cadeias de NaCMC sejam lixiviadas pela água

Quanto maior a fração gel mais reticuladas estão as cadeias, que é o caso dos filmes de NaCMC impregnados de extratos de própolis. Essa reticulação pode ser pelo ácido cítrico que atua como reticulante ou também pelas possíveis reticulações químicas/ ancoramento de cadeias com extrato de própolis e matriz polimérica de NaCMC. Assim as cadeias poliméricas de NaCMC estão mais reticuladas não havendo muitas cadeias “livres” para serem “arrastadas” pela água. Observa-se também que o filme que foi incorporado ao extrato de própolis tem uma menor perda de massa comparado ao filme de NaCMC, pois provavelmente como o extrato de própolis pode ter formado uma “barreira” hidrofóbica, vai impedir a absorção de fluidos e diminuir a perda de massa.

Oliveira *et al* (2017) utilizando blendas de hidrogéis de PVA-NaCMC incorporados a própolis observaram que as frações de gel (GF (%)) das amostras de PVA-NaCMC com alto teores de própolis foram reduzidos.

A fração de gel dos hidrogéis está relacionada ao grau de cristalinidade dos géis, onde as amostras com própolis apresentaram baixa GF (%) e baixo grau de cristalinidade devido ao comprometimento físico do acúmulo de cadeias causado pela própolis. Como a quantidade e o tamanho dos cristais determinam as propriedades mecânicas e de inchamento dos hidrogéis, altos valores de GF (%) e grau de cristalinidade apontam para géis menos rígidos e com alta capacidade de captação de água. (OLIVEIRA *et al* ,2017)

Oliveira *et al* (2017) observaram também que amostras com alto teor de própolis apresentaram maiores perdas de massa. Valores semelhantes foram observados neste trabalho

As cadeias que não são incorporadas na rede cristalina podem ser lixiviadas, como os géis hidratam, as altas perdas de massa podem, portanto, ser parcialmente devidas a este efeito. Além disso, a entrada de água pode lixiviar a própolis não ligada da matriz do hidrogel. A perda de peso observada pode, portanto, também estar relacionada ao fornecimento de própolis . (OLIVEIRA *et al* ,2017)

Soares (2019) Avaliou o comportamento dos filmes de NaCMC contendo óleos essenciais de *Melaleuca armillaris* , *Melaleuca alternifolia* e copaíba. Verificou-se que eles apresentam comportamentos semelhantes, exibindo não intumescimento, mas provável perda de massa / dissolução. Observou-se que os filmes contendo *Melaleuca armillaris* apresentaram menor perda de massa que aqueles contendo copaíba, sendo que os filmes contendo *Melaleuca alternifolia* apresentaram a maior perda de massa dos filmes contendo óleo. A perda de massa dos filmes de NaCMC com os óleos podem ser atribuídas à degradação hidrolítica das amostras por meio do rompimento da ligação 1,4-glicosídica da celulose, bem como dificuldade à entrada de meio devido à presença dos óleos

5.8.1. Espectros no infravermelho (FTIR)

Os resultados para espectros no infravermelho podem ser observados na **Figura 63** que mostra o espectro de bandas sobrepostas obtidas para os filmes de NaCMC, NaCMC impregnado ao extrato de própolis e do extrato de própolis.

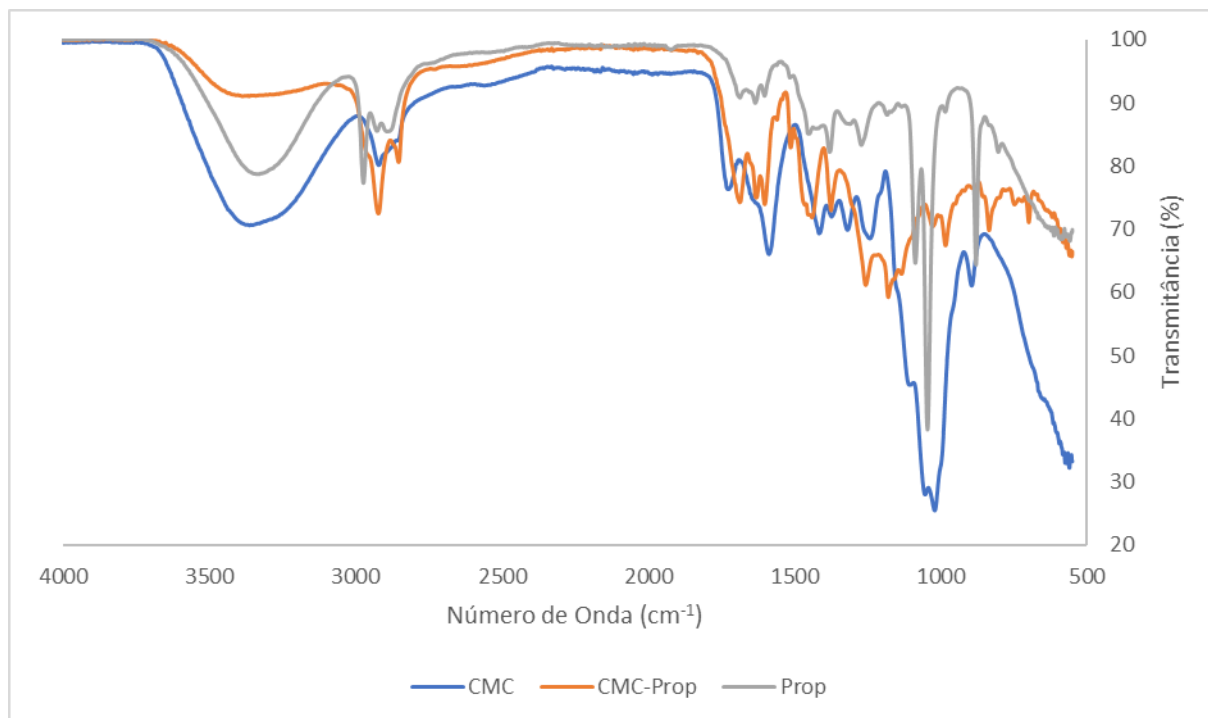


Figura 63- Espectros no infravermelho dos filmes obtidos e do extrato de própolis.

No espectro de infravermelho do filme de NaCMC (**Figura 64**) observou-se a banda em 3490 cm^{-1} refere-se ao estiramento axial O-H em ligações hidrogênio intermolecular, já em 2930 cm^{-1} e 2859 cm^{-1} ocorre deformação axial C-H. A banda em 1735 cm^{-1} se refere à deformação axial da carboxila do COOH. Em 1593 cm^{-1} identifica-se deformação simétrica do ânion carboxilato ($\text{COO}^{-}\text{Na}^{+}$). A banda em 1420 cm^{-1} refere-se à deformação assimétrica do ânion carboxilato ($\text{COO}^{-}\text{Na}^{+}$). As bandas em 1326 e 1263 cm^{-1} corresponde á deformação axial C-O. As bandas em 1122 e 1074 cm^{-1} é devido ao estiramento C-O-C e ao estiramento C-C. E também se encontra a banda 895 cm^{-1} referente à deformação angular C-H.

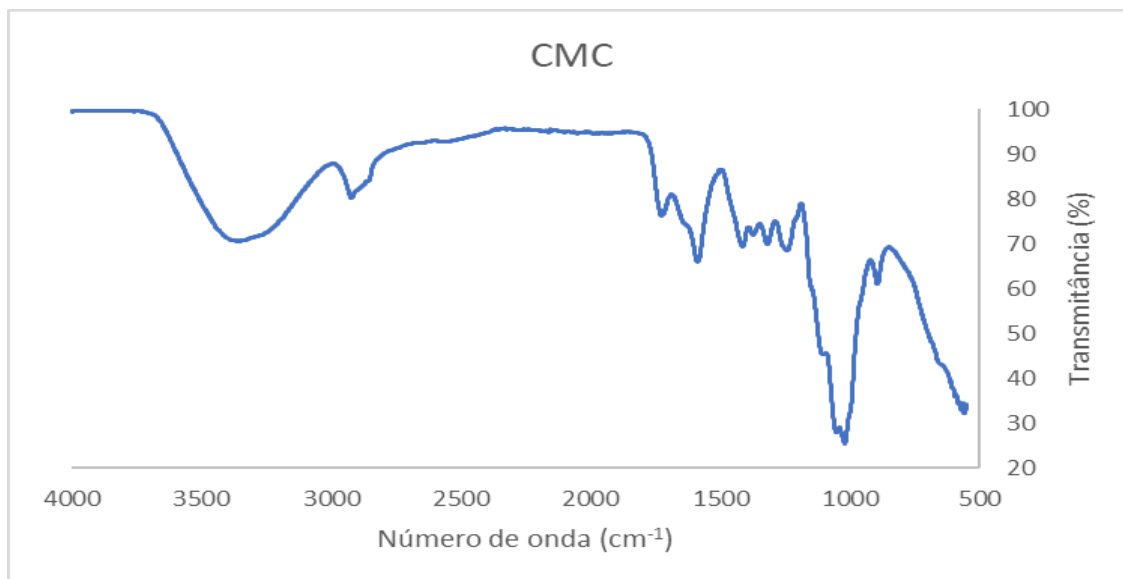


Figura 64- Espectros no infravermelho do filme de Na-CMC.

Já no espectro de infravermelho do extrato de própolis (**figura 65**) observou-se uma banda intensa e larga em 3445 cm^{-1} é associado às ligações de hidrogênio -OH entre os anéis das substâncias fenólicas; isto é corroborado pelas intensas bandas de absorção em 1158 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} e 1017 cm^{-1} das vibrações dos grupos -C-OH e -Ar-OH . Em 1420 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} observou-se bandas das vibrações dos grupos -CH . O pico a 1420 cm^{-1} é geralmente atribuído para grupos metileno (-CH_2), enquanto o pico a 1370 cm^{-1} é atribuído para grupos metila (-CH_3). As bandas de absorção muito intensas em 1647 cm^{-1} e 764 cm^{-1} são atribuídos a vibrações de estiramento de ligações duplas de carbono (C=C) de anéis aromáticos.

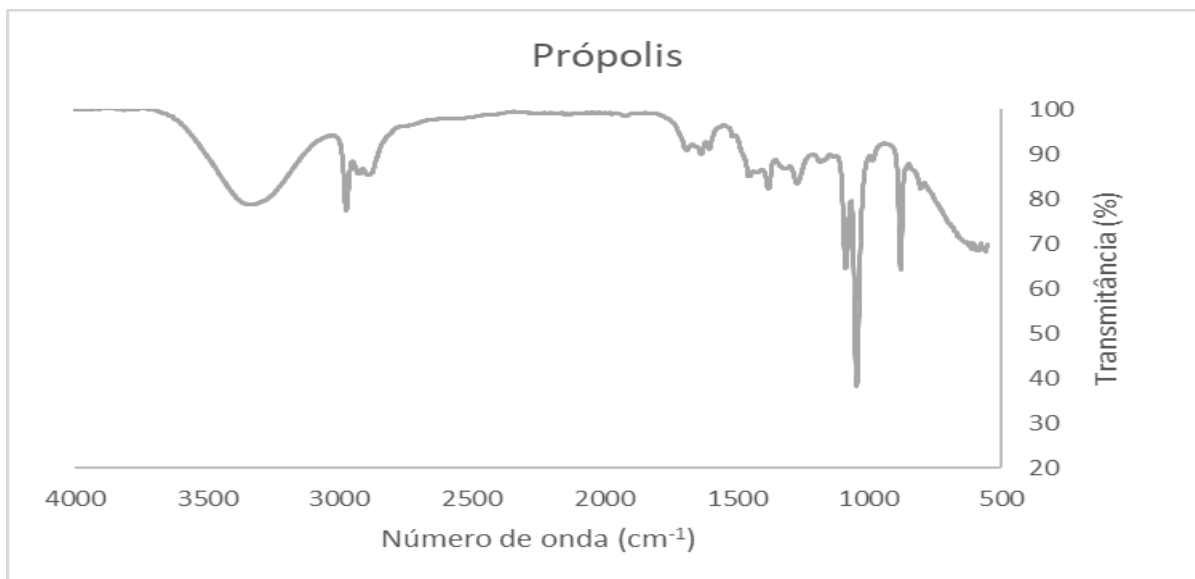


Figura 65- Espectros no infravermelho do extrato de própolis.

Ao analisar o espectro de infravermelho do filme de NaCMC impregnado com o extrato de própolis (**Figura 66**) observou-se a diminuição da intensidade da banda em 3490 cm⁻¹ que refere-se ao estiramento axial O-H em ligações hidrogênio intramolecular/intermolecular o que sugere uma possível interação química entre a NaCMC e o extrato de própolis sugerindo uma possível comprovação que o extrato realmente foi impregnado ao filme de NaCMC.

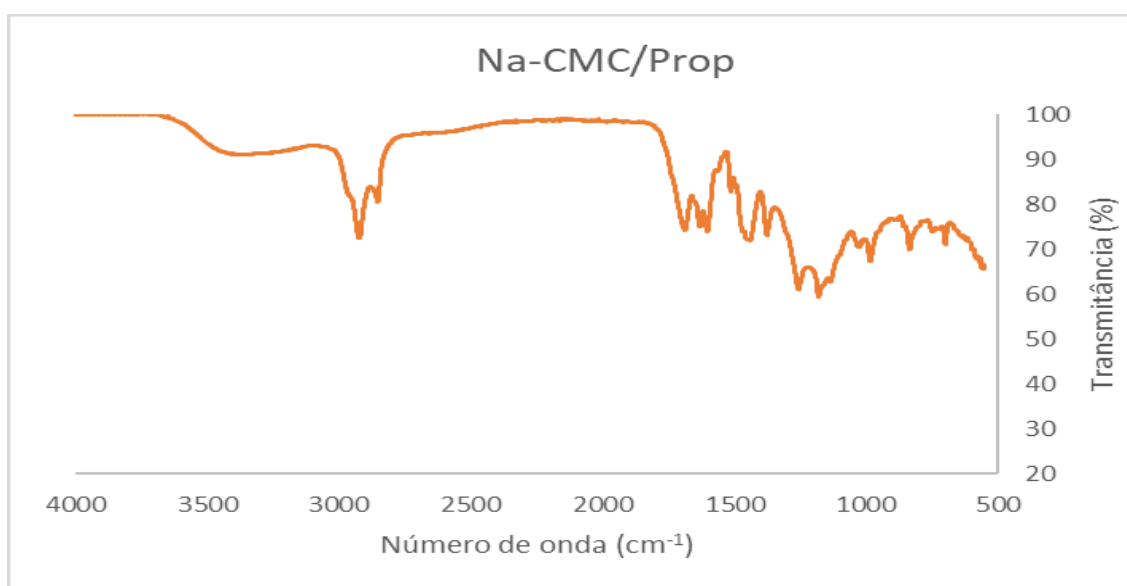


Figura 66- Espectros no infravermelho do filme de NaCMC impregnado de extrato de própolis.

Resultados similares dos espectros no infravermelho dos filmes de NaCMC e NaCMC impregnados de extrato de própolis foram observados por Oliveira *et al* (2017) em blendas de PVA-NaCMC impregnados com extrato de própolis.

Basílio (2018) identificou no seu estudo de membranas de NaCMC impregnados de extratos etanólicos de própolis vermelha, bandas características do extrato etanólico de própolis vermelha, confirmando a incorporação do extrato com a membrana polimérica. As bandas em $3331\text{-}2911\text{ cm}^{-1}$ que podem ser características de anéis aromáticos de éter tipicamente característico de extratos etanólicos de própolis vermelha.

5.8.2. Difração de raio X (DRX)

A cristalinidade do filme de Na-CMC e do filme de Na-CMC impregnado de extrato de própolis foi observada pelos resultados de difração de raio-X (DRX) que estão dispostos na **figura 67**.

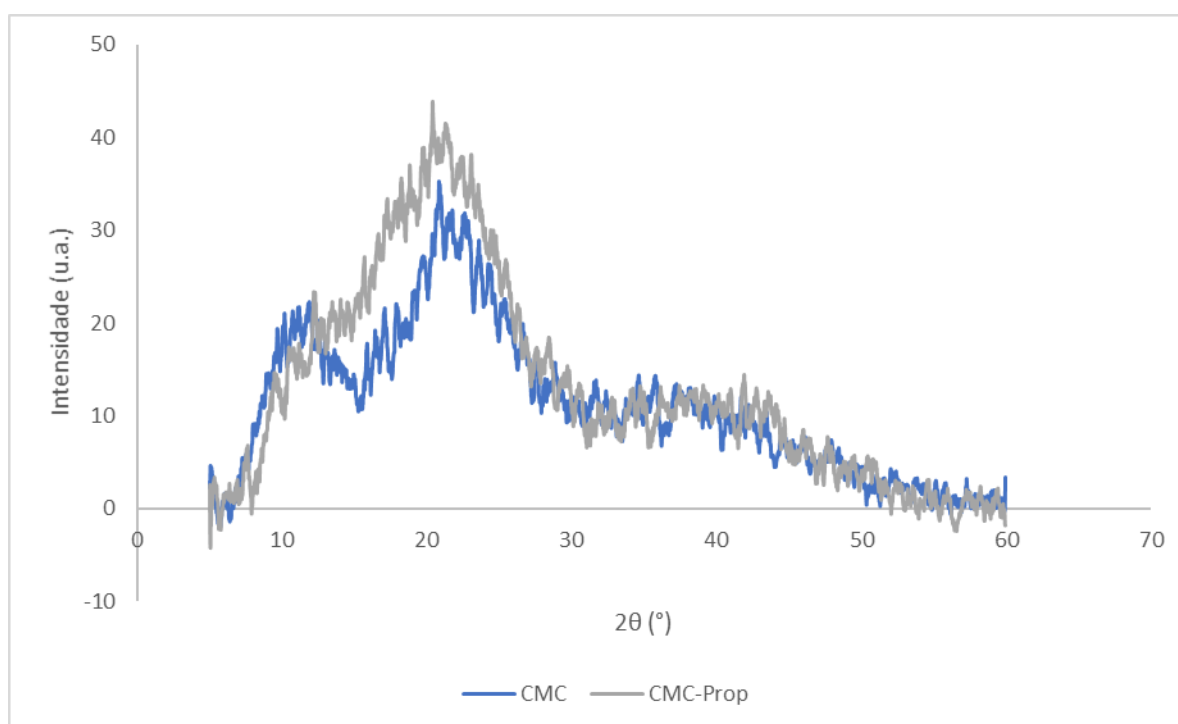


Figura 67- Difratograma de raio x (DRX) dos filmes obtidos.

Quando os raios-X interagem com um material cristalino geram um padrão de difração, sendo que cada componente tem seu padrão, único e representa a sua identidade. Quanto maior o número de cristais em um plano de uma estrutura, mais intensos, pontiagudos

e estreitos serão os picos no difratograma. A parcela amorfa gera picos mais largos e menores. Os padrões de DRX do polissacarídeo são apresentados na CMC é caracterizado por um único pico em 2θ a aproximadamente 20° . (BURGARDT, 2012)

Observa-se no difratograma de raios-X (**figura 67**) que tanto o filme de NaCMC quanto o filme de NaCMC impregnados de extrato de própolis apresentam grau de cristalização. O filme NaCMC incorporado ao extrato de própolis apresenta um pico mais largo indicando uma tendência mais amorfa quando comparado ao filme de NaCMC, provavelmente devido ao ancoramento de cadeias pela própolis ou mesmo por reticulação química do extrato de própolis com a cadeia polimérica da NaCMC.

Em estudos realizados por Dharmalingam & Anandalakshmi (2019) a NaCMC apresentou um pico de difração a $2\theta = 22,1^\circ$ característico desse polímero. Os picos cristalinos da NaCMC foram gradualmente ampliados com aumento nas concentrações de ácido cítrico (10% e 20%) usado como reticulante. O alargamento do pico ocorreu pelo aumento das quantidades de reticulante provocando restrições adicionais na mobilidade da cadeia polimérica (tamanho do cristal) ou desenvolvimento de imperfeições ou deformação interna. Semelhantes resultados neste trabalho foram observados nos filmes de NaCMC impregnados com própolis, pois além da presença do ácido cítrico como reticulante, o extrato de própolis provavelmente aumenta a reticulação da cadeia polimérica diminuindo a cristalinidade do polímero.

Oliveira *et al* (2017) ao estudar a adição de extrato de própolis em blendas de PVA-NaCMC, observaram que a própolis intercalada entre cadeias amorfas do polímero pode diminuir o entrelaçamento das cadeias, permitindo-lhes mais movimento e inibindo o seu empacotamento, levando a cristais mais imperfeitos. Isso é consistente com o grau de cristalinidade sendo menor para amostras com maiores quantidades de própolis.

5.8.3. TGA

As análises termogravimétricas foram realizadas para as amostras dos filmes de NaCMC e NaCMC impregnado com extrato de própolis e está representada na **figura 68**.

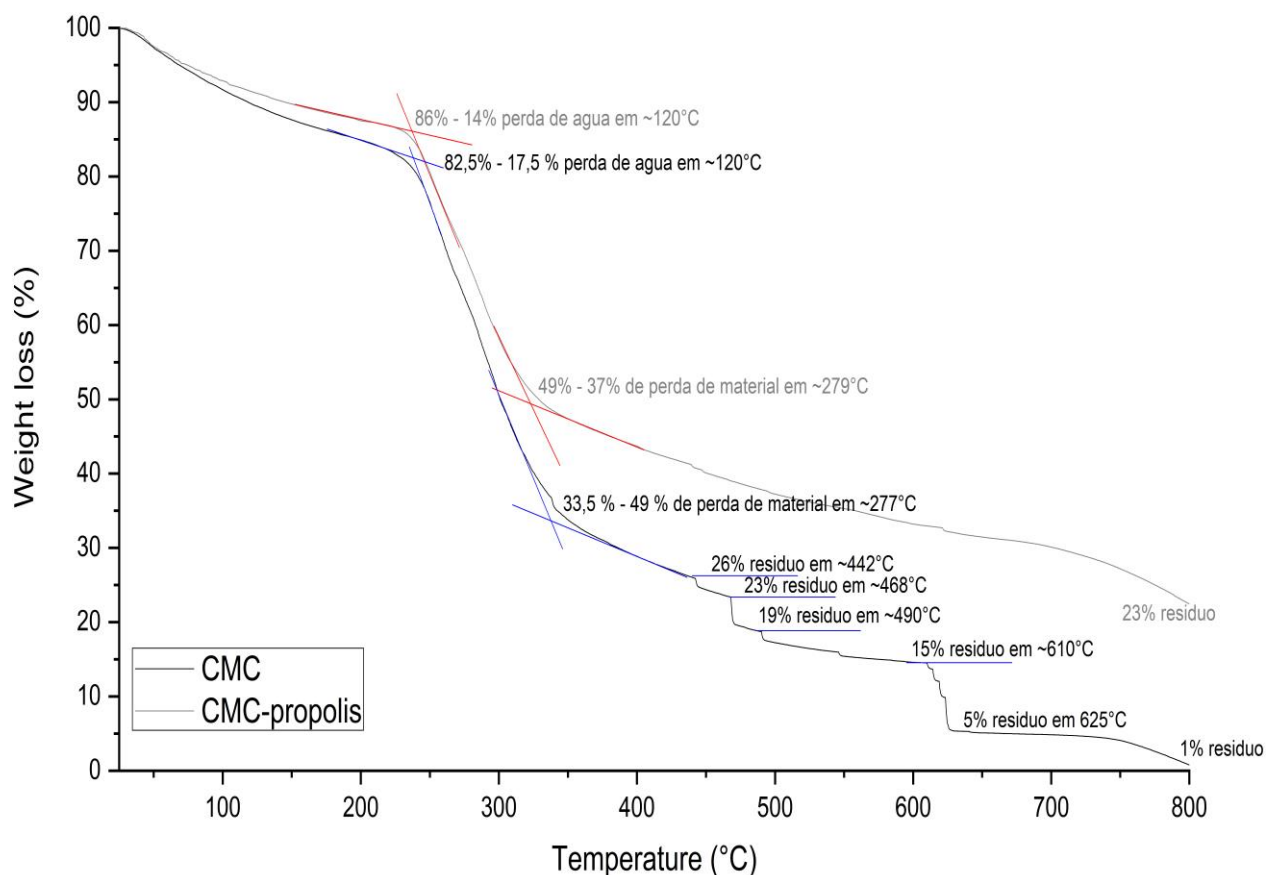


Figura 68- Curvas termogravimétricas das amostras.

A partir da observação da **Figura 68**, dois estágios de degradação e de perda de peso podem ser observados para os filmes de NaCMC. No primeiro estágio, $T(\sim 120^{\circ}\text{C})$, ocorre a perda de água pelo processo de desidratação e representa 17,5% em perda de massa e perda de massa de 49%. No segundo estágio, entre 120°C e 277°C , representado como estágio vibracional das amostras antes de atingir a temperatura máxima de decomposição que ocorre a 400°C . Nesta fase, o polímero ainda pode sustentar a sua estrutura molecular, mesmo a essa temperatura (277°C) causando forte vibração para quebrar a ligação química dentro da rede polimérica. Em seguida pode ser observada uma série de degradações com a elevação da temperatura em que podem ser atribuídas a desidratação de anéis sacarídeos e quebra de ligações C-O-C na cadeia de NaCMC (ALANGE, 2016; SALLEH, 2018; YÁNEZ, 2018 DHARMALINGAM,2019;). Ao comparar a curva termogravimétrica do filme de NaCMC com o filme de NaCMC impregnado com extrato de própolis percebe-se uma maior estabilização em temperaturas mais elevadas provavelmente devido a reticulação química da NaCMC com o extrato de própolis.

De acordo com as curvas termogravimétricas de filmes de CMC analisadas por Silva (2016) CMC apresentou a 253°C uma temperatura máxima de degradação térmica relacionada à perda de 54,7% de sua massa inicial atribuída à decomposição estrutural da cadeia polissacarídica, ocasionando desidratação e despolimerização da celulose, liberando H₂O e CO₂ da matriz polimérica. A perda acentuada em 300°C da CMC corresponde a perda de CO₂ devido à descarboxilação provocando a cisão dos anéis glicosídicos, começando em 253°C até cerca de 320°C. Valores próximos da temperatura e estágios de degradação foram encontrados neste trabalho para os filmes de hidrogéis de NaCMC e dos filmes de NaCMC impregnados com extrato de própolis.

Em estudos realizados por Dharmalingam & Anandalakshmi (2019) as curvas termogravimétricas de filmes de NaCMC apresentaram três etapas de perda de massa. Uma perda inicial de massa foi observada entre 30 e 180 °C devido à remoção de umidade. A perda máxima de massa de NaCMC foi observada a 287 ° C no segundo estágio de degradação. A descarboxilação do NaCMC foi observada a 357 ° C no terceiro estágio de degradação.

Soares (2019) realizou análises termogravimétricas nas amostras de filmes Na-CMC e nos filmes de NaCMC incorporados com os óleos bioativos de copaíba, de *Melaleuca armillaris* e *Melaleuca alternifolia* e dos filmes de NaCMC incorporados com ureia 2%. Em todas as amostras foram observadas duas etapas de degradação. Nos filmes de NaCMC a decomposição também ocorreu em dois estágios. Inicialmente uma reação rápida a partir de 33,86°C, a primeira etapa de degradação está relacionada com a perda de água livre. Na segunda etapa ocorreu a vaporização de água que está ligada de modo mais fixo à matriz polimérica. Já as curvas termogravimétricas correspondentes aos hidrogéis com óleos e ureia apresentaram uma menor perda de massa no primeiro estágio, com exceção da interação do óleo de copaíba com o filme de hidrogel de NaCMC em que ocorreu uma maior perda de massa no primeiro estágio. Provavelmente houve degradação do óleo de copaíba livre, que permitiu que as cadeias do hidrogel ficassem mais livres, ocasionando um aumento das zonas amorfas e deixando-o suscetível à degradação quando submetido a um aumento da temperatura. As curvas dos óleos de *Melaleuca armilarias*, *Melaleuca alternifolia* e com ureia exibiram uma série de reações secundárias próximas às reações principais em que foi possível identificar os decaimentos que exibiram os pontos de degradação em dois estágios. O processo de incorporação não adulterou de forma significativa os decaimentos.

5.8.4. Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação *in vitro*

As figuras 69, 70, 71, 72, 73 e 74 são referentes aos perfis de liberação das substâncias contidas nos filmes de carboximetilcelulose sódica impregnados de extrato de própolis verde.

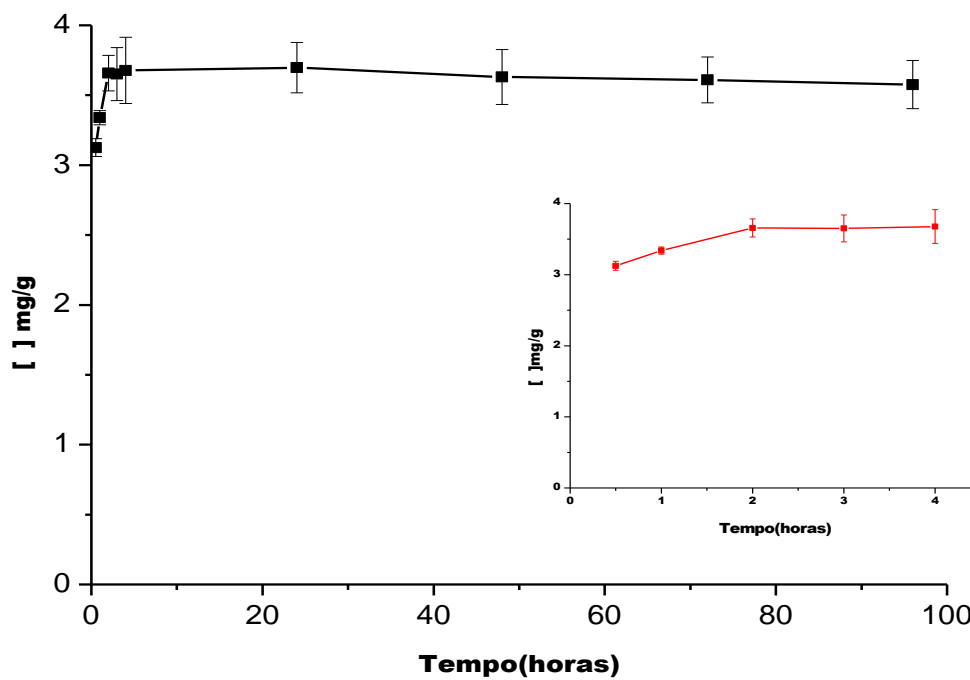


Figura 69. Perfil de liberação do ácido clorogênico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido clorogênico até 4h.

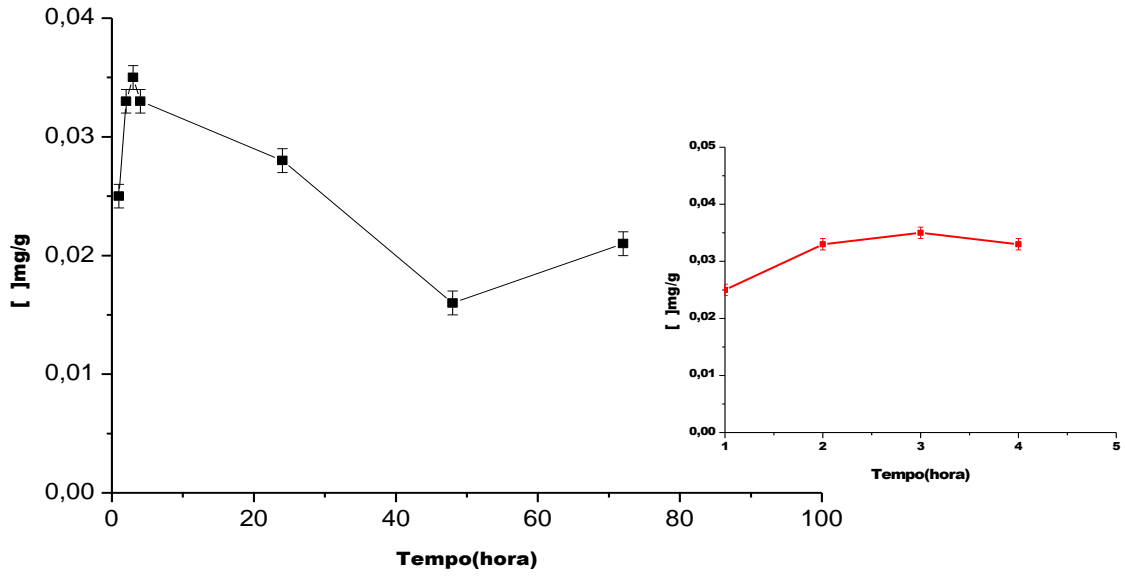


Figura 70. Perfil de liberação do ácido cafeico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido cafeico até 4h.

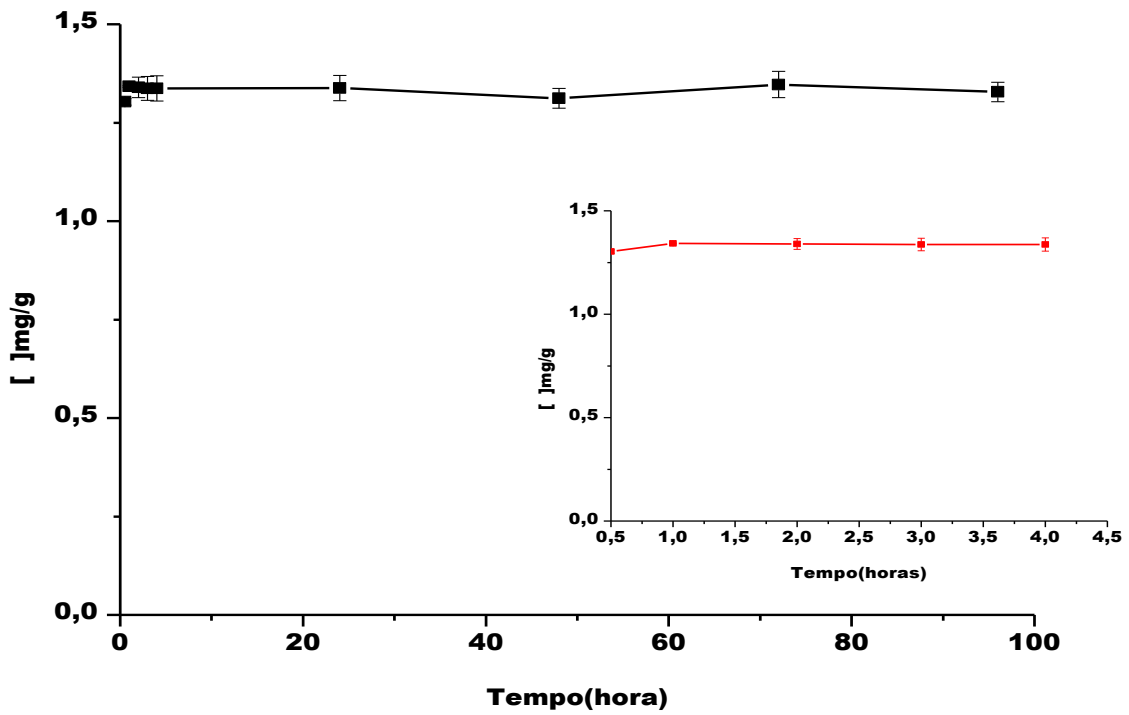


Figura 71. Perfil de liberação do ácido ferúlico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido ferúlico até 4h.

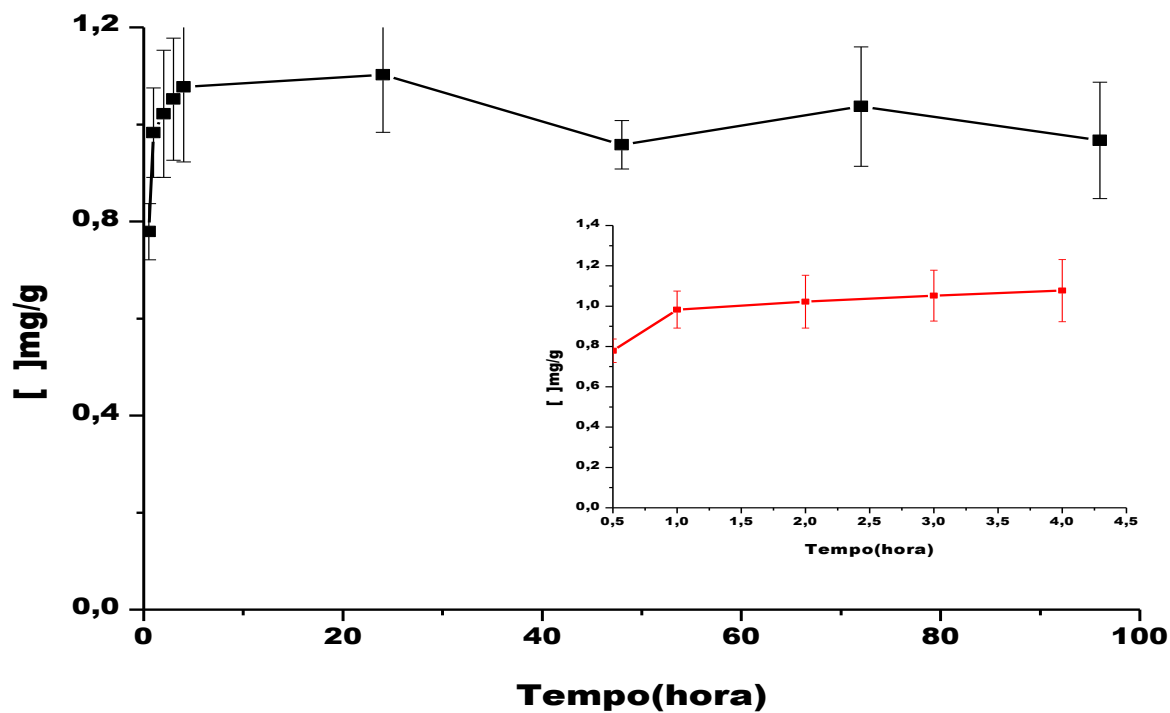


Figura 72. Perfil de liberação do ácido *p*-cumárico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido *p*-cumárico até 4h.

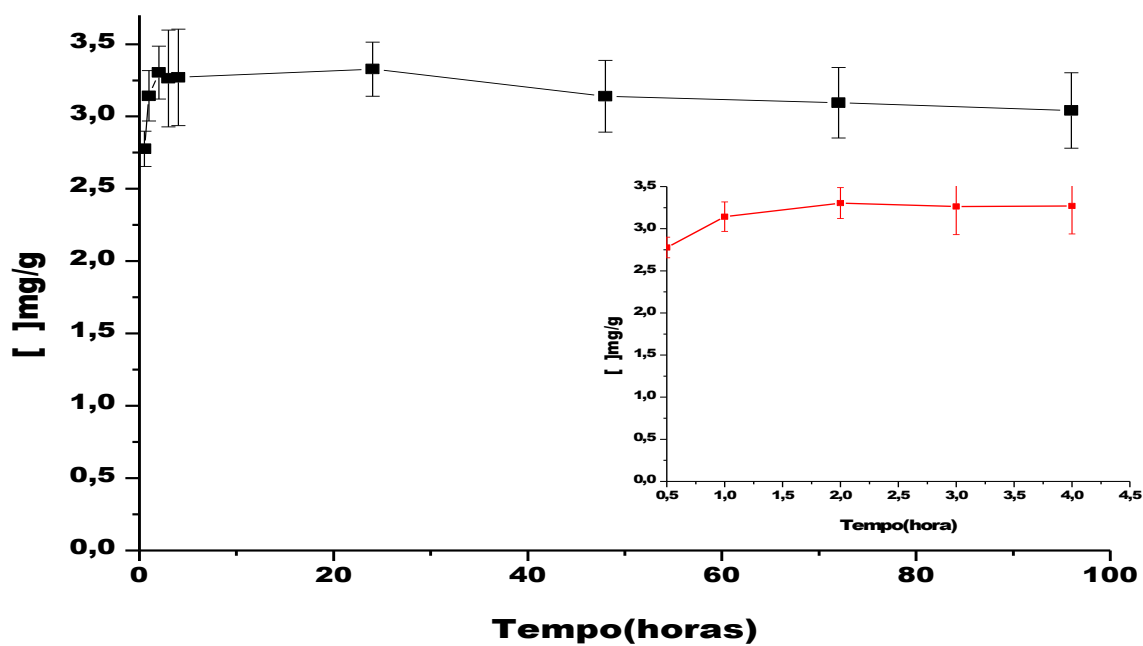


Figura 73. Perfil de liberação do ácido rosmarínico até 96h. Inset: perfil de liberação do ácido rosmarínico até 4h.

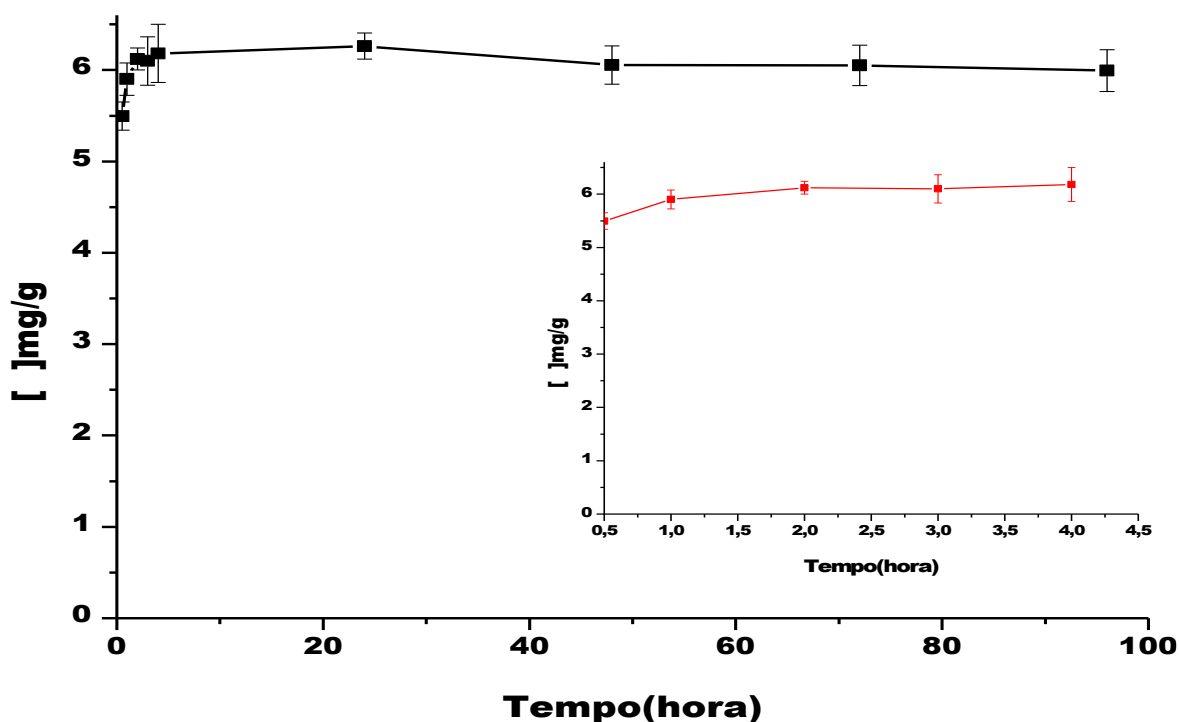


Figura 74. Perfil de liberação da pinobankisina até 96h. Inset: perfil de liberação da pinobankisina até 4h.

Pode-se observar que as substâncias liberadas apresentaram similares perfis de liberação, com o início de liberação as 0,5h e com liberação máxima após as 4h de ensaio, mantendo-se uma liberação imediata e constante até às 96h que foi a duração do ensaio de liberação. A liberação imediata ou convencional, destina-se após a administração do fármaco ou princípio ativo a absorção de forma rápida, sendo de 75% da substância ativa em 45 minutos. (ANVISA, 2010. O que pode ser considerado uma característica importante para biofilmes utilizados como curativos no tratamento de ulcerações cutâneas.

Um perfil similar de estudo de liberação *in vitro* foi observado por Basílio (2018) em filmes poliméricos de NaCMC e pectina impregnados com extrato de própolis vermelha. Foi observado a liberação de flavonoides totais a partir de 1h de realização do teste (demonstrando um perfil de liberação imediata), a partir de 250h observa-se a formação de um platô onde a liberação se tornou constante de até o final do teste que teve duração de 360h. (**Figura 75**).

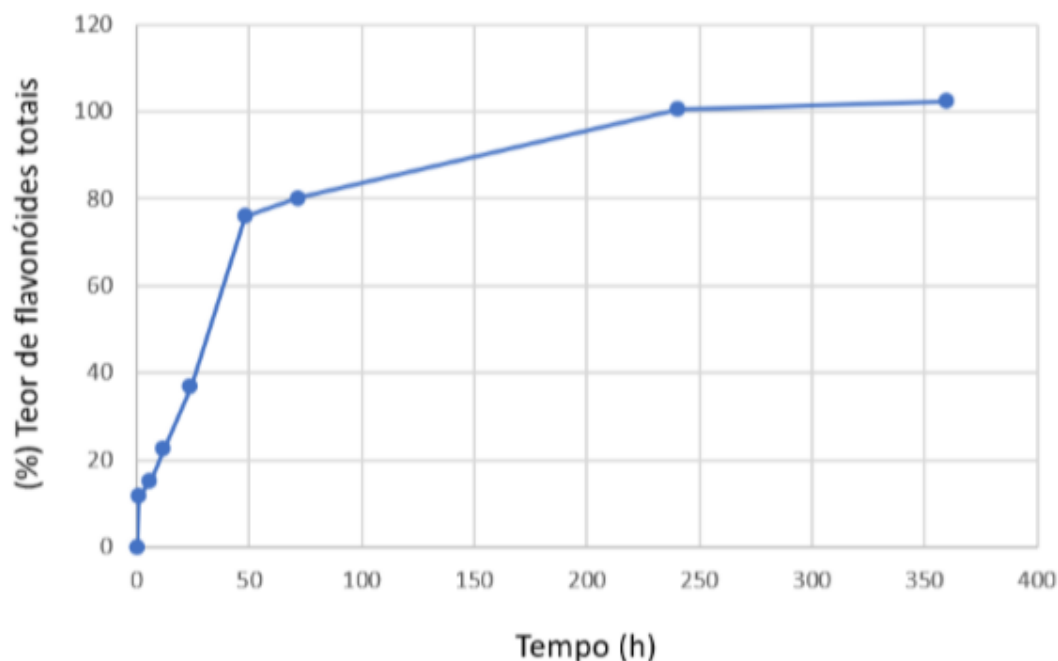


Figura 75. Perfil de liberação de flavonóides totais da membrana polimérica NaCMC e pectina impregnados de extrato de própolis vermelha. (Basílio, 2018).

Os estudos de liberação *in vitro* visam à avaliação da liberação das substâncias fenólicas presentes no extrato de própolis que foi impregnado nos filmes de carboximetilcelulose sódica. A partir do perfil de liberação pode-se determinar a cinética para cada substância liberada. Para isso, escolheu-se a porção mais linear de cada perfil e aplicou-se os três modelos cinéticos (item 4.11.6.1) para determinação da equação da reta de regressão linear ($y = ax + b$). O modelo que apresentou maior valor de correlação linear (mais próximo de 1) foi escolhido como modelo cinético do estudo. O valor de fluxo (J) corresponde ao valor de inclinação da equação da reta de regressão linear. Os valores de fluxo (J) e correlação linear (r) das formulações analisadas estão demonstrados na **Tabela 37**.

Tabela 37. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=3$) das substâncias fenólicas presentes no extrato de própolis que foi impregnado nos filmes de carboximetilcelulose sódica.

Substâncias liberadas	Fluxo (J)*	Correlação linear (r)*	Modelo cinético
Ácido clorogênico	0,009±0,014	0,925	Pseudo-primeira ordem
Ácido cafeico	0,008±0,001	0,818	Pseudo-primeira ordem
Ácido ferúlico	0,019±0,003	0,61	Pseudo-primeira ordem
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,200±0,001	0,883	Pseudo-primeira ordem
Ácido rosmarínico	0,337±0,052	0,814	Pseudo-primeira ordem
Pinobankisina	0,476±0,012	0,895	Pseudo-primeira ordem

*Valores expressos em média \pm dp.

Os valores de fluxo (J) variaram de acordo com as substâncias liberadas. O que pode ser explicado pela polaridade das substâncias liberadas durante o ensaio. Quanto mais polar é a substância liberada maior a interação com o sistema polimérico, logo menor o valor de fluxo (J), ou seja, menor a velocidade de liberação dessas substâncias (nesse caso o ácido clorogênico, o ácido cafeico e o ácido ferúlico). Quanto menor a polaridade das substâncias liberadas menor a interação com o sistema polimérico, logo maior valor de fluxo (J), portanto maior a velocidade de liberação dessas substâncias (nesse caso o ácido *p*-cumárico, o ácido rosmarínico e a pinobankisina).

A aplicação de modelos cinéticos de liberação permitiu inferir sobre o perfil de liberação dos filmes de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) impregnados de extrato de própolis verde. O modelo cinético de liberação de um princípio ativo ou fármaco é avaliado através da linearização dos dados de liberação de acordo com parâmetros dependentes do tempo e/ou porcentagem de princípio ativo liberado.

Os estudos de liberação *in vitro* neste trabalho revelaram uma cinética de pseudo-primeira ordem para todas as substâncias fenólicas liberadas presentes no extrato de própolis verde (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, pinobankisina), caracterizando um sistema de liberação controlada por difusão. Esse modelo de cinética de liberação proposto baseia-se na equação de Higuchi, que descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo, frequentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do princípio ativo ou fármaco a partir de sistemas matriciais hidrofílicos como a carboximetilcelulose sódica.(COSTA, 2002)

Segundo Lopes *et al* (2005) a etapa de liberação dos fármacos a partir de sistemas de matrizes hidrofílicas como a carboximetilcelulose sódica envolve várias fases. Numa primeira fase, as matrizes hidrofílicas, quando em contato com o meio de dissolução, absorvem água, sobretudo através dos poros do sistema matricial. Após a hidratação do sistema, com consequente liberação imediata do fármaco existente à superfície do sistema polimérico, ocorre o intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas, e forma-se uma camada gelatinosa de polímero (estado maleável) à volta do núcleo seco do sistema polimérico. A água continua a penetrar na matriz, mas agora sobretudo através da camada gelificada, que, lentamente, vai se formando. À medida que o núcleo seco fica hidratado, a camada exterior gelificada sofre erosão. Estes dois fenômenos ocorrem simultaneamente e o sistema matricial mantém um volume mais ou menos constante. Quando a penetração da água na matriz gelificada excede um valor crítico de concentração (concentração na qual as interações entre a água e o polímero aumentam com consequente redução das interações polímero - polímero), as cadeias poliméricas começam a se separar, alargando os espaços onde a difusão do fármaco ocorre.

Analisando a estrutura química do polímero NaCMC pode-se prever que o ancoramento das cadeias poliméricas com o extrato de própolis verde ocorre de forma a permitir uma permeação do meio tampão aquoso nas cadeias, e logo, pelo processo de difusão, ocorre a liberação da substância ativa do interior para o meio.

Em estudos avaliados por Silva (2016) a análise de liberação dos fármacos paracetamol e fluconazol incorporados em filmes de NaCMC reticulados com 20% e 30% de ácido cítrico apresentaram um perfil de liberação imediato, porém apenas com duração de 24h.

Segundo Silva (2016) os filmes de NaCMC reticulados com 20% e 30% de ácido cítrico não foi capaz de sustentar a liberação dos fármacos de maneira ideal, apresentaram um comportamento de cinética de liberação cinética de Korsmeyer-Peppas, onde a concentração do fármaco se elevou no compartimento doador por estar atravessando o filme, mas em determinados pontos, houveram pequenas quedas na quantidade permeada. Isso pode ter ocorrido porque nos tempos em que foram identificados esses declives, o fármaco pode não ter passado através do filme, assim, ao ser retirada a alíquota para medição havia apenas a diluição da última reposição de volume com solução tampão. Além disso, o fármaco pode ter interagido com o filme, provocando reações químicas diversas, visto a instabilidade da cadeia

NaCMC. O fármaco pode também ter saturado o filme de NaCMC de forma que no período que houve a interrupção da liberação, ficou totalmente retido na película polimérica.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato foi agregado ao filme de carboximetilcelulose sódica, pois a interação sistema-solução gerou a liberação das substâncias fenólicas (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico e pinobankisina) presentes no extrato de própolis de própolis (que já tinha sido anteriormente identificadas e quantificadas no extrato de própolis por CLAE) que foi impregnado aos filmes de carboximetilcelulose sódica. E também mostraram que a interação do extrato de própolis verde com a NaCMC e a morfologia do filme polimérico são importantes fatores no controle cinético do processo de liberação do fármaco, que culminaram em mudanças expressivas do tempo de liberação e na quantidade dos princípios ativos presentes no extrato de própolis retido, tornando os filmes poliméricos impregnados com extrato candidatos viáveis para aplicação tanto no tratamento de ulcerações cutâneas.

5.9. Análise estatística multivariada

A análise multivariada foi utilizada para resumir em poucas e importantes dimensões a maior parte da variabilidade da matriz para a obtenção de relações entre os dados obtidos, e extrair desta maneira a informação mais relevante para o resultado.

Para fins de comparação e tentativa de discriminação entre a própolis marrom e a própolis verde foi verificada a influência do tipo de própolis e solventes (metanol e etanol) na variabilidade química dos resultados obtidos para os teores de fenólicos, flavonoides totais, capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) e as concentrações das substâncias identificadas por CLAE-DAD em cada extrato utilizando-se como ferramentas estatísticas a Análise das Componentes Principais (ACP).

Observou-se nos gráficos de *scores/loadings* (**Figuras 76 e 77**) uma clara separação entre as amostras de própolis verde e marrom, indicando diferenças na composição química qualitativa dos extratos obtidos tanto por extração etanólica como metanólica.

Os gráficos de ACP permitiram também a caracterização de tendências entre as variáveis, ou seja, indicou quais variáveis foram as principais responsáveis pela construção do gráfico dos extratos etanólicos e metanólicos de própolis marrom e verde.

Quanto ao gráfico de ACP dos extratos etanólicos (**Figura 76**), o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante em ABTS foram as variáveis que exerceram maior poder

discriminante para a separação das amostras. Já quanto ao gráfico de ACP dos extratos metanólicos (**Figura 77**), o maior poder discriminante foi observado para o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante em FRAP e ABTS.

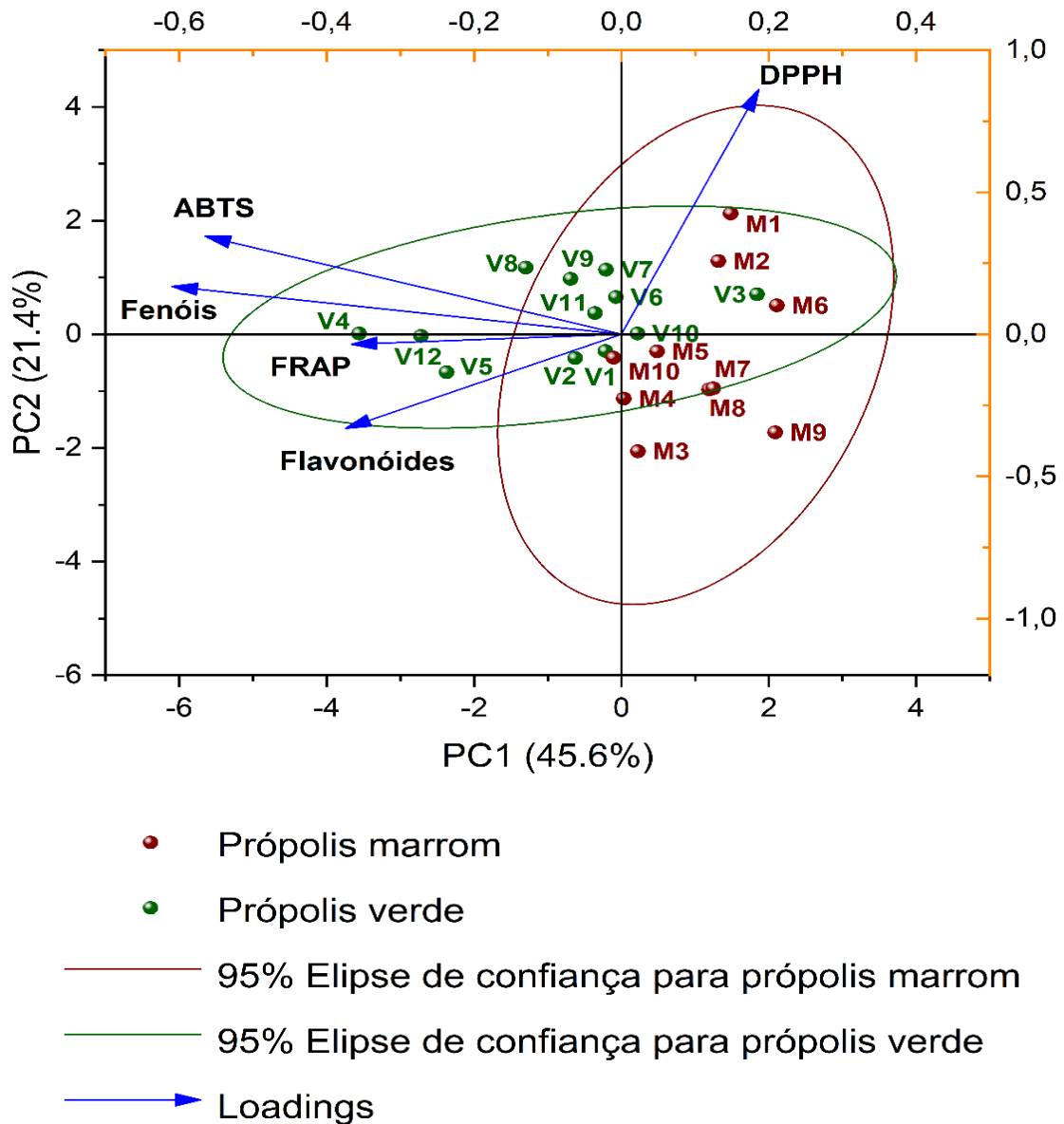


Figura 76. Gráfico *scores/loadings* aplicados ao teor de fenólicos totais, flavonoides totais, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de extratos etanólicos da própolis marrom (M) e verde (V).

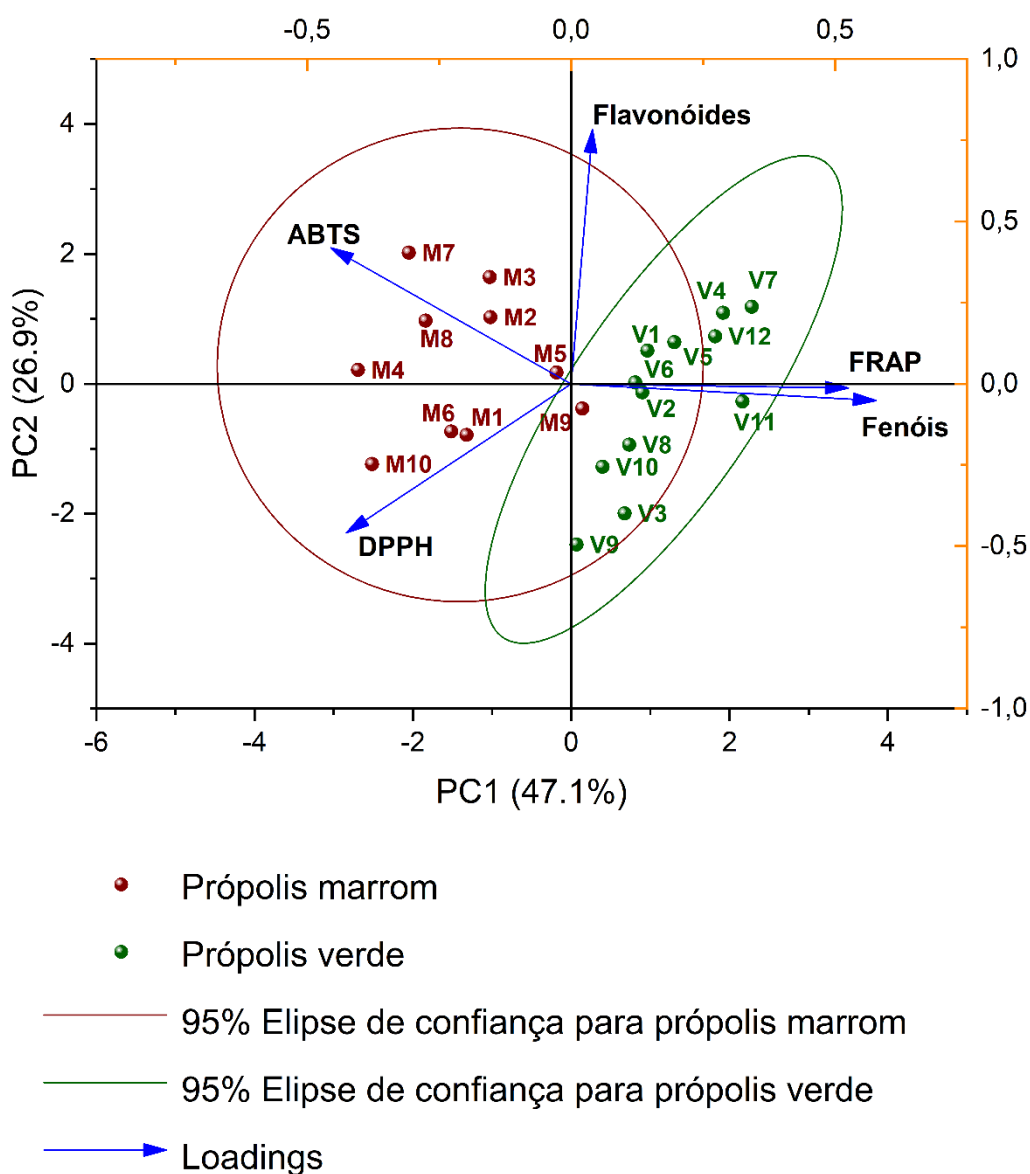


Figura 77. Gráfico *scores/loadings* aplicados ao teor de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF), FRAP, DPPH, ABTS das amostras de extratos metanólicos da própolis marrom (M) e verde (V).

Nas **Figuras 78 e 79** estão os gráficos de *scores* e de *loadings*, respectivamente, na qual as concentrações das substâncias obtidas por CLAE-DAD foram utilizadas como variáveis. Através do gráfico de *scores* (**Figura 78**) foi possível verificar o agrupamento dos extratos etanólicos de própolis marrom e própolis verde. O gráfico de *loadings* (**Figura 79**) mostrou que o teor de pinostrobin, artepillin C e ácido ferúlico foram as principais variáveis

responsáveis pelo agrupamento dos extratos etanólicos de acordo com o tipo de própolis (marrom e verde).

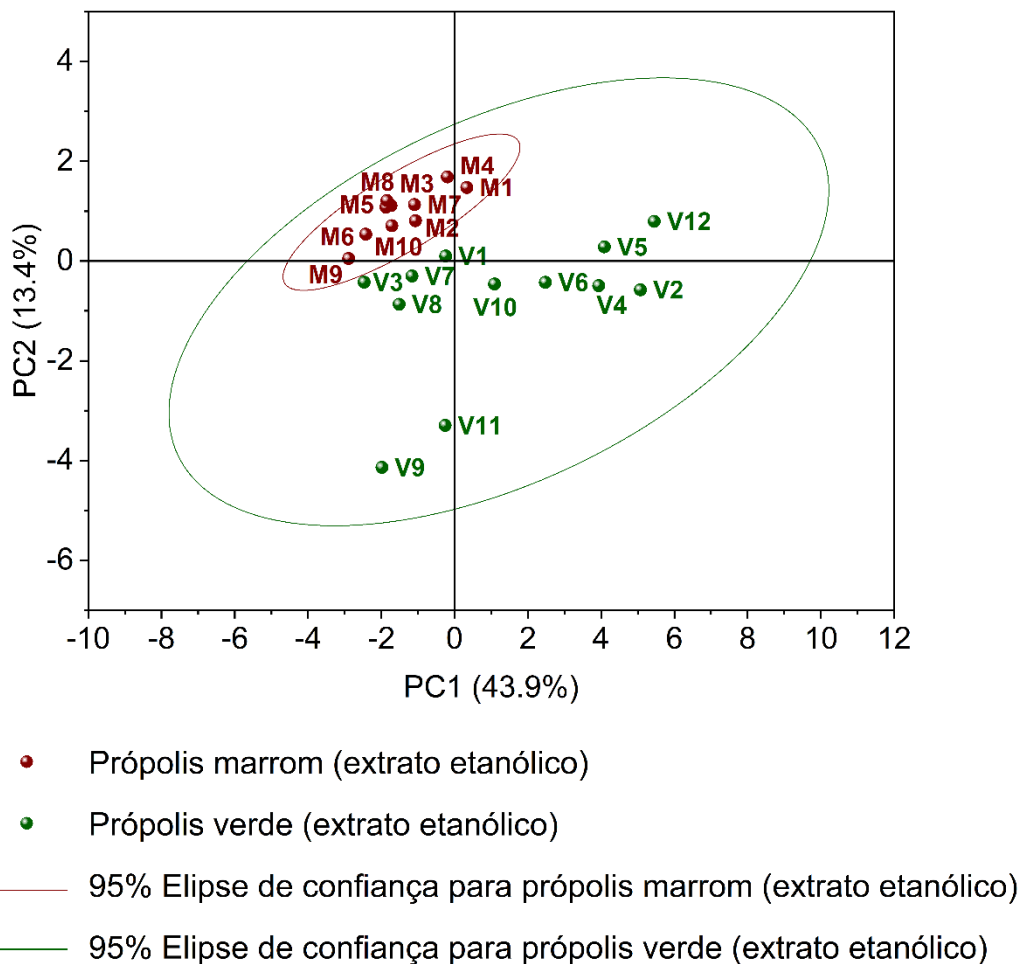


Figura 78. Gráfico *scores* aplicados as substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis marrom e própolis verde.

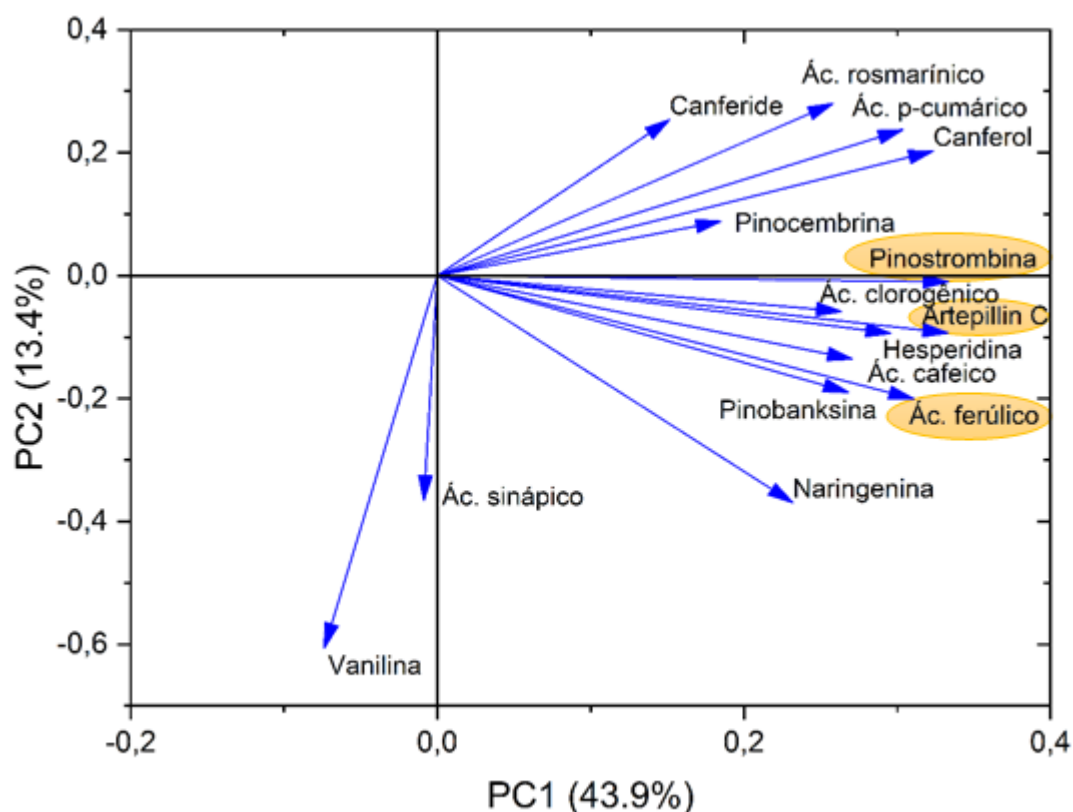


Figura 79. Gráfico *loadings* aplicados as substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis marrom e própolis verde.

Nas **Figuras 80 e 81** estão os gráficos de *scores* e de *loadings*, respectivamente, na qual as concentrações das substâncias obtidas por CLAE-DAD foram utilizadas como variáveis para discriminar as amostras de extratos metanólicos de própolis marrom e própolis verde. Através do gráfico de *scores* (**Figura 80**) foi novamente possível observar o agrupamento de acordo com o tipo de própolis (marrom e verde), enquanto o gráfico de *loadings* (**Figura 81**) mostrou que o teor de ácido ferúlico, ácido p-cumárico, artepillin C, canferol e ácido rosmarínico foram as principais variáveis responsáveis pelo agrupamento dos extratos metanólicos de acordo com o tipo de própolis (marrom e verde).

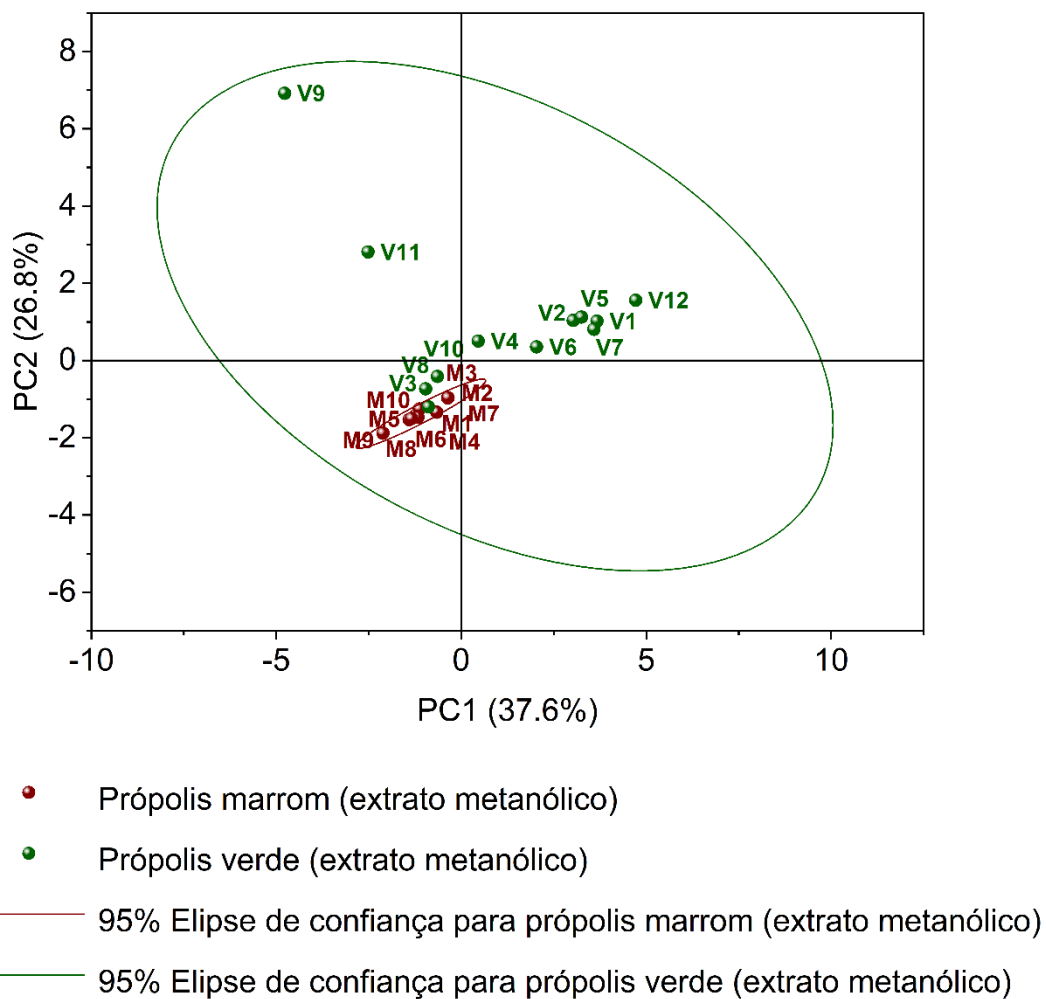


Figura 80. Gráfico *scores* aplicados às substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis marrom e própolis verde.

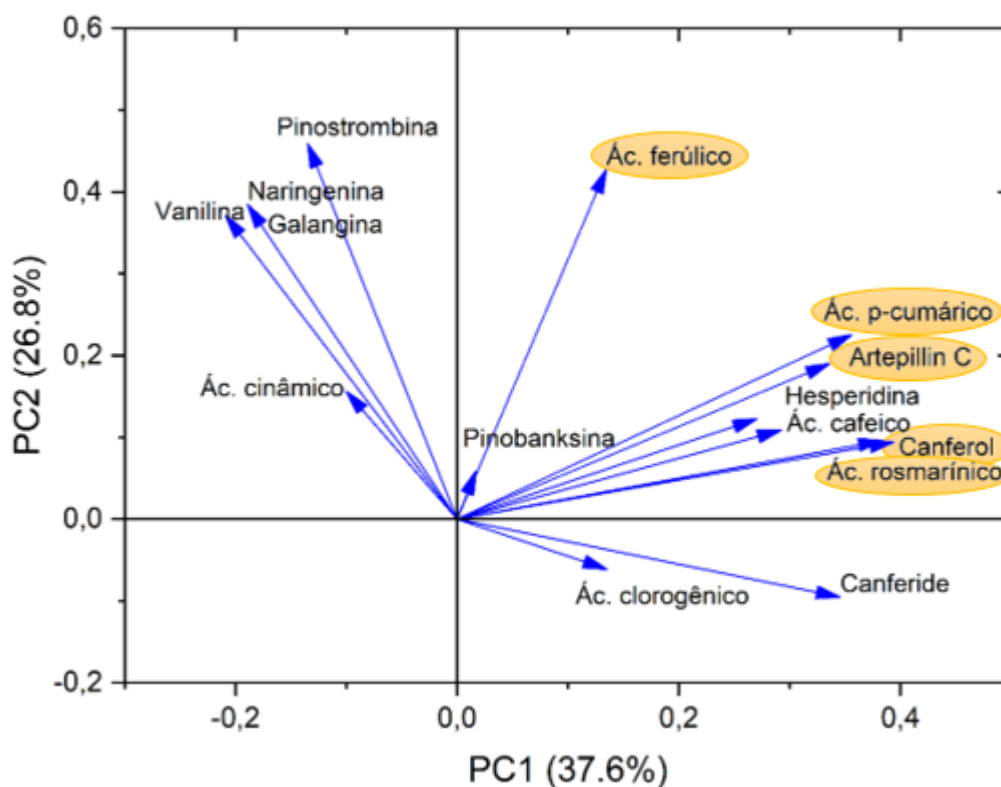


Figura 81. Gráfico *loadings* aplicados às substâncias quantificadas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis marrom e própolis verde.

Comparando os gráficos de *loadings* das ACP realizadas com as quantificações de substâncias fenólicas (**Figuras 80 e 81**), observou-se que a concentração de artepillin C e ácido ferúlico estiveram entre as principais variáveis responsáveis pelo agrupamento da própolis verde e marrom tanto com relação aos extratos etanólicos quanto metanólicos. As diferenças foram observadas quanto ao teor de pinostrobinina, de ácido *p*-cumárico e de canferol. A maior concentração de pinostrobinina esteve entre os principais responsáveis pelo agrupamento dos extratos etanólicos da própolis verde enquanto o maior teor de ácido *p*-cumárico e canferol esteve entre os principais responsáveis pelo agrupamento dos extratos metanólicos. Tal resultado pode estar relacionado à menor polaridade da pinostrobinina, que favorece sua extração utilizando etanol como solvente e à maior polaridade do ácido *p*-cumárico e canferol, que favorece a extração utilizando metanol como solvente (**Figura 82**).

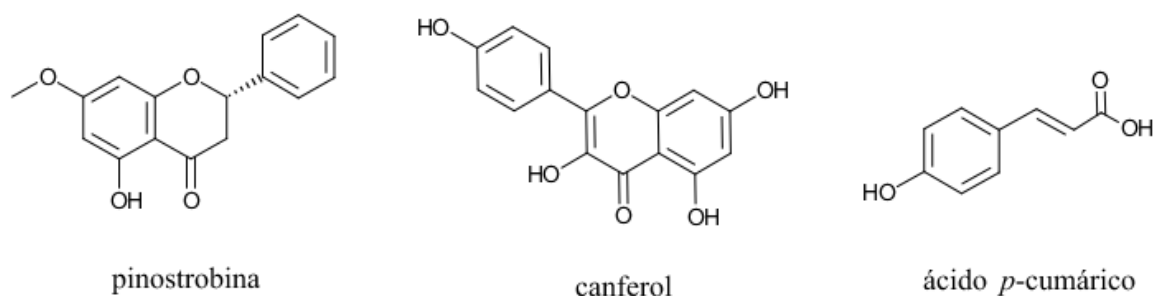


Figura 82. Estrutura da pinostrobin, canferol e ácido *p*-cumárico.

A análise exploratória dos dados das substâncias quantificadas por CLAE-DAD se mostrou uma ferramenta útil na obtenção de informações sobre os diferentes tipos de própolis, no caso deste trabalho da própolis marrom e verde e os solventes usados na extração da própolis bruta. Através da análise dos gráficos de *loadings* das amostras foi possível estabelecer relações entre tipo de própolis/solvente extrator e as substâncias identificadas e quantificadas nos extratos.

6. CONCLUSÕES

A extração metanólica por maceração dinâmica (EMP-MD) apresentou maior rendimento à temperatura ambiente.

Os teores de ceras mostraram oito amostras estão de acordo o limite exigido pela legislação (valores entre **1,69 % e 11,65 %**) e apenas as amostras **P8** e **P9** estão acima do limite permitido.

Os teores de bálsamos e os dados espectrais do UV-VIS obtidos para todos os extratos de própolis estão de acordo com a legislação e corrobora com a presença de substâncias fenólicas.

Para os teores de fenólicos totais (TP) dos **EEP** e dos **EMP** a extração por maceração dinâmica em temperatura ambiente e com aquecimento (**MDAQ**) apresentaram os maiores valores (**10,08 ± 2,9** e **11,63 ± 2,78**, respectivamente). Já para os teores de flavonoides (TF) dos **EEP** a extração por ultrassom (**US**) apresentaram maiores valores (**5,86 ± 2,28** mgEq/100mg), já os **EMP** a extração por maceração dinâmica em temperatura ambiente e com aquecimento (**MDAQ**) apresentaram os maiores valores (**9,06 ± 2,03** mgEq/100mg).

Os maiores valores de capacidade antioxidante para os três métodos utilizados: DPPH, FRAP e ABTS⁺ foram observados, de modo geral nos **EMP**, assim como os **TP** e **TF**;

O perfil químico qualitativo dos extratos própolis **EEP** e **EMP** foram semelhantes e as principais substâncias identificadas foram : clorogênico, cafeico, ferulico, *p*-cumárico, e rosmarínico, além dos flavonóides pinobanksina, canferol e canferide.

O perfil quantitativo demonstrou que a extração por (**MDQA**) extraiu maior quantidade de substâncias fenólicas para os **EEP**; já para os **EMP** foi a extração por (**MD**). Dentre as substâncias fenólicas quantificadas nos extratos de própolis marrom a que obteve maior valor foi o **canferide** tanto para os extratos **EEP** (**EEP-USI 39,58 ±14,33 mg100mg⁻¹ de extrato**) quanto para os **EMP** (**EMP-MDAQ 34,86±3,29 m100mg⁻¹ de extrato**). O que pode caracterizar o **canferide** como um biomarcador das amostras de própolis estudadas nesse trabalho.

Os ensaios realizados com *S. aureus* revelaram que todos os extratos etanólicos de própolis marrom apresentam significativa atividade antimicrobiana, o percentual de inibição variou de **36,1 a 43,8%** comparados com a ampicilina (**100% de inibição**).

Os filmes (NaCMC e NaCMC+própolis) se mostraram promissores para fins de preparo de possíveis de curativos, por ser um material barato, de fácil acesso e que pode ser utilizado como soluções poliméricas filmogênicas em sistemas de liberação controlada de fármacos ou princípios ativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFROUZAN, H.; TAHIGHI, A.; ZAKERI, S.; ES-HAGHI, A. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. **Iran Biomed J.** , v.22 (1), p.50-65, 2018.

AGUIAR, G. R.; DE LEMOS, T. L. G.; DORNELAS, C. A.; DA SILVA, A. M.; DE ALMEIDA, M. C. S.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; DE OLIVEIRA, I. R.; DO NASCIMENTO, P. G. G. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual Química**. 2018.

ALANGE, V. V.; BIRAJDAR, R. P. & KULKARNI, R. V. Novel spray dried pH-sensitive polyacrylamide-grafted-carboxymethylcellulose sodium copolymer microspheres for colon targeted delivery of an anti-cancer drug, **Journal of Biomaterials Science**. Polymer Edition, v.28, p.139-161, 2016.

ALDAY-PROVENCIO, S.; DIAZ, G.; RASCON, L.; QUINTERO, J.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; ASTIAZARAN, H.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Sonoran Propolis and Some of its Chemical Constituents Inhibit in vitro Growth of Giardia lamblia Trophozoites. **Planta Medica** , v.81(09), p.742-747, 2015.

ALMASI, H., GHANBARZADEH, B., & ENTEZAMI, A. A. Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, p.1–5, 2010.

ANDRADE, J. K. S., MARINA, D., SANTOS DE OLIVEIRA, C., NUNES, M. L., & NARENDRA, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidante activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v.101, p.129–138, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010 - Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 de agosto de 2010.

ARAÚJO, M. E. M. B. Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. **2016**.

ARAÚJO, K. S. S.; JÚNIOR, J. F. S.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M.; BARBOSA, R. S.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v.46(1), p.61-68, 2016.

ATKINS, P. W. Physical chemistry, Oxford University. Press 5^a ed., p.985-995, **1993**.

AVELINO, L. O. & SANTOS, F.A. R. The presence of Fabaceae in the pollen profile of propolis produced in northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.32, n.4, p.602-614, 2018.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.I. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v.46, n.4, p.471-474, 1983.

BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., SFORCIN, J. M., FRETE, X., KUJUMGIEV, A., MAIMONI-RODELLA, R., & POPOV, S. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, V.54(5-6), p.401–405. 1999.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**. vol. 1, p. 23–28, 2009.

BANKOVA, V.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100(1–2), p.114–117, 2005.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y. & KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p.561-71, 2001.

BARBOSA, M. S. et al. Uso da propolis no controle *in vitro* da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* causadora de mastite em vacas leiteiras. **Boletim de Indústria Animal**, v. 71, n. 2, p. 122-126, 2014.

BASAVARAJU, K. C.; JAYARAJU, J.; RAIS, S.; DAMAPPA, T. Miscibility studies os xanthan gum with gelatina in dilute solution. **Journal of Applied Polymer Science**. v.109, p.2491-2495, 2008.

BASÍLIO, J. A. D. Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Alagoas, **2018**.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology** , v.45, p.493,1966.

BAUNGRATZ, A. R. Extrato de própolis verde no controle de helmintos gastrointestinais de ovinos e caprinos: estudos *in vitro* e *in vivo*. Dissertação Mestrado em Zootecnia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, **2019**.

BITTENCOURT, M. L. F.; RIBEIRO, P. R. R.; FRANCO, R. L. P.; HILHORST, H. W. M.; CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v.76, p.449, 2015.

BOGDANOV, S. “Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, 2012” <http://www.beehexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>. Acessado em 01/05/2019

BOGDANOV, S. “Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review,” Bee Product Science, 2011, <http://www.beehexagon.net/>. Acessado em 30/05/2019

BOHNEBERGER, G.; MACHADO, M. A.; DEBIASI, M. M.; DIRSCHNABEL, A. J.; RAMOS, G. O. Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los? **Brazilian Journal of health Review**, v. 2, n. 4, p. 3504-3517, 2019.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L.; J. AM. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Oil Chem. Soc.**, v. 88, p.1387, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebens Wiss Technology (LWT)**, v.28(1), p.25–30. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001, Seção 1, 18.

BRYAN, J.; REDDEN, J.; TRABA, C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 192-198, 2015.

BURGARDT, V.C.F. Estudo das interações físico-químicas entre caseinomacropéptido e carboximetilcelulose: efeito do pH e concentração. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. **2012**.

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

CAMPOS, J. V. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Análise Morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. **2017**.

CAPANEMA, N. S. V. et al. Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1218–1234, 2018.

CARDOSO, J. B., IORIO, N. L. P., RODRIGUES, L. F., COURI, M. L. B., FARAH, A., MAIA, L. C., & ANTONIO, A. G. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. **Archives of Oral Biology**, 65, 77–81. 2016

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; SCHINEIDER, C. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, v.7, p. 2457, 2015.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v.30, p.1512-1516, 2007.

CERRUTTI, B. M.; FROLLINI, E. Carboximetilcelulose como agente de estabilização de suspensões cerâmicas. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, **2009**.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRES, A.-G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANOTIXIER, A.-S., & ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.34, p.540–560, 2017.

CHEN, M.; WEI, H.; ZHANG, C.; FANG, Y. Review: High performance liquid chromatography for the determination of flavonoids. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**. V.20, p. 313–324, 2011.

CID, Y.P. Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **2009**.

CIRASINO, L.; PISATI, A.; FASANI, F. Contact dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v.16, p.110-111, 1987.

CONTI, B.J., SANTIAGO, K.B., BÚFALO, M.C., HERRERA, Y.F., ALDAY, E., VELAZQUEZ, C., HERNANDEZ, J., SFORCIN, J.M. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **J. Pharm. Pharmacol.** v.65, p.1431-1438. 2015

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38(2), p.141–153, 2002.

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; FRANCO, S. L.; ZEOULA, L. M.; VISENTAINERA, J. V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, p.929, 2011.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I.B.; ABREU, J.A. & PARK, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**. 2006. Disponível em <http://www.apacame.org.br>; acesso em: 30 janeiro 2019.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P. & PARK, Y.K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p.435–441, 2008.

DE LUCA, M. P.; FREIRES, I. A.; GALA-GARCÍA, A.; SANTOS, V. R.; VALE, M. P.; ALENCAR, S.M. The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. **Brazilian Oral Research**, v.31, e.45, 2017.

DE-MELO, A.A.M., MATSUDA, A.H., FREITAS, A.S., BARTH, O.M. and ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

DE SOUSA, D. M. N. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.2, p.134-140, 2015.

DEMBOGURSKI, D. S. O.; TRENTIN, D. S.; BOARETTO, A. G.; RIGO, G. V.; SILVA, R. C.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food Research International**, v.111, p.661-673, 2018.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. DE A.; REBOUÇAS SILVA, J.; DA SILVA, D. F.; DA ROCHA, J. L. C.; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLOS ONE**, v.13, n.12, 2018.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. 2009.

DHARMALINGAM K. & ANANDALAKSHMI, R. Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.134, p. 815-829, 2019.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. **Biomedicine (Taipei)**, v.5(4), p. 24-28, 2015.

DJEUSSI, D. E., et al . Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrugresistant Gram-negative bacteria. **Altern. Med.**, v. 13, p. 164, 2013.

Dos SANTOS, C.G; MEGIOLARO, F.L; SERRÃO, J.E; BLOCHTEIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Hymenoptera: Meliponini) workers associated with propolis. **Morphol Histol Fine Struct**, v.102, p.137–143, 2009.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. **Phytotherapy Research**, v.30, p.1379, 2016.

FARIAS, S. S.; SIQUEIRA, S. M. C.; CRISTINO, J. H. S.; ROCHA, J. M. Biopolímeros: uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 61 - 77, 2016.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do Processamento de Alimentos - 4.ed.: Princípios e Prática. Artmed Editora. **2018**.

FELTON, L. A. Mechanism of polymeric film formation. **Internacional Journal os Pharmaceutics**, v.457, p.423-427, 2013.

FERNANDES, F.H.; GUTERRES, Z.R.; GARCEZ, W.S.; LOPES, S.M.; CORSINO. J.; GARCEZ, F.R. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v.20, p.20-26, 2014.

FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A.; FRANCO, M. C. The .in vitro.antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Ver Inst MedT**, v.49, n.2, p.93-95, 2007.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química. Nova**, v.36, n. 2, p.237-240, 2013.

FIORDALISI, S. A. L.; HONORATO, L. A.; KUHNEN, S. Variação sazonal da própolis do Sul do Brasil: screening fitoquímico, atividade antimicrobiana e efeitos em células epiteliais mamária bovina. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.56, n.1, e149146, 2019.

FIORI, A. P. S. M.; GABIRABA, V. P.; PRAXEDES, A. P. P.; NUNES, M. R. S.; BALLIANO, T. L.; SILVA, R. C.; TONHOLO, J.; RIBEIRO, A. S. Preparação e caracterização de nanocompósitos poliméricos baseados em quitosana e argilo minerais. **Polímeros**, v.24, n.5. 2014

FRANCA, J.R.; DE LUCA, M.P; RIBEIRO, T.G.; CASTILHO, R.O.; MOREIRA, A.N.; SANTOS, V.R. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC Complement Altern Med**, v.14, p.478, 2014.

FREIRES, I. A; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v.26, p.122, 2016.

FUJIMOTO, J.; REIS, E. A. O.; PETRI, D. F. S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Quim. Nova**. V.25 (5), p.757-761, 2002.

FUNARI, C. S. & FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

FURLANETTO, M. C. S. Desenvolvimento de filmes de carboximetilcelulose com nanopartículas de prata e avaliação da sua atividade antimicrobiana e toxicidade. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos- São Carlos, **2014**.

CALEGARI, M. A. Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e calibração multivariada: desenvolvimento de modelos PLS para a determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, **2018**.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: A review. *Bee World*, v.60, p.59–84, **1979**.

GHORPADE, V.S.; YADAV, A.V.; DIAS, R.J. Citric acid crosslinked β -cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs, *Carbohydr. Polym.*, v.164, p.339-348, 2017.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. **Química Nova**, v.34, n.7, p. 1215-1223, 2011.

GORGIEVA, S., & KOKOL, V. Synthesis and application of new temperature-responsive hydrogels based on carboxymethyl and hydroxyethyl cellulose derivatives for the functional finishing of cotton knitwear. Carbohydrate **Polymers**, v.85(3), p.664–673, 2011.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 76-82, 2010.

GUPTA, A. P.; GOPAL, A. Preparation and characterization of guar gum/polyvinylalcohol. **Journal of Materials Science and Engineering**, v.3, p.28-33, 2001.

HADDAD KASHANI, H; SCHMELCHER, M.; SABZALIPOOR, H.; SEVED HOSSEINI, E.; MONIRI, R. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Current status of research and novel delivery strategies. **Clinical microbiology reviews**, v.31, n.1, e.00071-17, 2018.

HARFOUCH, R. M.; MOHAMMAD, R.; SULIMAN, H. Antibacterial activity of syrian propolis extract against several strains of bacteria in vitro. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.6, p. 42-46, 2017.

HELFENBERG, K.D. The analysis of beeswax and propolis. **Chemiker Zeitungum**, v.31, p. 987-988, 1908.

HOJO, P. A. Extração de compostos bioativos de própolis verde por alta pressão isostática. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2017**.

INOUE, H.T.; DE SOUSA, E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v.15(2), p. 65-69, 2007.

IOIRISH N. As Abelhas: Bees: Pharmaceutical with Wings. Editora Mir: Moscou; **1982**.

ISHIDA, V. F. C.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; BANDEIRA, M. F. C. L.; A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chem**, v.125, p.966, 2011.

IULIU, P. Patente n. RO 48101, **1965**.

KACHA-ANANDA, S.; TRAGOOLPUA, K.; CHANTAWANNAKUL, P. TRAGOOLPUA, Y. Antioxidant and Anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. Asian Pacific **Journal of Cancer Prevention**, v.14, n.11, p.6991-6995. 2013.

KALIL, K. M.; DE VILLIERS, A. Review: Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**, v.34:8, p.854–876, 2011.

KAMEL, S. et al. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. **Express Polymer Letters**, v. 2, n.11, p. 758–778, 2008.

KLAHR, G. T.; ISOLA, J. V. V.; GIEHL, D. Z.; ROSA, C. S.; MARTINS, A. A.; BARTMER, M. E.; SEGABINAZZI, L. R. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis contra bactérias causadoras de mastite em bovinos. **Revista Biotemas**, v.32, n. 1, p. 1-10, 2019.

KOKABI, M.; SIROUSAZAR, M.; HASSAN, Z. M. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. **European polymer journal**, v. 43, n. 3, p. 773-781, 2007.

KOTHAI, S.; JAYANTHI, B. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee propolis (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu, India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vl 6, s.8, 2014.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y.U., BANKOVA, V., CHRISTOV, R. & POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

LEHMBERG, L.; DWORSCHAK, K.; BLÜTHGEN, N. Defensive behavior and chemical deterrence against ants in the stingless bee genus *Trigona* (Apidae, Meliponini). **J Apicult Res**, v.47, p.17–21, 2008.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41 (2), p.143-154, 2005.

LUSTOSA SR, GALINDO AB, NUNES LCC, RANDAU KP, ROLIM NETO PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p.447-454, 2008.

LUZ, L. P. Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **1998**.

MACHADO, B. A. S; SILVA, R. P. D; BARRETO, G. A; COSTA, S. S, SILVA, D. F, BRANDÃO, H. N.; ROCHA, J. L. C; DELLAGOSTIN, O. A; HENRIQUES, J. A. P; UMSZA-GUES, M. A; PADILHA, F. F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, v.11, n.1, e.0145954, 2016.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. M.; DE LIRA, T. O.; DE OLIVEIRA, F. C. E.; CARDOSO, M. V.; FERREIRA, R. G.; TORRES, Y. R. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

MAGALHÃES, T. V.; LOT, R. F. E.; DEL CARRATORE, C. R. Análise da ação antibacteriana da própolis e padronização de volumes através de antibiograma. **Unimar Ciências**, v. 25, n.1-2, p. 38-44, 2016.

MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; ARAÚJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia plena**, v.7, p.1, 2011.

MANRIQUE, A.J. & SOARES, A.E.E. Início de um programa de seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel. **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 312-316, 2002.

MARCUCCI MC. Própolis: a chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. et al. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Revista Fitos**, vol.1, n.3,p.36-46, 2007.

MARCUCCI, M. C; CUSTÓDIO, Â. R. Própolis: Correlação Química e Biológica. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, p.1-23, 2002.

MARCUCCI MC. Use of propolis in the cosmetic industry. **Aerosol e Cosméticos**. **1996**

MARTINEZ, C. M. F. Obtenção e caracterização de materiais absorventes através da carboximetilação de polpa etanol/água de medula de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação. Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, **1996**.

MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of Artepillin C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v.19, s.2, p.179-183, 2008

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic própolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.533-539, 2010.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.577-599, 2000.

MIRANDA, V. R.; CARVALHO, A. J. F. de. Blendas compatíveis de amido termoplástico e polietileno de baixa densidade compatibilizadas com ácido cítrico. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 353-360, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarín **J. Sci. Technol.**, v.26, n. 2, p.211-219, 2004.

MONTI, M., BERTI, E., CARMINATI, G., CUSINI, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v.9, p.163, 1983.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C. et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 978-984, 2012.

MOSELEY, R.; WALKER, M.; WADDINGTON, R. J.; CHEN, W. Y. J. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials—carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. **Biomaterials**, v.24 (9), p.1549-1557, 2003.

MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMEENDJARI, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. **Industrial Crops and Products**, v.88, p. 85-90, 2016.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95-111, 2004.

NINA, N., QUISPE, C., JIMÉNEZ-ASPEE, F., THEODULOZ, C., FERESÍN, G.E., LIMA, B., LEIVA, E. and SCHMEDAHIRSCHMANN, G. Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, Central Chile. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 1-24, 2015.

NOGUEIRA, S. A.; SANTOS, D. C.; INÁCIO, M. C. P.; REZENDE, R. M.; CARVALHO, A. F. S.; CASTRO, G. A. C.; FREITAS, A. S. Utilização de própolis verde na cicatrização de lesões cutâneas em ratos . **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.16, n. 3, p. 1-6 2018.

NUNES, L.C.; GALINDO, A.B.; DE DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; CITÓ, A.M.G.L.; ROLIM NETO, P.J. Seasonal variability of the constituents of propolis and bioactivity in saline Artermia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2009.

OLEGÁRIO, L. S.; ANDRADE, J. K. S.; ANDRADE, G. R. S.; DENADAI, M.; CAVALCANTI, R. L.; DA SILVA, M. A. A. P.; NARAIN, N. Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. **Food Research International**, v.123, p. 481-502, 2019.

OLIVEIRA, R. N.; MOREIRA, A. P. D.; THIRÉ, R. M. S. M.; QUILTY, B.; PASSOS, T. M.; SIMON, P.; MANCINI, M. C.; MCGUINNESS, G. B. Absorbent polyvinyl alcohol-

sodium carboxymethyl cellulose hydrogels for propolis delivery in wound healing applications. **Polymer Engineering & Science**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

ORYAN, A. ; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potencial role of propolis in wound healing: biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.98, p.469-483, 2018.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. **Revista Matéria**, v.19, n.01, p. 24-32, 2014.

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**, v. 10, p. 537-544, 2014.

PAPOTTI, G., BERTELLI, D., ROSSI, M.C., PLESSI, M. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.1610–1618, 2010.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; BORTOLOTTI, L.; PLESSI, M.; Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, p.2852, 2012.

PAPOTTI, G., BERTELLI, D., ROSSI, M. C., PLESSI, M. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.1610, 2010.

PARK, Y. K, ALENCAR, S. M, AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2502, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, p.85, 2000.

PATRICIO, E.F; CRUZ-LOPEZ, L.; MAILE, R.; TENTSCHERT, J.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D . The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. **J Insect Physiol**, v.48, p.249–254, 2002.

PAULINO, F.D.G. Produtos da colmeia. In: D.C. Souza, (ed.), Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural. **SEBRAE**, 2004.

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

PEREIRA, D. S; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, J. B. A; SILVA, R. A.; SILVEIRA, D. C. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, 2015.

PETER, C. M.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; LATOSINSKI, G. S.; LIMA, M.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. Antiviral and virucidal activity of hydroalcoholic extracts of propolis brown, green and jataí bees (*Tetragonisca angustula*) against Bovine Herpesvirus Type-1 (BoHV-1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.667, 2017.

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., & MORAES, Â. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p.957-971, 2015.

POPOVA, M. P., BANKOVA, V. S., BOGDANOV, S., TSVETKOVA, I., NAYDENSKI, C., MARCAZZAN, G. L., & SABATINI, A. G. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. **Apidologie**, v.38, p.306–311, 2007.

PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; GUERRA, R. C.; BATISTA, H. L.; FERNANDES, C. H. C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v.6, p.1, 2013.

PROBST, I.S.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JR., A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural product. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p. 159-167, 2011.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.

ROCHA, C. S. Aplicação de análise estatística multivariada no estudo de propriedades da própolis. Monografia (Graduação), Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Departamento de Farmácia, **2018**.

RODRIGUES, L. M.; DE OLIVEIRA, B. G. R. B.; DE CASTILHO, S. R.; FUTURO, D. O. Segurança e eficácia do hidrogel de carboximetilcelulose à 2% em úlceras de perna. **Journal of Research Fundamental Care Online**, v.5(4), p.690-95, 2013.

ROSA, J. M.; ARIOLI, C. J.; NUNES-SILVA, P.; GARCIA, F. R. M. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação? **Revista de Ciências Agroveterinárias**. V.18, p.1, 2019.

ROUBIK, D.W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v.37, p.124–143, 2006.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, **J Food Sci Technol.**, v.47(6), p.587–597, 2010.

SALATINO A, TEIXEIRA EW, NEGRI G AND MESSAGE D, Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v.2, p.33–38, 2005.

SALATINO, A.; FERNANES-SILVA, C.C.; RIGHI, A.A.; SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v.28, n.5, p.925-936, 2011.

SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANE, V. M. & Castro, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. **Quim. Nova**, v. 37, n. 5, p.821-826, 2014.

SALGUEIRO, F.B. Tese de Doutorado. Caracterização da própolis verde brasileira: Substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica. Seropédica – RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2016**.

SALLEH, K. M.; ZAKARIA, S.; SAJAB, M. S.; GAN, S.; KACO, H. Superabsorbent hydrogel from oil palm empty fruit bunch cellulose and sodium carboxymethylcellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.131, p.50-59, 2018.

SANNINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. **Materials**, v.2(2), p.353-373, 2009.

SANTOS, F. H. P.; REIS, A. S.; SILVA, J. F.; JUNIOR, B. R. S.; SILVA, S. B.; ANDRÉ, A. C. G. M.; LIMA, A. F. Avaliação antibacteriana dos extratos hexânico e metanólico de própolis vermelha encontrada no município Barra de Santo Antônio/AL. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n.3, p. 33-44, 2015.

SANTOS, E. L., MAIA, B. H. L. N. S., FERRIANI, A. P., & TEIXEIRA, S. D. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. **Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health**, p.3-16, 2017.

SANTOS, C. M.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, H. F.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, B. D.; SOUZA, K. P.; CAROLLO, C. A.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geoprópolis produced by *Melipona quadrifasciata anthioides*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p.1-13, 2017.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; SALAS-CORONADO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**, p.1-15, 2019.

SAWAYA, A. C. H. F., SOUZA, K. S., MARCUCCI, M. C., CUNHA, I. B. S., SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of Brazilian Propolis extracts and evaluation of their *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, 2011.

SEBRAE, Agronegócios: produção de própolis/ produção de própolis na Bahia. 2017. www.sebrae2014.com.br – acessado em 30/06/19.

SELIGRA, P. G.; JARAMILLO, C. M.; FAMÁ, L.; GOYANES, S. Biodegradable and nonretrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 66 – 74, 2016.

SELVARAJ, RAJINI et al. Phytochemical profiling and antibacterial activity of propolis. **International journal of scientific research**, v. 7, n. 6, 2018.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.1–14. 2007.

SHAHIDI, F., & YEO, J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.3, p.1-16, 2018.

SHI, R.; BI, J.; ZHANG, Z.; ZHU, A.; CHEN, D.; ZHOU, X.; ZHANG, L.; TIAN, W. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature, **Carbohydr. Polym.**, v.74, p.763-770, 2008.

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **J. of Agric. Food Chem.**, v.40, p.945–948, 1992.

SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; WALTHERB, M.; MACRAEB, R. J.; BODMEIRCA, R. Review Polymer blends for controlled release coatings. **Journal of Controlled Release**, v.125, p.1-15, 2008.

SILVA, R.P.D., MACHADO, B.A., BARRETO, G.A., COSTA, S.S., ANDRADE, L.N., AMARAL, R.G., CARVALHO, A.A., PADILHA, F.F., BARBOSA, J.D. and UMSZAGUEZ, M.A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, v.12, n.3, p.1-18, 2017.

SILVA, F. R. G., MATIAS, T. M. S., SOUZA, L. I. O., MATOS-ROCHA, T. J., FONSECA, S. A., MOUSINHO, K. C., & SANTOS, A. F. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p. 452-459, 2018.

SILVA, R.A., RODRIGUES, A.E., RIBEIRO, A.C.M., CUSTÓDIO, A.R., ANDRADE, N.E.D., PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p.1842-1848, 2006.

SILVA, S. G.; BIESKI, I. G. C. A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. **Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**, v. 1, n. 1, p. 1 - 156, 2018.

SILVA, G. T. Blendas poliméricas de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose com aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos. Dissertação de Mestrado, UFPB/CCEN, 2016.

SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO, L. M. S. S. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos das Cascas de Lichia Peels (Litchi Chinensis Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.18, n.1, 2016.

SILVA, R. A. Retração cicatricial de feridas cutâneas induzidas e posteriormente tratadas separadamente com mel, própolis e copaíba em bubalinos. Orientador: Rinaldo Batista Viana. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém, PA, **2019**.

SIMONE-FINSTROM, M., & SPIVAK, M. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v.41, p.295–311, 2010.

SINGH, B., KUMAR, A., & MALIK, A. K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.38, n.6, p.820-832, 2017.

SINHÁ, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMIRIA, R., BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. **Int. J. Pharm**, v.274, p.1-3, 2004.

SOARES, S. H. Hidrogéis de Carboximetil Celulose Sódica Carregados com Óleos Bioativos e Ureia Para o Tratamento de Feridas / Silvane Holanda Soares. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, **2019**.

SOUSA, A. K. A. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha no semiárido paraibano sobre *streptococcus pyogenes*. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Sistemas Agroindustriais, Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, **2018**.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn.**, v.17, p.85-93, 2007.

STALIKAS, C. D. Review: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids . **Journal of Separation Science**, v.30, p.3268 – 3295, 2007.

STUPER-SZABLEWSKA, K., & PERKOWSKI, J. Phenolic acids in cereal grain: Occurrence, biosynthesis, metabolism and role in living organisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, n.4, p.664-675, 2017.

TAYLOR, R. F.; SCHULTZ, J. S. **Handbook of chemical and biological sensors**. Taylor & Francis: British, 1996.

TAZAWA, S.; ARAI, Y.; HOTTA, S.; MITSUI, T.; NOZAKI, H.; ICHIHARA, K. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **Nat Prod Commun**, v.11, n.2, p.201-205, 2016.

TEIXEIRA, E.W., MESSAGE, D., MEIRA, R.M.S.A. & SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis, importância e perspectivas. Revisão bibliográfica. **Boletim da Indústria Animal**, v.60, p.83-107, 2003.

TORETI, V. C.; SATO, H. H; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

TORRES, A. R.; SANDIO, L. P.; FRIEDEMANN, M. T.; TOMAZZOLI, M. M.; MARASCHIN, M.; MELLO, C. F.; SANTOS, A. R. S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.51, n.6, p.1-10, 2018.

TRUSHEVA, B., TRUNKOVA, D., & BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v.7,p.1 –13, 2007.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Efeito Antimicrobiano “in vitro” de Extrato Alcoólico de Própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 159-163, 2004.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. V.30, p.1323-1338, 2007.

VILELA, D. D. Hidrogel de carboximetilcelulose de sódio e própolis: desenvolvimento e caracterização. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia, EESC/FMRP/IQSC, da Universidade de São Paulo, São Carlos, **2010**.

VILLANOVA, J. C. O; ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20 (1), p.51-64, 2010.

WALLER, S.B; PETER, C.M.; HOFFMANN, J.F.; PICOLI, T.; DA G. OSÓRIO, L.; CHAVES, F.; ZANI, J.L.; DE FARIA, R.O.; DE MELLO, J.R.B.; MEIRELES, M.C.A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017.

WANG, J., XU, J., GONG, X., YANG, M., ZHANG, C., & LI, M. Biosynthesis, Chemistry, and Pharmacology of Polyphenols from Chinese *Salvia* Species: A Review. **Molecules**, 2019.

WARING, M. J. & PARSONS, D. Physico-chemical characterization of carboxymethylated spun cellulose fibres. **Biomaterials**, v. 22, p. 903-012, 2001.

WOISKY R.G. & SALATINO A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99-105, 1998.

WOJTYCZKA, R. D. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9623-9640, 2013.

XU, H.; CHEN, G.; JIN, R.; CHEN, D.; WANG, Y.; PEI, J. Green synthesis of Bi₂Se₃ hierarchical nanostructure and its electrochemical properties. **The Royal Society of Chemistry**, v.4, p.8922–8929, 2014.

YÁNEZ-S, M.; MATSUHIRO, B.; MALDONADO, S.; GONZÁLEZ, R.; LUENGO, J.; UYARTE, O.; SERAFINE, D.; MOYA, S.; ROMERO, J.; TORRES, R.; KOGAN, M. J. Carboxymethylcellulose from bleached organosolv fibers of *Eucalyptus nitens*: synthesis and physicochemical characterization. **Cellulose**, v. 25, n. 5, p. 2901-2914, 2018.

YEO, K. L.; LEO, C. P.; CHAN, D. J. C. Ultrasonic enhancement on propolis extraction at varied pH and alcohol content. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 562-570, 2015.

YU, Q., et al. Effects of Yili dark bee propolis on oral cariogenic biofilm in vitro. **West China journal of stomatology**, v. 33, n. 4, p. 343-346, 2015.

ZEIGHAMPOUR, F.; ALIHOSSEINI, F.; MORSHED, M.; RAHIMI, A. A. Comparison of prolonged antibacterial activity and release profile of propolis-incorporated PVA nanofibrous mat, microfibrinous mat, and film. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 6, p.45794, 2018.