

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

DISSERTAÇÃO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA (*Trypanosoma cruzi*) DE
DERIVADOS PRENILADOS DA PRÓPOLIS VERDE**

LUCAS DE OLIVEIRA PIRES

2019



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

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA (*Trypanosoma cruzi*) DE
DERIVADOS PRENILADOS DA PRÓPOLIS VERDE**

LUCAS DE OLIVEIRA PIRES

**Sob a Orientação da Professora
Dra. Rosane Nora Castro**

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em
Química, no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área
de Concentração Química

Seropédica, Rio de Janeiro
Março 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)

P667i Pires, Lucas de Oliveira, 1994-
Isolamento, caracterização e avaliação da atividade
antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de derivados
prenilados da própolis verde. / Lucas de Oliveira
Pires. - 2019.
124 f.: il.

Orientadora: Rosane Nora Castro.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Química/PPGQ - Seropédica, 2019.

1. Química orgânica . 2. Própolis verde. 3.
Substâncias preniladas . 4. Antioxidantes . 5.
atividade antiparasitária. I. Castro, Rosane Nora,
1965-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Química/PPGQ - Seropédica III. Título.

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

LUCAS DE OLIVEIRA PIRES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/03/2019

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

Profa Dra. Claudia Moraes de Rezende (IQ-UFRJ)

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Sônia e Amariudo, que sempre me deram suporte para que eu pudesse prosseguir com meus objetivos. Aos meus irmãos queridos, Karine e Ramon, pela amizade e companheirismo.

À professora Rosane Nora Castro pelas maravilhosas aulas que mudaram minha perspectiva sobre a Química Orgânica, por ser uma orientadora sempre presente e por ter me ensinado tudo o que eu aprendi nesses anos de mestrado.

À professora Débora Decoté Ricardo Lima (Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – IV-UFRRJ) e seu grupo, em especial os alunos Douglas Alcântara e Paulo Pitasse pela realização dos ensaios biológicos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial Cedric Graebin, Márcia Cristina e Mário Geraldo de Carvalho, que contribuíram para o meu crescimento profissional, e conseqüentemente para a realização desse trabalho.

À Juliana Leme por me ensinar pacientemente cada ensaio laboratorial, me acompanhando desde a iniciação científica. Aos ICs Roberta Mota e Rafael Santos por me acompanharem na realização de vários dos experimentos presentes neste trabalho.

Ao professor Marco Edilson por toda contribuição que foi dada ao longo desses anos de pesquisa, e aos demais colegas de trabalho que tornaram a convivência no laboratório 48b sempre muito agradável.

Ao Vítor Santiago por continuar sempre do meu lado, por ser o melhor amigo que eu poderia ter na ciência e na vida e, principalmente, por nunca ter me deixado desistir.

À Dominique Aquino, Gabriela Guida e Marina Lima por todo apoio que eu recebi durante esses anos de trabalho, e acima de tudo pela amizade que vamos continuar a cultivar.

Aos amigos Isac Marinho, Patrícia Almeida, Patrícia Dormeira, Carol Gurski, Gabriela Souza e Iuri Cardoso por todos os momentos de diversão (e desespero) que tornaram esse caminho menos difícil.

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

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

À FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

PIRES, Lucas de Oliveira. **Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de derivados prenilados da própolis verde**. 2019. 124p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A própolis é um produto natural resinoso elaborado pelas abelhas melíferas a partir de diferentes partes das plantas, como brotos e flores. Sua composição química é muito complexa e depende de fatores como clima, sazonalidade, solo, vegetação e também da espécie da abelha produtora. A própolis atualmente tem sido apontada como uma importante fonte de substâncias bioativas por conta do seu elevado potencial biológico, com atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antitumoral, antiparasitária e antioxidante. Neste trabalho foram preparados extratos etanólicos e hexânicos a partir de três amostras de própolis verde, obtidas em diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro. A qualidade desses extratos foi avaliada a partir de métodos colorimétricos para a determinação do teor de substâncias fenólicas – teor de fenólicos totais e flavonoides totais – e da capacidade antioxidante através da captura dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS⁺), além da capacidade redutora do íon férrico (FRAP – *ferric reducing antioxidant power*). O perfil químico dos extratos foi avaliado através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) com fase reversa (C-18). Os componentes bioativos ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3-prenil-4-[(3-fenilpropanoilo)oxi]-cinâmico (bacarina) e ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromano-5-propenoico foram isolados a partir do extrato hexânico de própolis verde através de duas etapas cromatográficas: fracionamento em coluna *flash* do extrato bruto utilizando clorofórmio: acetona, com gradiente crescente de polaridade, seguido da purificação das frações de interesse por CLAE-UV semipreparativa, tendo como solvente a mistura binária metanol: água em gradiente crescente de concentração. Todos os constituintes isolados foram caracterizados por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C), espectrometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), e o teor desses componentes dos extratos brutos foi quantificado por CLAE-DAD. A atividade antiparasitária da própolis verde e de seus princípios ativos foi avaliada frente às formas infectivas (tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, parasito responsável por causar a doença de Chagas.

Palavras chaves: polifenóis, antioxidantes, Artepillin C, atividade tripanocida, biomarcador.

ABSTRACT

PIRES, Lucas de Oliveira. **Isolation and characterization of phenolic compounds from Brazilian green propolis with antiparasitic (*Trypanosoma cruzi*) activity**. 2019. 124p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Propolis is a resinous natural product elaborated by honeybees from different parts of plants, such as shoots and flowers. Its chemical composition is very complex and depends on factors such as climate, seasonality, soil, vegetation and also the bee species. Propolis has currently been identified as an important source of bioactive compounds due to its high biological potential, with anti-inflammatory, antibacterial, antitumoral, antiparasitic and antioxidant activities. In this work, ethanolic and *n*-hexanic extracts were prepared from three samples of green propolis obtained in different regions of Rio de Janeiro. The quality of these extracts was evaluated using colorimetric methods for the determination of the total phenolic content – total phenolic and flavonoid contents – and also the antioxidant capacity was evaluated by capturing organic free radicals (DPPH and ABTS), as well as the ferric reducing antioxidant power (FRAP). The qualitative chemical profile of the extracts was evaluated through HPLC-PDA analysis, and the influence of the solvent polarity on the extraction profile was studied. The bioactive compounds 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C), 3-prenyl-4-[(3-phenylpropanoil)-oxy]-cinnamic acid (Baccharin) and 2,2-dimethyl-8-prenylcrotonic acid were isolated from the *n*-hexane extract by two chromatographic steps: fractionation of crude extract using the mixture of solvents chloroform/acetone in increasing gradient concentration, followed by purification of fractions of interest by HPLC-UV in semipreparative scale, using the mixture methanol/water in increasing gradient concentration. All the isolated constituents were characterized by NMR (¹H and ¹³C), UV spectra and CG-MS techniques, and the content of these components in the crude extract was quantified through HPLC-PDA in reverse phase. The antiparasitic activity of green propolis and its active principles was evaluated against tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, the parasite responsible for causing Chagas' disease.

Keywords: polyphenolics, antioxidant, Artepillin C, trypanocidal activity, biomarker.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades farmacológicas atribuídas à própolis nas suas primeiras décadas de estudo (adaptado de PEREIRA et al., 2003).	6
Tabela 2 – Parâmetros de qualidade da própolis bruta e extrato hidroalcoólico de acordo com a legislação em vigor (BRASIL, 2001)	9
Tabela 3 – Própolis de diferentes regiões geográficas e sua origem botânica (TORETI et al., 2013).....	10
Tabela 4 – Classificação da própolis brasileira de acordo com a coloração do extrato hidroalcoólico (TORETI et al., 2013)	13
Tabela 5 – Classificação de substâncias fenólicas quanto ao esqueleto básico de sua estrutura (CHEYNIER et al., 2013).....	23
Tabela 6 – Derivados dos ácidos cinâmico e benzóico	24
Tabela 7 – Propriedades biológicas estudadas recentemente na própolis verde.	28
Tabela 8 – Substâncias fenólicas presentes na própolis verde que apresentam propriedades biológicas (adaptado de TORETI et al., 2013).	29
Tabela 9 – Amostras de própolis verde bruta estudadas neste trabalho.	46
Tabela 10 – Rendimento dos extratos <i>n</i> -hexânicos e etanólicos de própolis verde, obtidos por Soxhlet (6 horas).	58
Tabela 11 – Resultados para a avaliação de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS, FRAP e DPPH.....	64
Tabela 12 – Variação dos teores de fenóis totais e flavonoides para própolis de diferentes regiões brasileiras (adaptado de MELLO et al., 2012).	65
Tabela 13 – Rendimento do Artepillin C obtido do extrato de própolis de acordo com a literatura.....	72
Tabela 14 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do Artepillin C (CDCl ₃) comparados com dados da literatura.....	74
Tabela 15 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da Bacarina (CDCl ₃) comparados com dados da literatura.....	79
Tabela 16 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do cromoeno (CDCl ₃) comparados com dados da literatura.....	83

Tabela 17 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da drupanina (CDCl_3) comparados com dados da literatura.....	87
Tabela 18 – Tempo de retenção e máximo de absorção das substâncias fenólicas utilizadas como padrões nas análises por CLAE-DAD	91
Tabela 19 - Resultados dos ensaios biológicos de atividade tóxica contra formas infectivas de <i>T. cruzi</i> e atividade citotóxica.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Abelha operária coletando material para a elaboração de mel e própolis (Fonte: Louise Docker, imagem retirada do Flickr).....	1
Figura 2 – Principais produtos elaborados pelas abelhas melíferas: favos de mel (à esquerda) e própolis bruta (à direita).	3
Figura 3 – Abelha operária <i>Apis mellifera</i> (europeia).	4
Figura 4 – Aumento do número de publicações sobre própolis ao longo do tempo (Fonte: Scopus. Pesquisa feita em 11/02/2019).	7
Figura 5 – Estrutura do cafeato de fenetila (CAPE), principal componente da própolis produzida em zonas temperadas.	11
Figura 6 – No Brasil, diversas regiões fitogeográficas produzem própolis com características distintas. Imagem: Prof. Nivaldo Paulino, Universidade Anhanguera – SP.	12
Figura 7 – Placas de própolis bruta de diferentes regiões do Brasil: própolis verde da região Sudeste (a), própolis vermelha da região Nordeste (b) e própolis marrom da região Sul (c)..	13
Figura 8 – Abelha melífera (africanizada) coletando alecrim-do-campo para a elaboração da própolis verde (Fonte: Michel Stórquio Belmiro).	15
Figura 9 – Estrutura dos biomarcadores ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), e 3-prenilcinamato de alila, proposto por Nascimento e colaboradores (2008).	16
Figura 10 – Sesquiterpenos mais abundantes identificados na própolis verde.	18
Figura 11 – Flavonoides frequentemente identificados na própolis verde. (PARK et al., 2004; CHANG et al., 2008; HISANORI et al., 2011; SALGUEIRO e CASTRO, 2016; ANDRADE et al., 2017).....	19
Figura 12 – Derivados prenilados do ácido cinâmico encontrados na própolis verde(KUMAZAWA et al., 2003; NEGRI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005; CHENG et al., 2008; TAVARES et al., 2010; FÁVARO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017).	20
Figura 13 – Derivados heterocíclicos e ésteres identificados na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; CHANG et al., 2008; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).	21
Figura 14 – Derivados do ácido quínico encontrados na própolis verde.	22
Figura 15 – Núcleo básico de um flavonoide e seus diferentes sistemas aromáticos.	26
Figura 16 – Sítios de quelação de metais possíveis em um flavonoide (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).	34

Figura 17 – Radicais DPPH e ABTS utilizados para determinar a capacidade antioxidante, e o complexo de Fe (III) utilizado no ensaio FRAP.	35
Figura 18 – Derivados do ácido benzóico que possuem atividade antioxidante frente ao radical DPPH.	36
Figura 19 – Ciclo simplificado de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.	37
Figura 20 – Fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas.	40
Figura 21 – Estruturas dos derivados da própolis verde com atividade antiparasitária (Marcucci et al., 2011).	45
Figura 22 – Amostra de própolis verde bruta e pulverizada (arquivo pessoal).	46
Figura 23 – 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	48
Figura 24 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) versus a absorvância (Y), construída para a análise de flavonóides totais a partir do padrão comercial de quercetina	49
Figura 25 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) versus a absorvância (Y), construída para a análise de FRAP a partir do padrão comercial de FeSO₄.7H₂O	51
Figura 26 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) versus a absorvância (Y), construída para a análise de ABTS a partir do padrão comercial de Trolox	52
Figura 27 – Espectros de absorção na região do UV-vis para os extratos de própolis verde preparados em <i>n</i> -hexano (EHP) e álcool etílico (EEP).	61
Figura 28 – Sobreposição dos cromatogramas EEP-2 (preto) e EHP-2 (rosa) obtidos por CLAE-DAD.	70
Figura 29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV para a purificação da fração de própolis verde.	71
Figura 30 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato e as substâncias isoladas da própolis verde: EHP-2 (preto), Artepillin C (rosa), Bacarina (azul) e Cromeno (marrom).	72
Figura 31 – Estrutura dos derivados prenilados avaliados neste trabalho. CE ₅₀ em µg.mL ⁻¹	73
Figura 32 – Espectro de ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) do Artepillin C com suas devidas atribuições.	76
Figura 33 – Espectro de ¹³ C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl ₃) do Artepillin C com suas devidas atribuições.	77
Figura 34 – Espectro de massas do Artepillin C.	78

Figura 35 – Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) da bacarina com suas devidas atribuições.....	81
Figura 36 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) da bacarina com suas devidas atribuições.	82
Figura 37 – Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) do cromeno com suas devidas atribuições.....	85
Figura 38 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) do cromeno com suas devidas atribuições.	86
Figura 39 – Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) da drupanina com suas devidas atribuições.....	89
Figura 40 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) da drupanina com suas devidas atribuições.	90
Figura 41 – Teor (em mg por 100 mg de extrato) dos derivados prenilados presentes nos extratos de própolis verde.....	92
Figura 42 – Médias das células viáveis de <i>T. cruzi</i> após o tratamento com o extrato <i>n</i> -hexânico de própolis em várias concentrações. Extrato bruto em azul, Bacarina em laranja e Artepillin C em cinza.....	95
Figura 43 – Médias das células viáveis (LLC-MK2) após o tratamento com o extrato <i>n</i> -hexânico de própolis, Artepillin C e Bacarina em várias concentrações. Extrato bruto em azul, Bacarina em laranja e Artepillin C em cinza.	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Representação geral para a biossíntese de ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (CHEYNIER et al., 2013; HELENO et al., 2015).	25
Esquema 2 – Representação geral para a biossíntese de flavonoides (WINKEL, 2006; CHEYNER et al., 2013).	27
Esquema 3 – Estruturas de ressonância que estabilizam um radical fenólico (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).	33
Esquema 4 – Hidrólise alcalina da bacarina em meio não aquoso.	54
Esquema 5 – Proposta de fragmentação que justifica a estrutura do Artepillin C.	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%AA	Percentual de atividade antioxidante
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀ /IC ₅₀	Concentração efetiva para redução de 50% de atividade
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-EM	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
DMEM-SVF	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SBF	Soro fetal bovino
MTT	3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PCA	Análise por componentes principais
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TEAC	Capacidade antioxidante de equivalente em trolox
TPTZ	2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina
PMS	Metassulfato de fenazina
t _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível
TA	Temperatura ambiente

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de tabelas	iii
Lista de figuras	v
Lista de esquemas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. A própolis	3
2.2. Biodiversidade da própolis	10
2.2.1. Origem botânica da própolis verde.	10
2.2.2. Composição química da própolis verde.	17
2.3. Biossíntese de substâncias fenólicas.	22
2.4. Propriedades biológicas da própolis e seus constituintes.	27
2.5. A doença de Chagas.	36
2.5.1. Aspectos gerais da doença.	36
2.5.2. Tratamento da doença de Chagas.	39
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo geral.	44
3.2. Objetivos específicos.	44
4. PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1. Materiais e métodos.	45
4.2. Amostras de própolis estudadas.	46
4.3. Preparo dos extratos de própolis verde.	46
4.4. Análise dos extratos de própolis por espectrofotometria na região do UV-vis. .	47
4.5. Determinação do teor de fenólicos totais.	47
4.6. Determinação do teor de flavonoides totais.	48

4.7. Determinação da capacidade antioxidante: sequestro de radicais livres DPPH..	49
4.8. Determinação da capacidade antioxidante: método de redução do Fe ³⁺ .	50
4.9. Determinação da capacidade antioxidante: sequestro do radical-cátion.	52
4.10. Isolamento e purificação dos princípios ativos da própolis verde.	53
4.11. Perfil cromatográfico dos extratos de própolis verde por CLAE-DAD.	54
4.12. Ensaio de atividade antiparasitária contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	55
4.13. Ensaio de atividade citotóxica sobre células LLC-MK2.	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Extração das amostras de própolis.	58
5.2. Análise espectrofotométrica na região do UV-vis.	61
5.3. Teor de fenólicos e flavonoides totais, capacidade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos de própolis verde.	63
5.4. Isolamento e caracterização das substâncias preniladas do EHP.	69
5.4.1. Caracterização do Artepillin C	74
5.4.2. Caracterização da Bacarina.	79
5.4.3. Caracterização do Cromeno	83
5.4.4. Caracterização da Drupanina	87
5.5. Quantificação dos constituintes da própolis verde por CLAE-DAD.	91
5.6. Atividade antiparasitária e citotóxica da própolis verde.	94
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, balsâmicas e gomosas que as abelhas melíferas coletam de diversos brotos, flores e exsudados de diferentes plantas (**Figura 1**). Após a coleta, as abelhas manipulam o material vegetal dentro da colmeia acrescentando cera, pólen e secreções salivares para a elaboração do produto final, que se apresenta como um sólido com cor e odor característicos de cada vegetação e região produtora (TORETI et al., 2013).



Figura 1 – Abelha operária coletando material para a elaboração de mel e própolis.
(Fonte: Louise Docker, imagem retirada do Flickr).

A composição química da própolis é muito complexa, e pode variar de acordo com alguns fatores extrínsecos como o clima e a sazonalidade do local onde é produzido, além de depender diretamente do tipo de espécie vegetal que está sendo utilizada na sua produção (TEIXEIRA et al., 2003; PARK et al., 2004; SALATINO et al., 2011). No Brasil, as características fitogeográficas (condições climáticas, geográficas e variabilidade de espécies vegetais) são muito favoráveis para a produção de própolis, que pode chegar a até 150 toneladas de material bruto ao ano. Dentro deste contexto, a própolis verde e vermelha têm sido atualmente os destaques internacionais, sendo amplamente consumidas por países como Japão e China, locais onde o produto natural pode ser comercializado a preços bem elevados

tanto na sua forma bruta, quanto na forma de extrato hidroalcoólico (TORETI et al., 2013; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

Por conta de sua complexidade química, a própolis é considerada uma importante fonte natural de substâncias bioativas, e a investigação de sua composição química, bem como a associação com a origem botânica fornecem dados importantes sobre suas respectivas propriedades farmacológicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a composição química e as propriedades antioxidantes de três amostras de própolis verde produzidas no Estado do Rio de Janeiro. Os extratos foram preparados com *n*-hexano e etanol, e a influência da polaridade do solvente sobre o perfil químico foi avaliado por CLAE-DAD com fase reversa. Além disso, três princípios ativos foram isolados a partir do extrato *n*-hexânico e a atividade antiparasitária desses componentes, bem como do extrato bruto, foi avaliada frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, agente infeccioso que causa a doença de Chagas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A Própolis

As abelhas sociais desenvolveram, ao longo da função ecológica como agentes polinizadores, a capacidade de coletar e manipular os recursos vegetais para benefício próprio, transformando-os em produtos mais complexos, como por exemplo: mel e própolis (**Figura 2**). Além do mel e da própolis, de diferentes origens vegetais, as abelhas também elaboram outros produtos como geleia real, cera de abelha e veneno, produtos amplamente comercializados com distintas finalidades.



Figura 2 – Principais produtos elaborados pelas abelhas melíferas: favos de mel (à esquerda) e própolis bruta (à direita).

A apicultura é uma atividade histórica que consiste na criação de abelhas melíferas com objetivo principal de explorar racionalmente seus produtos naturais, principalmente mel e própolis (WOLFF, 2007; DOMINGOS et al., 2016). As civilizações mais antigas contêm diversos registros descrevendo o uso terapêutico do mel e da própolis, informações que contribuíram pra popularidade desses produtos nas civilizações posteriores e também para o interesse científico (TORETI et al., 2013; HUANG et al., 2014).

Os egípcios, por exemplo, já se beneficiavam da propriedade antimicrobiana da própolis ao aplicá-la no embalsamento de cadáveres. O historiador romano Plínio a descreveu como eficiente na redução de inchaços e alívio de dores, enquanto os gregos (incluindo Hipócrates) a adotavam como cicatrizante. O termo “própolis”, entretanto, se popularizou apenas na França, no século XVI. A farmacopeia de Londres registrou o produto natural pela primeira vez como medicamento oficial no Século XVII. Ao final do Século XIX, no fim da

guerra da África do Sul, a própolis foi amplamente utilizada como cicatrizante. Esses últimos relatos impulsionaram as pesquisas científicas envolvendo a própolis.

No Brasil, a apicultura teve seu início ainda na primeira metade do século XIX (1839), quando abelhas da espécie *A. mellifera*, trazidas de Portugal pelo Pe. Antônio Carneiro, foram introduzidas no Sul do país (OLDONI, 2007). Outras espécies de abelhas melíferas introduzidas ao longo do tempo foram: *A. mellifera ligustica* (Itália), *A. mellifera mellifera* (Alemanha) e *A. mellifera carnica* (Áustria). As espécies do gênero *Apis* estão entre as abelhas sociáveis mais comercializadas no mundo, sendo *Apis mellifera* L. (**Figura 3**) a mais utilizada na produção apícola, principalmente por conta do seu tamanho.



Figura 3 – Abelha operária *Apis mellifera* (europeia).

Em 1956, com objetivo principal de expandir a produção apícola nacional, o professor Dr. Warwick Estevam Kerr verificou, através de um minucioso levantamento sobre as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*), a alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos e elevada taxa de reprodução, com ciclo de vida mais curto que as demais espécies melíferas no Brasil. Diversos enxames de abelhas africanas foram trazidos, e, após um ano, cerca de 26 enxames (com suas respectivas rainhas) escaparam e cruzaram com as demais subespécies de abelhas melíferas europeias, introduzidas anteriormente (OLIVEIRA e CUNHA, 2005). As populações híbridas, que existem até hoje, são chamadas de abelhas africanizadas, e conservam principalmente o comportamento agressivo das abelhas africanas. As características dessas abelhas permitiram a sua expansão, e hoje as abelhas africanizadas ocupam quase todo o continente americano, do Sul da Argentina até o Sudeste de Nevada, nos Estados Unidos, percorrendo em média uma distância de 110 km por ano (KREBS, 2001).

A apicultura hoje em dia já se comporta como atividade econômica consolidada, sendo o mel seu principal representante. De acordo com dados coletados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, foram produzidas em 2016 aproximadamente 39,59 mil toneladas de

mel, uma alta de 5,1% na produção com relação ao ano anterior, com valor de produção que chegou a movimentar R\$ 470,51 milhões, impulsionado principalmente pelo aumento da demanda e pela valorização do mel brasileiro no mercado internacional (IBGE, 2016). A própolis brasileira também tem sido bem valorizada no mercado nacional e internacional. Sua produção anual chega a 150 toneladas por ano, sendo que dois terços do total são exportados, principalmente, para o Japão (SEBRAE, 2017). O aumento no interesse e no consumo de própolis brasileira se iniciou na década de 1980, e desde então o produto vem sendo utilizado como complemento alimentar ou como fitoterápico. Paralelamente, notou-se um aumento nos estudos sobre a matriz de própolis, sua composição e suas propriedades, aumentando o interesse popular no consumo desse produto (PEREIRA, 2015).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias de origem animal e vegetal. As abelhas operárias coletam resinas vegetais em um raio que pode abranger até 5 quilômetros ao redor da colmeia, e essa mistura de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas é manipulada dentro da colmeia com o acréscimo de cera produzidas pelas próprias abelhas e enzimas salivares (BRASIL, 2001; PARK et al., 2002). Em média, a própolis é composta principalmente por bálsamos e resinas vegetais (40-60%) ácidos graxos de cadeia longa (30%), óleos essenciais (10%), pólen, minerais e outros constituintes minoritários (TORETI et al., 2013; HUANG et al., 2014).

A própolis é um dos produtos naturais que mais tem recebido atenção científica nos últimos anos, mesmo depois de mais de 100 anos de pesquisas envolvendo esse produto natural (PEREIRA et al., 2002). O primeiro trabalho científico sobre própolis foi indexado ao *Chemical Abstracts* no ano de 1903, e descrevia algumas propriedades e composição química da própolis. Em 1904 foi depositada a primeira patente sobre o assunto (USA – *Composition for treating pins and piano strings*). Mesmo considerando os poucos relatos de aplicações terapêuticas da própolis no início do Século XX, o estudo científico da própolis só se intensificou a partir da década de 1960, principalmente em países do Leste europeu (PEREIRA et al., 2002).

O interesse global em pesquisas sobre própolis, que ascendeu entre as décadas de 1950 e 1990, teve como principal justificativa a diversidade de propriedades biológicas estudadas e comprovadas neste período de tempo, a maioria delas envolvendo atividades antimicrobiana, antitumoral, anestésica e citotoxicidade (**Tabela 1**). Em meados da década de 1980 o estudo da própolis aumentou de maneira global, incluindo o Brasil, que depositou seu primeiro trabalho científico em 1984 – um estudo que comparou o efeito da própolis em referência a

alguns antibióticos para inibição de *Staphylococcus aureus* (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2002; LUSTOSA et al., 2008).

Tabela 1 – Propriedades farmacológicas atribuídas à própolis nas suas primeiras décadas de estudo (adaptado de PEREIRA et al., 2003).

Ano	País	Propriedade farmacológica da própolis
1957	URSS	Anestésica
1967	Romênia	Antifúngica - Aplicação dermatológica
1968	URSS	Uso no tratamento de úlceras em ratos
1968	Polônia	Antibacteriana - gênero <i>Candida</i>
1976	Alemanha	Antifúngica - <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
1976	Polônia	Antiprotozoários - <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>
1981	URSS	Antibiótica - <i>Staphylococcus aureus</i>
1983	Iugoslávia	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> - Células HeLa
1984	Brasil	Antibiótica - <i>Staphylococcus aureus</i>
1985	Iugoslávia	Inibidor de <i>Bacillus subtilis</i>
1986	Tchecoslováquia	Inibidor de RNA polimerase – <i>Echerichia coli</i> e <i>S. aurofaciens</i>
1989	Polônia	Antitumoral - Carcinoma de <i>Ehrlich</i>
1990	Itália	Antiviral – Herpes
1992	Bulgária	Antiviral - Influenza A
1993	EUA	Antitumoral
1995	Japão	Citotoxicidade da própolis brasileira
1994	Brasil	Antiparasitária - <i>Trypanosoma cruzi</i>
1998	Eslováquia	Antimutagênico

O interesse científico depois desse período só aumentou. Para ilustrar tal interesse, uma busca por publicações que utilizam como palavra-chave o termo “*propolis*” foi feita utilizando a base de dados da plataforma *Scopus* entre os anos de 1980 e 2019. Além do aumento expressivo no número de publicações, foi possível verificar através desse levantamento que a maioria dos trabalhos sobre própolis ainda envolve seu potencial biológico, e também de seus princípios ativos.

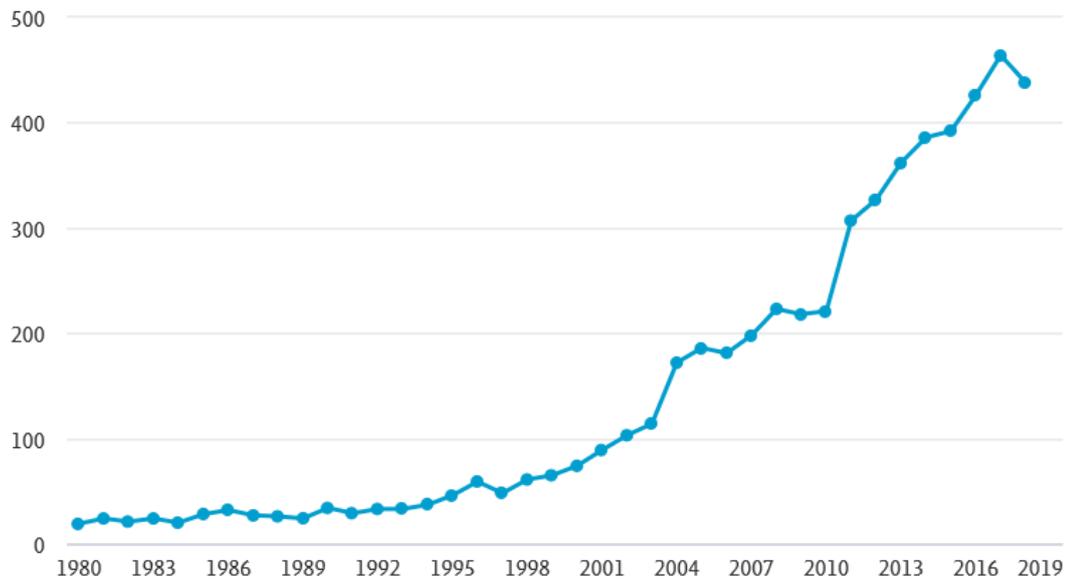


Figura 4 – Aumento do número de publicações sobre própolis ao longo do tempo (Fonte: *Scopus*. Pesquisa feita em 11/03/2019).

O Brasil é dono da maior biodiversidade do mundo, devido à existência de diferentes biomas, os quais têm Flora diferenciada e particular, e isso se reflete na produção da própolis, visto que é uma matriz que deriva diretamente de substâncias de origem vegetal (RIGHI et al., 2013). Os fatores responsáveis pelo acúmulo de metabólitos especiais nas plantas, o que altera a composição química da própolis, são principalmente, o índice pluviométrico, radiação ultravioleta (UV), ritmo circadiano, composição relativa da atmosfera, ataque patogênicos e idade da planta (GLOBO-NETO e LOPES, 2007). Além disso, o clima tropical permite que a própolis seja produzida durante todo o ano, diferente do que acontece com a própolis de clima temperado, onde as abelhas suspendem o trabalho nos invernos mais rigorosos. Todos esses fatores causam variação nos componentes da própolis e fazem com que ela tenha características particulares que dependem da região de coleta, da disponibilidade vegetal, das condições climáticas, da sazonalidade e também da espécie de abelha produtora (ALENCAR et al., 2007; TORETI et al., 2013).

Atualmente a produção de própolis brasileira representa aproximadamente 15% da demanda mundial. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor do país, produzindo aproximadamente 20 toneladas de própolis por ano. O impulso dessa produção está relacionado com o aumento significativo no consumo de extrato de própolis brasileira. A própolis produzida no Sudeste brasileiro é conhecida como própolis verde e é a mais valorizada no mercado internacional. No Japão, cerca de 92% da própolis consumida é de origem brasileira, e o preço do produto *in natura* chegou a saltar de US\$ 5,00 para US\$

200,00 por quilograma nos últimos anos. O frasco do extrato etanólico de própolis verde chegou a custar, no mesmo período de tempo US\$ 110,00 (SEBRAE, 2014).

A própolis mais conhecida no mundo, e também a mais estudada, é produzida pelas abelhas melíferas *A. mellifera* L., onde no Brasil é representada por uma população híbrida de abelhas africanizadas. No contexto social das abelhas, a própolis descreve uma forma de imunidade social, que consiste no comportamento dos indivíduos voltado para soluções que reduzam a transmissão de doenças entre membros, garantindo a sucessão das próximas gerações de indivíduos (SIMONE-FINSTROM e SPIVAK, 2010). Assim, a própolis na colmeia atende a duas funções principais:

- **Mecânica:** a própolis é aplicada pelas abelhas melíferas na correção de imperfeições dentro da colmeia, na vedação de entradas que impedem a passagem de insetos invasores e principalmente para controlar a temperatura interna, por volta dos 30 °C (controle da perda de calor convectivo). Até o início do Século XX acreditava-se que essas eram as principais razões envolvidas na elaboração da própolis (KRELL, 1996).
- **Biológica:** a complexidade química da própolis vem de resinas vegetais, fazendo com que ela garanta a assepsia do ambiente, principalmente na região de ovos e larvas. A própolis também protege a colônia de doenças causadas por microrganismos patogênicos, desempenhando atividade antimicrobiana e é utilizada no cobrimento de insetos mortos para evitar o crescimento de colônias de microrganismos invasores (SALATINO et al., 2005; PARK et al., 2005).

As diferentes importâncias e aplicações da própolis na colmeia são possíveis devido à suas características físicas e químicas. O produto final se apresenta no estado sólido, com faixa de fusão que varia entre 60 e 70 °C, sendo rígida e quebradiça apenas abaixo dos 15 °C, e isso a torna o suficientemente maleável em uma grande escala de temperatura. O elevado teor de ceras que é depositado pelas abelhas a deixa praticamente insolúvel em água, o que impede a proteção de ser desfeita em épocas chuvosas. O papel biológico e sua eficácia estão diretamente relacionados com a composição química da própolis, ou seja, a preferência das espécies vegetais parece estar de acordo com o potencial antimicrobiano da própolis (SALATINO et al., 2011; TORETI et al., 2013).

Com objetivo de estabelecer critérios mínimos para garantir a qualidade dos produtos apícolas brasileiros, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis” (normativa nº

03, de 19 de janeiro de 2001), descreveu uma série de requisitos e especificações que a própolis nacional deve possuir para ser comercializada (BRASIL, 2001).

A **Tabela 2** mostra alguns dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira para o padrão de qualidade para a comercialização da própolis e do extrato hidroalcoólico de própolis. Outras especificações incluem teor alcoólico de no máximo 70 °GL no caso dos extratos de própolis, bem como a leitura de absorção dos extratos através de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-vis), para confirmar a presença de substâncias fenólicas na região que vai de 200 até 400 nanômetros (BRASIL, 2001).

Tabela 2 - Parâmetros de qualidade da própolis bruta e extrato hidroalcoólico de acordo com a legislação em vigor (BRASIL, 2001).

Parâmetros	Própolis Bruta	Extrato de Própolis
Perda por dessecação	Máximo de 8% (m/m)	-
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)	-
Extrato seco	-	Mínimo de 11% (m/v)
Ceras	Máximo de 25% (m/m)	Máximo de 1% em extrato seco (m/m)
Substâncias Fenólicas	Mínimo de 5% (m/m)	Mínimo de 0,50% (m/m)
Flavonoides	Mínimo de 0,5% (m/m)	Mínimo de 0,25% (m/m)
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Massa Mecânica	Máximo de 40% (m/m)	-
Solúveis em Etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-

A determinação do teor de substâncias fenólicas é uma das análises mais importantes no que diz respeito à qualidade da própolis e seu uso como fitoterápico, pois a literatura relata correlação positiva entre a presença destas substâncias específicas e as suas propriedades terapêuticas. Complementar à análise de substâncias fenólicas, a atividade de oxidação indica a qualidade do produto natural, tendo relação direta com a idade e o estado de conservação do produto. Isso porque as substâncias fenólicas da própolis, que têm propriedades antioxidantes, são facilmente degradadas (oxidam com facilidade) quando expostas ao ar, elevada luminosidade e locais onde a temperatura é muito elevada (DE MELO et al., 2014).

2.2. Biodiversidade da própolis

2.2.1. Origem botânica da própolis verde

As abelhas operárias visitam plantas de diferentes espécies vegetais, mas ainda não se sabe explicar porque algumas são preferenciais para a coleta da resina para elaboração de própolis. Através da identificação de padrões quimiogeográficos na própolis é possível determinar sua origem botânica, mas ainda existem muitos tipos de própolis onde a espécie necessária para a sua elaboração ainda não foi identificada (SALATINO et al., 2011). A **Tabela 3** apresenta a origem botânica da própolis de algumas regiões geográficas.

Tabela 3 - Própolis de diferentes regiões geográficas e sua origem botânica (TORETI et al., 2013).

Região Geográfica	Origem Botânica
Albânia	<i>Populus nigra</i> L.
América do Norte	<i>Populus</i> L. spp.
Argentina	<i>Populus alba</i> L.
Ásia	<i>Populus</i> L. spp.
Austrália	Xanthorrhoea
Bulgária	<i>Populus</i> L. spp.
Cuba e Venezuela	<i>Clusia minor</i> L.
EUA (Continental)	<i>Populus fremontii</i> L.
EUA (Havaí)	<i>Plumeria acuminata</i> L.
Europa	<i>Populus</i> L. spp.
Reino Unido	<i>Populus euramericana</i> L.
Regiões Equatoriais	<i>Delchampia</i> L. spp., <i>Clusia</i> L. spp.
Uruguai	<i>Populus alba</i> L.

O conjunto de informações que se obtém ao associar a origem botânica aos fatores extrínsecos, como o clima e a sazonalidade, tem se mostrado fundamental para o estabelecimento de medidas mais eficientes que garantam o uso racional do produto natural, como também assegurem suas propriedades farmacológicas (PEREIRA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003). A origem botânica da própolis pode ser estudada através da comparação do seu perfil químico com as possíveis fontes vegetais de origem, e através da análise microscópica dos grãos de pólen presentes. Os grãos de pólen são carregados para a

colmeia aderidos no corpo da própria abelha, principalmente no momento em que se coleta o néctar para a elaboração de mel, e fornece uma série de informações importantes sobre o hábito de escolha das abelhas (BARTH, 2004).

O estudo sobre as possíveis fontes vegetais utilizadas na produção da própolis encontrada em zonas de clima temperado começou ainda no Século XX. Essa variedade de própolis é produzida a partir de diversas espécies do Álamo (Salicaceae), presentes em larga escala na Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia. É composta principalmente por flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos, em especial o cafeato de fenetila (CAPE, **Figura 5**), seu princípio ativo mais importante (SALATINO et al., 2011).

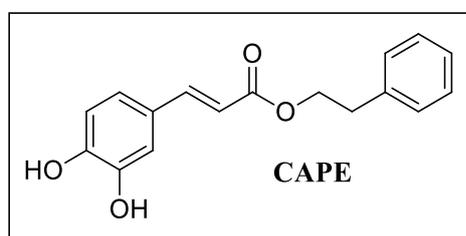


Figura 5 – Estrutura do cafeato de fenetila (CAPE), principal componente da própolis produzida em zonas temperadas.

As espécies de *Populus* spp. são consideradas as principais fontes de resina para a elaboração da própolis de zonas temperadas (HUANG et al., 2014). A própolis obtida em regiões tropicais e subtropicais tem composição química diferenciada, pois poucas espécies de álamo existem nessas regiões. Assim, as abelhas melíferas se adaptaram ao longo do tempo à Flora existente, passando a coletar a resina em outros gêneros, compondo a própolis com diferentes classes de princípios ativos, resultando assim, em propriedades farmacológicas distintas. Entre as principais fontes vegetais disponíveis no Brasil para a elaboração da própolis, pelas abelhas melíferas, destacam-se o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.), o rabo de bugio (*Dalbergia ecastophyllum* L.f.), o pinheiro brasileiro (*Aracuaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.) e o eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook.).

É preciso ressaltar que a espécie da abelha envolvida na produção da própolis é o que influencia na escolha da fonte vegetal. As abelhas melíferas respondem a estímulos olfativos em diversos contextos, principalmente para comunicação entre os membros da colônia, e no caso específico das abelhas operárias, a relação com os odores das plantas pode estar associada à localização de néctar e pólen (BANKOVA et al., 2014). Não é possível afirmar até o momento se existe algum estímulo olfativo associado especificamente a coleta de resina

para elaboração da própolis, apesar de parecer lógico que o fenômeno ocorra. Leonhardt e colaboradores (2010) demonstraram que a presença de determinados terpenoides voláteis em algumas espécies vegetais estavam diretamente associados a escolha para elaboração da própolis por algumas espécies de abelhas do gênero *Apis*.

A própolis produzida no Brasil é muito diversificada por conta dos diferentes biomas, os quais possuem características particulares com relação à sazonalidade, variação climática, índice pluviométrico e Flora diferenciada, gerando diferenças pronunciáveis no seu aspecto quantitativo e qualitativo (**Figura 6**). Muitos estudos sugerem que a distribuição de metabólitos especiais em vegetais não é aleatória, mas apresentam uma série de padrões característicos que estão ligados à sua taxonomia, conhecimento que tem contribuído frequentemente para o entendimento da matriz de própolis (SALATINO et al., 2011).



Figura 6 – No Brasil, diversas regiões fitogeográficas produzem própolis com características distintas. (Fonte: Prof. Nivaldo Paulino, Universidade Anhanguera – SP)

Assim, é possível observar o reflexo da biodiversidade brasileira na própolis produzida no país. Por exemplo, própolis verde (**Figura 7-a**) é produzida na região Sudeste do Brasil e sua composição química é rica em substâncias polifenólicas (principalmente, fenilpropanoides prenilados, flavonóis e derivados do ácido cafeoilquínico), enquanto na própolis vermelha (**Figura 7-b**), que é produzida na região Nordeste do país, apresentam neoflavonoides e isoflavonoides, além de benzofenonas, como os princípios ativos mais comuns (AWALE et

al., 2008; SALATINO et al., 2011; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). A própolis marrom (**Figura 7-c**) é produzida na região Sul do país e é conhecida principalmente, como própolis comum, não apresentando características específicas com relação a composição química ou a sua origem botânica até o momento.

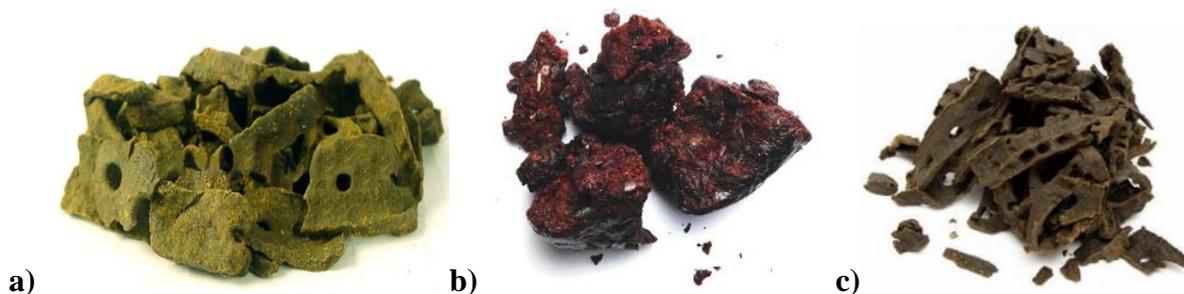


Figura 7 – Placas de própolis bruta de diferentes regiões do Brasil: (a) própolis verde da região Sudeste, (b) própolis vermelha da região Nordeste e (c) própolis marrom da região Sul.

Atualmente a própolis brasileira é classificada em 13 grupos distintos (**Tabela 4**). Os fatores utilizados para elaborar essa classificação foram relacionados a cor do extrato etanólico da amostra de própolis, o perfil químico e a região onde era produzida (PARK et al., 2002; ALENCAR et al., 2007). Embora seja muito utilizada para diferenciação da própolis nacional, a origem botânica associada ao tipo de própolis não foi levada em consideração para elaborar esta classificação.

Tabela 4 - Classificação da própolis brasileira de acordo com a coloração do extrato hidroalcoólico (TORETI et al., 2013).

Grupos	Cor do Extrato	Região Brasileira
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	Sudeste
Grupo 13	Vermelha	Nordeste

A própolis verde, acompanhada da vermelha, é tipo que mais se destaca comercialmente e também na pesquisa científica (SALATINO et al., 2011). A própolis verde é produzida na região Sudeste do Brasil, sendo o Estado de Minas Gerais seu maior produtor. De acordo com dados fornecidos pela Cooperativa Nacional de Apicultura (Conap), aproximadamente 100 toneladas de própolis verde são produzidas no Brasil, com 90% vindo de produtores de Minas Gerais. No ano de 2015, a própolis verde chegou a movimentar US\$ 30.000.000,00 em exportações de extratos e matéria prima bruta, principalmente para o Japão.

Várias espécies vegetais podem estar envolvidas na produção da própolis verde, mas sua principal origem está nos brotos mais jovens de *B. dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou “vassourinha”. O gênero *Baccharis* é o mais abrangente da subtribo Baccharidinae (Asteraceae), e está presente em larga escala na América do Sul – desde o Sudeste do Brasil até áreas da Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia – com mais de 500 espécies nativas desta região, sendo *B. dracunculifolia* a principal delas (BASTOS et al., 2010). A relação entre a própolis verde e sua origem botânica foi constatada através de trabalhos comparativos entre a própolis e a matriz vegetal, principalmente através de técnicas instrumentais de cromatografia líquida e gasosa, além de espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-vis), todas apontando forte semelhança no perfil químico das amostras, além de observação do comportamento das abelhas melíferas na região de coleta (ALENCAR et al., 2005).

A coloração verde intensa dessa variação da própolis brasileira pode ser explicada pela presença de clorofila nos brotos de alecrim-do-campo que são manipulados junto à própolis no momento da produção (**Figura 8**). A presença desses fragmentos vegetais foi comprovada através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (ALENCAR et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2013).



Figura 8 – Abelha melífera (africanizada) coletando resina do alecrim-do-campo para a elaboração da própolis (Fonte: Michel Stórquio Belmiro).

De acordo com Bastos e colaboradores (2010), em um estudo realizado no Estado de Minas Gerais, as populações de *B. dracunculifolia* secretam exsudados específicos durante as estações de chuva, causando maior atração das abelhas melíferas (e outros insetos) e consequentemente aumento na coleta de resina e brotos vegetais para a elaboração da própolis verde, período de tempo que coincide com a alta na produção desta própolis no Estado. Além disso, foi possível constatar que a coleta do material vegetal não depende do gênero da planta ou do seu estado fenológico (BASTOS et al., 2010).

Diante da necessidade de associar a própolis a sua principal fonte botânica, biomarcadores têm sido propostos. O biomarcador é uma substância específica (ou uma classe de substâncias) conhecida por pertencer a uma espécie vegetal, e encontrada em abundância em certos tipos de própolis (SALATINO et al., 2011). No caso da própolis verde, é estabelecido como biomarcador o Artepillin C, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, um derivado do ácido cinâmico. O Artepillin C é o polifenol de baixo peso molecular mais abundante na própolis verde (> 5% em massa), e só pode ser identificado nessa variedade do produto natural, sendo metabólito especial presente em *B. dracunculifolia* (ALENCAR et al., 2005; SALATINO et al., 2005).

Nascimento e colaboradores (2008) apresentaram como novo marcador químico para a própolis verde, o derivado, 3-prenilcinamato de alila. A identificação deste éster facilita o controle de qualidade da própolis verde, assegurando sua origem botânica à *B. dracunculifolia*

por também ser abundante nos ápices de alecrim-do-campo, sendo possível identifica-lo cromatografia gasosa (CG) por conta de sua volatilidade. A substância prenilada foi identificada não só em amostras de própolis *in natura*, mas também em extratos comerciais de própolis verde (NASCIMENTO et al., 2008). As estruturas químicas dos biomarcadores identificados na própolis verde estão apresentadas na **Figura 9**.

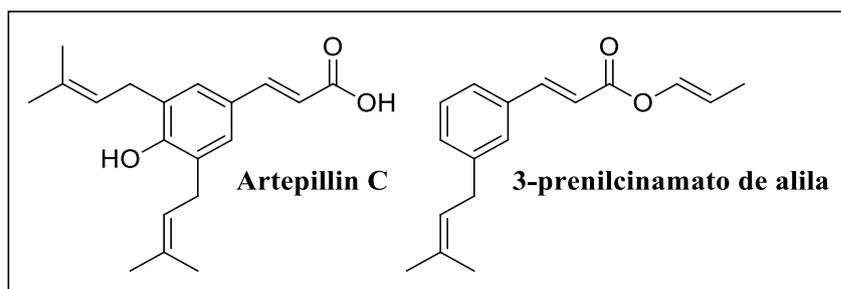


Figura 9 – Estrutura dos biomarcadores ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), e 3-prenilcinamato de alila, proposto por Nascimento e colaboradores (2008).

Análises de melissopalínologia sugerem que abelhas melíferas presentes na região do cerrado brasileiro visitam espécies do gênero *Baccharis* para coleta de resina, além de outras espécies dos gêneros *Vernonia*, *Diclenia*, *Hyptis*, *Myrcia*, *Schinus* e *Weinmania* (SANTOS et al., 2003). Entretanto, ainda não existem registros na literatura da ocorrência dessas duas substâncias (Artepillin C e 3-prenilcinamato de alila) na própolis dessa região, não podendo ser caracterizadas como própolis verde. Embora a análise polínica forneça evidências consistentes sobre a origem da própolis pela associação com o pólen característico das espécies visitadas, esse dado deve ser observado com cautela, pois não é possível determinar com certeza se a ocorrência do pólen identificado está associada a uma espécie visitada ou a uma contaminação ocasional (SALATINO et al., 2005).

A identificação dos possíveis biomarcadores para a própolis brasileira contribui significativamente para que sejam estabelecidos critérios com relação ao uso popular da própolis de forma racional, pois funcionam como uma “identidade” do produto e conseqüentemente agregam valor comercial pelo apelo terapêutico. O Artepillin C é considerado marcador de qualidade na própolis verde por estar relacionado com diversas propriedades biológicas. Vários trabalhos na literatura relatam que esta substância da própolis verde possui potencial antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antitumoral, antimutagênico e antioxidante (AKAO et al., 2003; PAULINO et al., 2008; NOBUSH et al., 2012; RESENDE et al., 2012; SZLISZKA et al., 2013; SALGUEIRO e CASTRO, 2016; VEIGA et al., 2017).

2.2.2. Composição química da própolis verde

A composição química da própolis depende diretamente do perfil fitoquímico das espécies envolvidas na sua produção. Bálsamos e resinas vegetais compõem a maior parte da própolis (em massa), podendo chegar a até 60% da sua composição química e é a partir dessa fração da própolis que se extrai a maior parte de seus princípios ativos.

Estima-se que até o momento mais de 300 substâncias já tenham sido identificadas para a própolis, entre elas pode-se destacar: **hidrocarbonetos superiores** (derivados do álcool benzílico, cinamílico e fenetílico); **ácidos graxos** de cadeia longa e seus ésteres; **aldeídos aromáticos** (vanilina, isovanilina) e **cetonas** (cetonas alifáticas, derivados da acetofenona); **terpenoides** (óleos essenciais, esteroides e saponinas); **açúcares** (sacarose, frutose, glicose, xilose); **aminoácidos** (alanina, arginina, asparagina, cistina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, triptofano); **fenilpropanoides** e seus derivados (derivados do ácido cinâmico e seus ésteres, estilbenos); derivados do **ácido benzoico** e seus ésteres; **ácidos alifáticos** e seus ésteres (ácido acético, fumárico, angélico, butírico); **chalconas**; **flavonas** e **flavonóis** (canferide, canferol, crisina, galangina, isorhamnetina, quercetina, tectocrisina); **flavanonóis** (aromandendrina); **flavanonas** (alnusitol, alpinetina, naringenina, sacuranteína, pinocembrina).

Substâncias voláteis e óleos essenciais representam uma pequena fração da própolis, chegando a aproximadamente 10% de sua composição, composta principalmente por terpenoides e ésteres de ácidos fenólicos com baixo peso molecular. A presença dessas substâncias está diretamente associada ao odor diferenciado e característico de cada tipo de própolis, estando possivelmente envolvidas no processo de reconhecimento da fonte vegetal por parte das abelhas melíferas (BANKOVA et al., 2014; LEONHARDT et al., 2010).

Entre os terpenoides mais comuns encontrados na própolis verde destacam-se os **monoterpenos** (linalool, β -pineno, α -terpineol, β -mirceno, limoneno), **sesquiterpenos** (α -ylangeno, α -copaeno, β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, β -guaieno, γ -elemeno, α -cariofileno, 9-*epi*- β -cariofileno, germacreno A, β -selineno, viridifloreno, γ -muuroleno, valenceno, α -muuroleno, γ -cadiene, δ -amorfeno, *cis*-cakameneno, selina-3,7(11)-diene, (*E*)-nerolidol, espathulenol, δ -cadinol, oxido de cariofileno) e alguns **triterpenos** (α -amirina, β -amirina, lupeol, lupenona, 24-metilenocicloartanol). É importante ressaltar que tais componentes também já foram identificados no óleo essencial de alecrim-do-campo, corroborando com a hipótese de que essa espécie seja a principal envolvida na produção da própolis verde (OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2002; MARÓSTICA JUNIOR et

al., 2008; PARREIRA et al., 2010; HUANG et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014; BANKOSTA et al., 2014).

De maneira geral, os sesquiterpenos (C₁₅) são mais abundantes na própolis verde quando comparado a outros tipos de terpenoides, e esse padrão é observado também no óleo essencial de alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) (SALATINO et al., 2005; MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008; PARREIRA et al., 2010). Assim, a análise de substâncias voláteis também pode ser usada como dado que corrobora com a relação entre as abelhas e a vegetação. A literatura relata que para o óleo essencial de própolis verde, a variação sazonal dos componentes é mais significativa de um ponto de vista quantitativo, mostrando que sua composição é mais influenciada pelo local onde a própolis é produzida (BANKOVA et al., 1998).

Entre os constituintes mais frequentes na fração volátil da própolis verde produzida nas regiões de São Paulo e Rio de Janeiro, é possível destacar os sesquiterpenos (*E*)-nerolidol, espatulenol e δ -cadineno (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2010; NUNES e GUERREIRO, 2012). Já na própolis verde que ocorre no Estado de Minas Gerais, os principais componentes encontrados são (*E*)-nerolidol, β -cariofileno e selina-3,7(11)-diene (ALBUQUERQUE et al., 2008). A **Figura 10** apresenta as estruturas químicas dos principais sesquiterpenos identificados para a própolis verde.

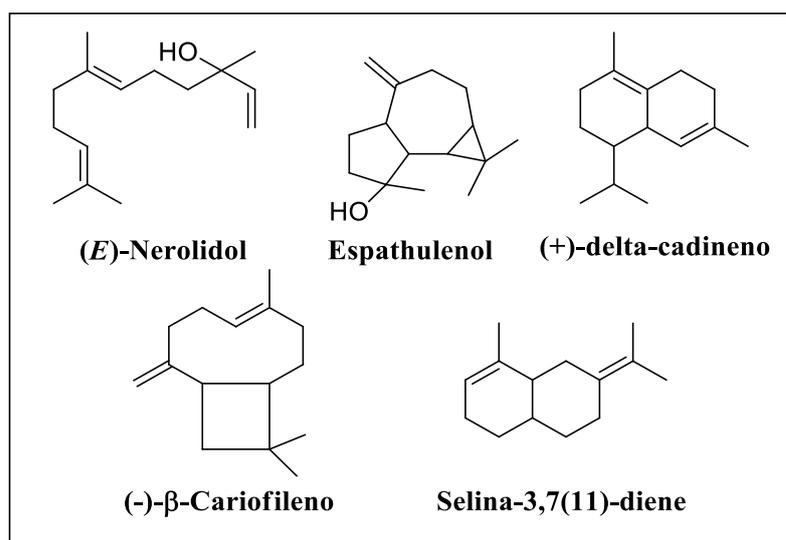


Figura 10 – Sesquiterpenos mais abundantes identificados na própolis verde.

Os principais componentes químicos não voláteis encontrados na própolis verde pertencem à classe dos polifenóis, como os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os fenilpropanoides, como o ácido cinâmico e seus derivados, assim como diversos flavonoides,

característicos da própolis europeia, também podem ser encontrados em amostras de própolis brasileira (HUANG et al., 2014). O que diferencia a composição química da própolis brasileira das demais é a presença de metabólitos especiais característicos de espécies vegetais que estão presentes especificamente no Brasil, como é o caso da *B. dracunculifolia*.

Muitos flavonoides já foram identificados em amostras de própolis verde (**Figura 11**), em geral com um ou mais substituinte hidroxila ou metoxila, diferente dos flavonoides encontrados na própolis de regiões temperadas – que são geralmente pouco substituídos, principalmente no anel B (PARK et al., 2004; CHANG et al., 2008; HISANORI et al., 2011; SALGUEIRO e CASTRO, 2016; ANDRADE et al., 2017).

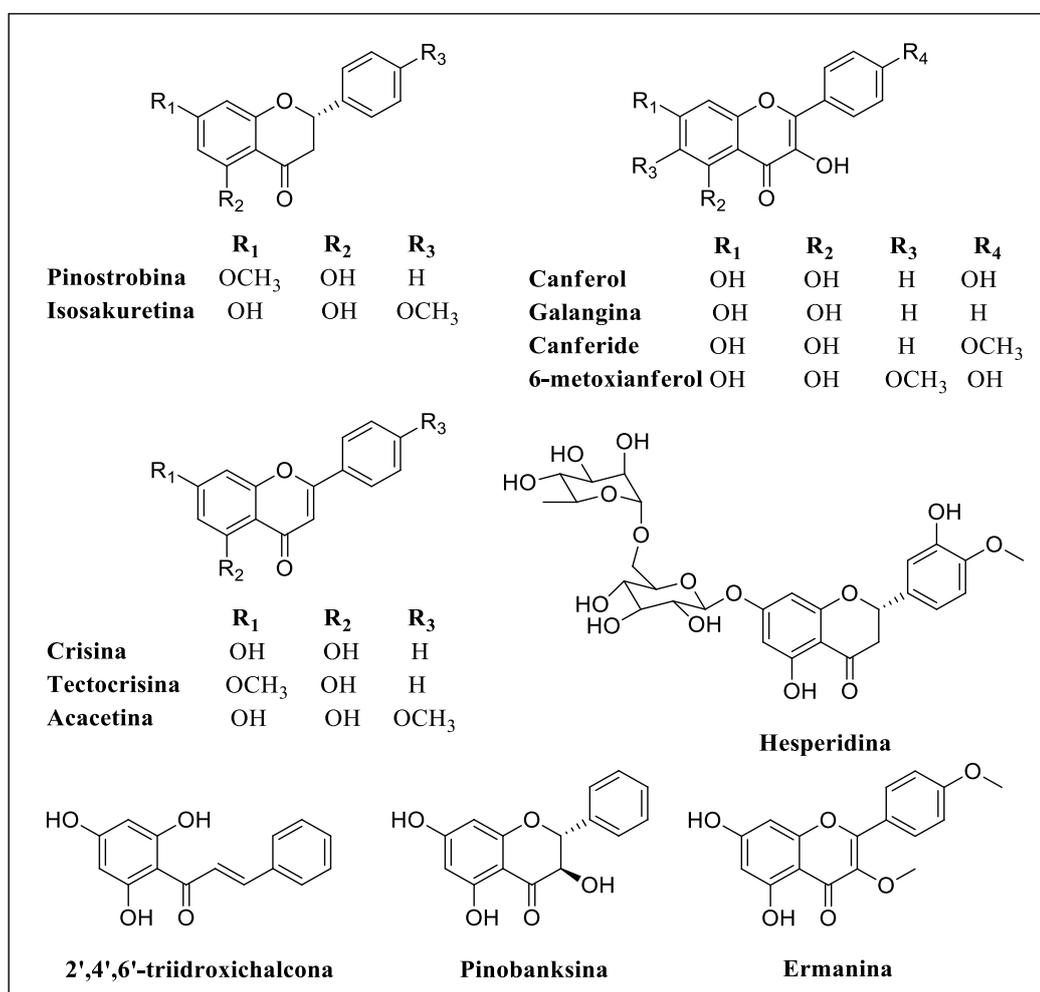


Figura 11 – Flavonoides frequentemente identificados na própolis verde (PARK et al., 2004; CHANG et al., 2008; HISANORI et al., 2011; SALGUEIRO e CASTRO, 2016; ANDRADE et al., 2017).

Os ácidos fenólicos, tais como os derivados do ácido cinâmico e benzoico, são muito comuns tanto na fonte botânica (*B. dracunculifolia*), quanto na matriz de própolis verde, e são conhecidos pela sua diversidade estrutural e propriedades biológicas. Os fenilpropanoides (ácidos cinâmico, cafeico, ferúlico, sinápico) estão presentes na própolis verde principalmente

na forma de derivados prenilados, como o Artepillin C, ou na forma de ésteres como o 3-prenilcinamato de alila. Metabólitos especiais prenilados são muito comuns no alecrim-do-campo, sendo assim importantes para a caracterização da própolis verde. Na **Figura 12** estão representadas as estruturas de alguns dos componentes prenilados encontrados na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; NEGRI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005; CHENG et al., 2008; TAVARES et al., 2010; FÁVARO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017).

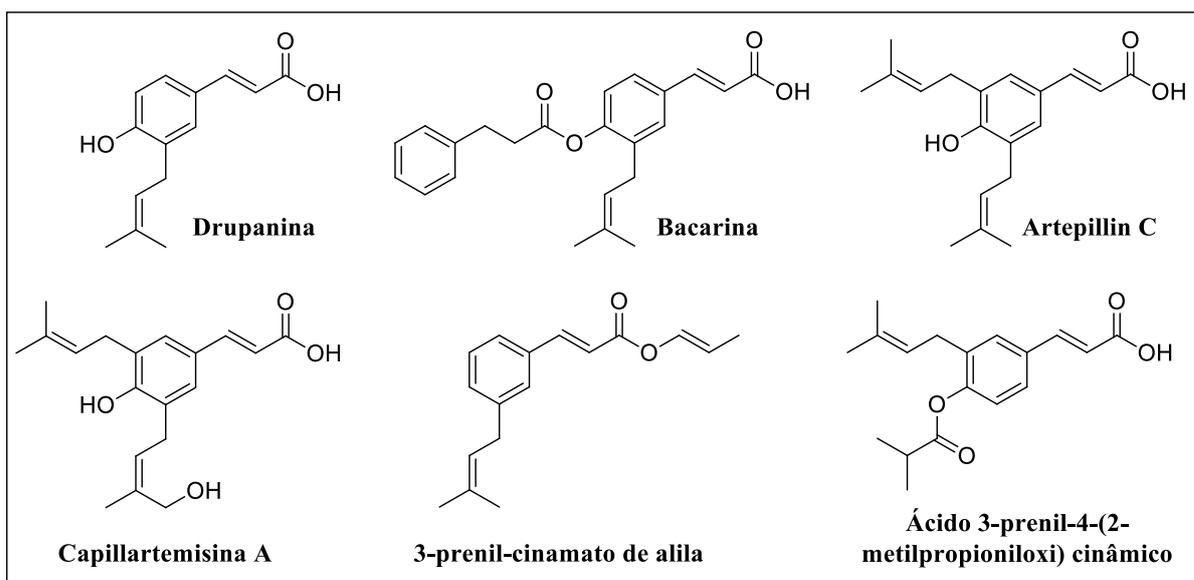


Figura 12 – Principais derivados prenilados encontrados na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; NEGRI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005; CHENG et al., 2008; TAVARES et al., 2010; FÁVARO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017).

Outros derivados prenilados estão presentes na própolis verde na forma de anéis heterocíclicos, tais como cromanos e derivados 2,3-diidrobenzofuranos substituídos. Ésteres não-prenilados dos ácidos *p*-cumárico e cafeico são reportados com menos frequência, a exemplo do ácido rosmarínico que foi identificado pela primeira vez na própolis verde do Rio de Janeiro por Salgueiro e Castro (2016), e o *para*-cumarato de diidroconiferila identificado por Kumazawa e colaboradores (2003) na própolis verde de Minas Gerais. Tais ésteres apresentam estrutura similar à do CAPE (**Figura 5**), princípio ativo da própolis europeia, com numerosas propriedades biológicas (TORETI et al., 2013; HUANG et al., 2014). A **Figura 13** apresenta alguns exemplos desses componentes (KUMAZAWA et al., 2003; CHANG et al., 2008; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

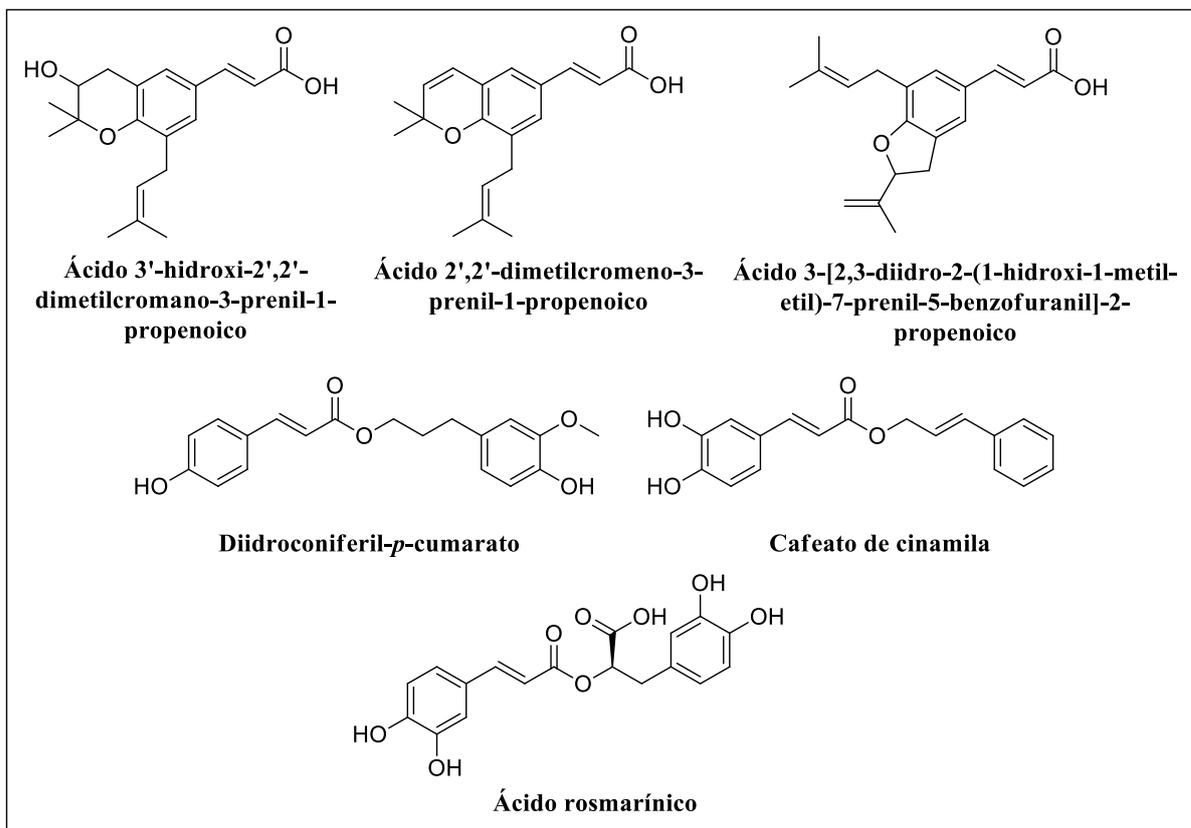


Figura 13 – Derivados heterocíclicos e ésteres identificados na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; CHANG et al., 2008; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

Derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico, foram identificados na própolis verde, mas são encontrados em quantidades menores na espécie vegetal *B. dracunculifolia*, o que sugere que esses componentes podem ser recolhidos de outras fontes vegetais. De acordo com a literatura, derivados do ácido cafeoilquínico são frequentes em espécies do gênero *Citrus* spp., podendo ser encontrado na própolis produzida nos ambientes que comportam espécies desse gênero (DOS SANTOS et al., 2003; HUANG et al., 2014).

A estrutura do ácido clorogênico e de outros derivados encontrados na própolis verde está apresentada na **Figura 14**. Por conta da sua elevada polaridade, esses componentes são geralmente encontrados em extratos aquosos ou misturas hidroalcoólicas.

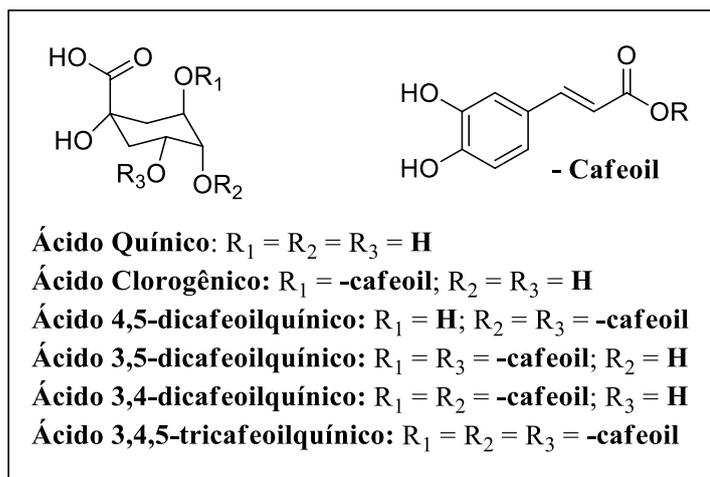


Figura 14 – Derivados do ácido quínico encontrados na própolis verde.

2.3. Biossíntese de substâncias fenólicas

Uma característica das plantas e de outros organismos sésseis – ou seja, organismos que não possuem a capacidade de locomoção – é a capacidade de produzir um vasto e diversificado conjunto de substâncias, chamadas de metabólitos especiais (CHEYNIER et al., 2013). Tais metabólitos não são essenciais para o metabolismo primário (como os metabólitos do ciclo do ácido cítrico), porém são importantes, principalmente, no que diz respeito à resistência e defesa dos organismos quando são submetidos a estresse ou quando são atacados por algum patógeno (LATTANZIO et al., 2006; BARTWAL et al., 2012; CHEYNIER et al., 2013). As substâncias fenólicas correspondem a um abrangente grupo de metabólitos especiais muito abundantes em organismos vegetais, e tem como característica a presença de pelo menos um anel aromático (benzênico) substituído com um grupo -OH (hidroxila) em sua estrutura. São amplamente distribuídos por todo o Reino Vegetal (podendo também ser encontrados em microrganismos), contribuindo também para qualidades sensoriais como cor e sabor de flores e frutos (CHEYNIER et al., 2013).

Por ser um grupo de substâncias bastante heterogêneo, os polifenóis de baixo peso molecular ocorrem universalmente em plantas superiores, podendo estar distribuídos de maneira geral – metabólitos fenólicos que são comuns em muitas espécies vegetais – ou de maneira mais específica – polifenóis que estão presentes em indivíduos específicos, podendo caracterizar uma espécie, um gênero ou uma família vegetal (CHEYNIER et al., 2013). A observação desse tipo de distribuição de metabólitos secundários faz com que as substâncias polifenólicas, além de outros grupos de metabólitos como alcaloides e terpenoides, sejam importantes para o desenvolvimento de estudos quimiotaxonômicos envolvendo a

classificação das plantas superiores e também dos microrganismos (WINK, 2003; FRISVAD et al., 2008; SINGH, 2016; SINGH e GEETANJALI, 2018;).

De acordo com a literatura, as substâncias fenólicas correspondem restritamente a todos os metabólitos gerados pelas rotas biossintéticas envolvendo o ácido chiquímico (via do chiquimato), que tem como produto final os fenilpropanoides, ou pela via do acetato/malonato. Essas rotas biossintéticas geram uma série de substâncias que podem ser encontradas como monômeros livres, ou ainda como polímeros. Assim, polifenóis são classificados de acordo com o tipo de estrutura principal, conforme é apresentado na **Tabela 5**. Cada unidade C_6 corresponde à um anel benzênico, enquanto as unidades C_x correspondem à uma cadeia substituinte ou espaçadora contendo “x” átomos de carbono.

Tabela 5 - Classificação de substâncias fenólicas quanto ao esqueleto básico de sua estrutura (CHEYNIER et al., 2013).

Esqueleto básico	Classes de substâncias fenólicas
C_6	Fenóis simples, benzoquinonas
C_6-C_1	Ácidos fenólicos (ácido benzóico)
C_6-C_2	Acetofenonas; ácido fenilacético
C_6-C_3	Fenilpropanoides (ác. cinâmico); Cumarinas; Cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas; Benzofenonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos; Antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Chalconas; Flavonoides
$(C_6-C_3)_2$	Lignananas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Diflavonoides
$(C_6)_n$	Melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

A rota biossintética envolvendo o ácido chiquímico é responsável pela biossíntese dos ácidos fenólicos, tais como os fenilpropanoides (ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico), de esqueleto básico C_6-C_3 , e também derivados do ácido benzoico (ácidos *p*-hidroxibenzoico, gálico, vanílico, protocatecuico), cujo esqueleto básico é formado por unidades C_6-C_1 (**Tabela 6**). Esses derivados fenólicos são frequentemente identificados em amostras de própolis verde (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). A variedade no padrão de substituição dos ácidos fenólicos (hidroxilação, glicosilação, acilação, *O*-metilação,

prenilação e outras) é conduzida pela expressão biogenética de cada organismo, o que determina a presença de enzimas específicas relacionadas com a derivatização dos esqueletos básicos de ácidos fenólicos (VOGT, 2010; CHEYNIER et al., 2013).

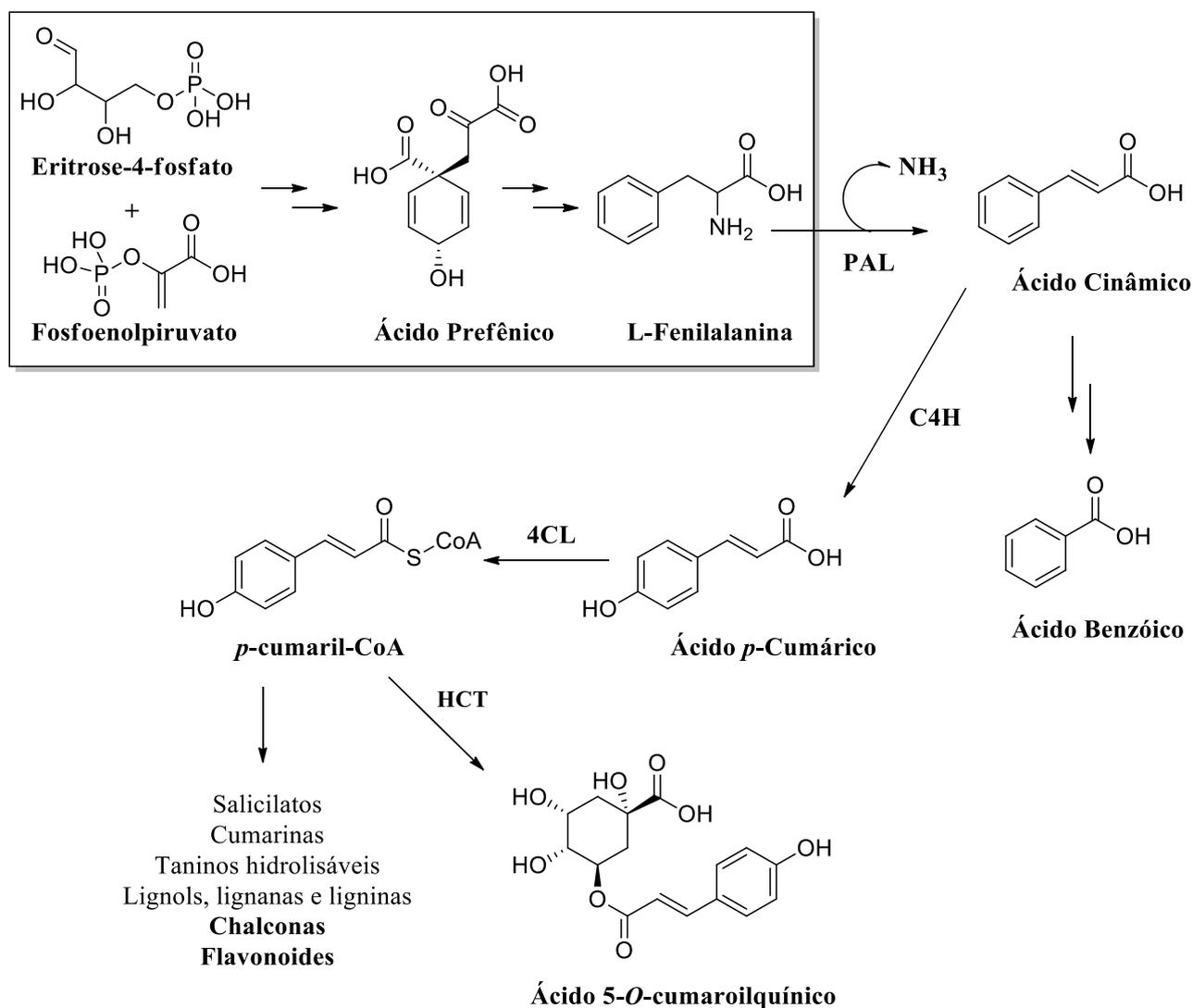
Tabela 6 - Derivados dos ácidos cinâmico e benzóico.

Substituintes	Derivados do Ácido Cinâmico	Derivados do Ácido Benzóico
$R_1=R_2=R_3=R_4 = H$	Ácido cinâmico	Ácido benzóico
$R_1 = OH$	Ácido <i>o</i> -cumárico	-
$R_3 = OH$	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>p</i> -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

A via do chiquimato (ou via do ácido chiquímico) é responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos como L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. Após sua biossíntese, o ácido chiquímico é convertido a ácido prefênico, metabólito final que, ao sofrer uma reação de transaminação, é transformado no aminoácido correspondente. Para a conversão do aminoácido em um fenilpropanoide, uma desaminação oxidativa é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL), levando ao ácido cinâmico – que é posteriormente derivatizado por outras enzimas (CHEYNER et al., 2013).

Os derivados do ácido benzoico são formados a partir da degradação da cadeia lateral do ácido cinâmico (unidade C_3) que pode ocorrer através de uma β -oxidação, e as reações subsequentes que promovem sua derivatização através da adição de substituintes ao anel benzênico (HELENO et al., 2015). Em algumas plantas, o aminoácido L-tirosina é utilizado como precursor e convertido através da enzima tirosina amônia liase (TAL) diretamente para o ácido *p*-cumárico (VOGT, 2010).

O **Esquema 1** apresenta resumidamente o conjunto de reações envolvidas na biossíntese dos ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmico e benzoico), pela via do ácido chiquímico.



Esquema 1 – Representação geral para a biossíntese de ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (CHEYNIER et al., 2013; HELENO et al., 2015). **PAL** – fenilalanina amônia liase; **C4H** – cinamato-4-hidroxilase; **4CL** – 4-cumaroil:CoA-ligase; **HCT** – hidroxicinamoil-transferase.

Os principais metabólitos gerados a partir desta via metabólica são os ácidos cinâmico e *p*-cumárico, que na presença de enzimas específicas sofrem modificações estruturais para gerar outros derivados fenólicos (**Tabela 6**). Além disso, a enzima 4-cumaroil:CoA-ligase é responsável pela tioesterificação do ácido *p*-cumárico, o tornando um importante intermediário para a biossíntese de outras classes de substâncias fenólicas, como os flavonoides.

Os flavonoides fazem parte de um amplo grupo de substâncias fenólicas caracterizado estruturalmente por um sistema contendo três anéis ($C_6-C_3-C_6$), chamados respectivamente de anéis A, C e B, sendo os anéis A e B sistemas aromáticos, e o anel C como um sistema pirânico (**Figura 15**), ausente apenas nas chalconas. Os flavonoides são um importante conjunto de substâncias bioativas da própolis, principalmente de zonas temperadas, contribuindo significativamente para as propriedades farmacológicas do produto (HUANG et al., 2014).

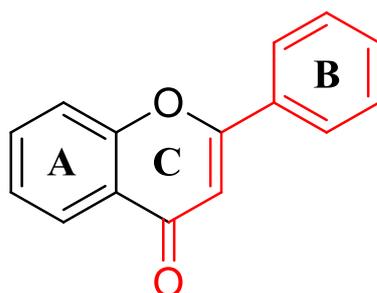
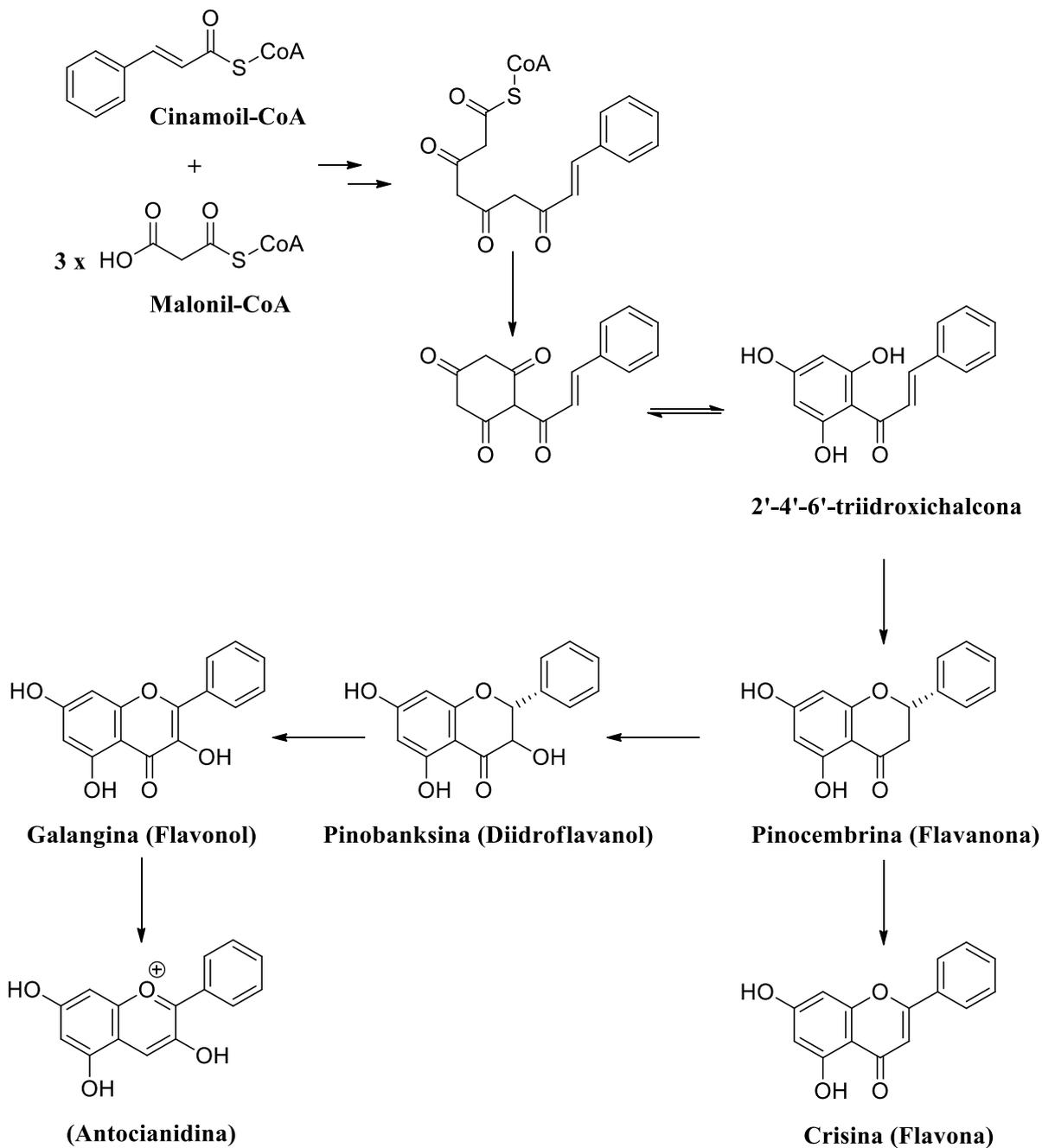


Figura 15 – Núcleo básico de um flavonoide e seus diferentes sistemas aromáticos.

A biossíntese dos flavonoides é conduzida por uma rota mista, pois é necessário um intermediário da via do ácido chiquímico (*p*-cumaroil-CoA ou cinamoil-CoA), e outro intermediário da via do ácido acético (malonil-CoA), através de uma reação de condensação catalisada pela enzima a enzima chalcona-sintase (CHS). A partir da chalcona formada (2'-4'-6'-triidroxichalcona), enzimas específicas catalisam uma série de modificações estruturais para a construção do flavonoide, como a inserção de hidroxilas, metoxilas ou ainda reações redox e glicosilações (WINKEL, 2006; CHEYNER et al., 2013).

De acordo com modificações estruturais no anel C, os flavonoides podem ser divididos em diferentes tipos com características físico-químicas e propriedades biológicas distintas. Na própolis podem ser encontradas diferentes tipos de flavonoides, como flavonóis (quercetina, galangina e canferol), flavonas (apigenina e crisina) e flavanonas (pinocembrina, pinobanksina e naringenina).

O **Esquema 2** apresenta resumidamente o conjunto de reações envolvidas na biossíntese das diferentes classes de flavonoides.



Esquema 2 – Representação geral para a biossíntese de flavonoides (WINKEL, 2006; CHEYNER et al., 2013).

2.4. Propriedades biológicas da própolis e seus constituintes

O Brasil hospeda ao longo do seu território entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, composto por mais 55 mil espécies de plantas endêmicas ou não (BARREIRO e BOLZANI, 2009). Dentro deste aspecto, a produção da própolis depende diretamente do seu local de origem, e por conta dessa grande dependência fitogeográfica, a própolis brasileira apresenta variações significativas no perfil qualitativo de substâncias, o que se reflete

diretamente no espectro de propriedades biológicas do produto natural, principalmente quando comparada com a própolis produzida em outros locais, como os de zonas temperadas (SFORCIN e BANKOVA, 2011; TORETI et al., 2013; HUANG et al., 2014).

As propriedades biológicas da própolis brasileira têm sido amplamente investigadas nos últimos anos, atraindo principalmente o interesse de produtores e consumidores do produto natural em todo o mundo. Esse aspecto contribui significativamente para a realização de outras pesquisas envolvendo a correlação entre o perfil fitoquímico e as propriedades terapêuticas da própolis, principalmente com o objetivo de se obter informações acerca dos princípios ativos mais importantes atrelados a determinada atividade biológica. Assim, a própolis pode ser encarada como uma importante matriz natural para a obtenção de substâncias bioativas que podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos (SFORCIN e BANKOVA, 2010). A **Tabela 7** apresenta algumas das propriedades biológicas atribuídas a própolis verde.

Tabela 7- Propriedades biológicas avaliadas na própolis verde.

Propriedade Biológica	Referência
Antimicrobiana	Aguiar et al., 2014; Cardoso et al., 2016;
Anti-inflamatória	Szliszka et al., 2013; Machado et al., 2014;
Anticâncer	Szliszka et al., 2011; Chan et al., 2012;
Antiparasitária	Salomão et al., 2011;
Imunomoduladora	Cheung et al., 2011; Figueiredo et al., 2014;
Antiviral	Urushisaki et al., 2011;
Laxante	Kakino et al., 2012;
Adjuvante em vacinas	Fischer et al., 2010;
Antifúngica	Dota et al., 2011; Ngatu et al., 2011;
Anti-hipertensiva	Maruyama et al., 2009;
Antioxidante	Simões-Ambrosio et al., 2010; Mello et al., 2012; Salgueiro e Castro, 2016;

De maneira simplificada, as abelhas “escolhem” resinas vegetais específicas para a elaboração da própolis por conta das características físico-químicas do material, principalmente para defesa contra microrganismos. Essa foi uma importante observação que provavelmente impulsionou os estudos de atividade antimicrobiana da própolis. As

propriedades antimicrobianas da própolis são amplamente discutidas na literatura (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

A presença de substâncias fenólicas, tais como os flavonoides, pinocembrina e galangina, contribuem significativamente para o aumento da atividade bactericida e fungicida da própolis, com mecanismo de ação baseado na inibição da RNA-polimerase. Outros estudos sugerem que os flavonoides, além dos ácidos cafeico, benzóico e cinâmico possuem ação antimicrobiana através de danos funcionais e estruturais causados na membrana ou parede celular dos microrganismos (LUSTOSA et al., 2008). Estão listadas na **Tabela 8** algumas substâncias fenólicas que fazem parte da composição química da própolis verde, bem como suas propriedades relatadas na literatura.

Tabela 8 – Substâncias presentes na própolis verde que apresentam propriedades biológicas (adaptado de Toreti et al., 2013).

Substâncias Identificadas	Atividades Biológicas
Acetina	Anti-inflamatória Antimicrobiana
Apigenina	Anti-inflamatória
Artepillin C	Antitumoral Antioxidante
Crisina	Anti-inflamatória Antibacteriana
Ácido cafeico	Anti-inflamatória Antifúngica Antiviral
Ácido cinâmico	Anti-inflamatória
Ácido ferúlico	Anti-inflamatória
Galangina	Anti-inflamatória
Ácido gálico	Anti-inflamatória
Ácido isoferúlico	Anti-inflamatória
Pinostrobima	Anestésica Antibacteriana
Ácido protocatecuico	Antifúngica Anti-inflamatória
Pinocembrina	Anestésica
Ácido <i>o</i> -cumárico	Anti-inflamatória Antiviral
Ácido <i>m</i> -cumárico	Anti-inflamatória
Ácido <i>p</i> -cumárico	Antibacteriana
Quercetina	Anti-histamínica Contra ulcera
Substâncias voláteis	Crescimento capilar Antibacteriana

Em um estudo conduzido por Kujumgiev e colaboradores (1999), amostras de própolis de diferentes localizações e produzida por diferentes espécies vegetais, apresentaram diferenças significativas no perfil químico, porém similar atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus*, *E. coli*), fungo (*Candida albicans*) e vírus (Influenza vírus A). Este estudo comparativo mostrou que a atividade antimicrobiana se manteve para diferentes amostras de própolis, indicando que diferentes combinações de princípios ativos foram essenciais para suas propriedades biológicas, atuando em efeito sinérgico (BANKOVA, 2005).

Um parâmetro crítico a ser considerado na avaliação da atividade biológica da própolis é o tipo de extrato preparado no estudo. Geralmente, etanol e metanol são os mais utilizados para preparar extratos de própolis, especialmente em misturas hidroalcoólicas; a literatura relata que a mistura etanol: água a 70% está relacionada com a recuperação mais eficiente das substâncias bioativas da própolis (SFORCIN e BANKOVA, 2010). Outros solventes de diferentes polaridades (como éter etílico, diclorometano, clorofórmio e *n*-hexano) podem ser utilizados para a extração seletiva de princípios ativos da própolis, contribuindo significativamente para uma maior compreensão acerca das suas propriedades biológicas.

A estratégia de extrair a própolis de maneira fracionada pode ser bastante eficiente no que diz respeito ao conhecimento acerca das classes de princípios ativos que compõem a matriz natural. Componentes específicos da própolis verde, como terpenoides e ésteres aromáticos são melhores extraídos com solventes de baixa polaridade, ou ainda por hidrodestilação de seus óleos essenciais. O óleo essencial de própolis verde demonstrou atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies do gênero *Staphylococcus* (*S. aureus*; *S. epidermidis*; *S. pyrogenes*), além de ser ativo também contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.* e *Salmonella sp.* (GELINSKI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com Gelinski e colaboradores (2007) o sesquiterpeno (*E*)-nerolidol é o componente mais ativo do óleo essencial de própolis verde, identificado com frequência em amostras de própolis de diferentes localidades e também no alecrim-do-campo, sua principal fonte botânica (CHANG et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2011).

Lage e colaboradores (2015) observaram uma boa atividade do óleo essencial de alecrim-do-campo frente às larvas do ectoparasita *Rhipicephalus microplus*, destacando o (*E*)-nerolidol como seu componente mais ativo, com índice de mortalidade próximo a 100% na concentração de 15,0 mg.mL⁻¹. No estudo conduzido por Búfalo e colaboradores (2009), os

componentes majoritários do óleo essencial de alecrim-do-campo, (*E*)-nerolidol e espatulenol, além do próprio óleo essencial, apresentaram também atividade antiviral (poliovírus).

Partindo da matriz bruta, Cardoso e colaboradores (2016) constataram que extrato hidroalcoólico (80%) de própolis verde apresenta elevada atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, inibindo sua produção de biofilme. Em outro estudo realizado por Veiga e colaboradores (2016), extratos foram preparados tendo o *n*-hexano e o etanol (96%) como solventes extratores; a atividade antimicrobiana do extrato etanólico (frente a diferentes cepas de *S. aureus*) se mostrou superior quando comparada com a atividade observada para o extrato *n*-hexânico. O extrato hidroalcoólico comercial de própolis verde (11% em massa) também apresentou atividade antimicrobiana contra cepas resistentes a meticilina (MRSA) de *S. aureus* (AGUIAR et al., 2014).

Em um estudo realizado por Aga e colaboradores (1994), que isolaram pela primeira vez o biomarcador da própolis verde, foi possível verificar o Artepillin C como componente antimicrobiano mais ativo; sua atividade contra diferentes bactérias (*Bacillus cereus*; *Enterobacter aerogenes*; *Arthroderma benhamiae*) se mostrou superior à outros ácidos fenólicos prenilados como a bacarina, e não prenilados como o ácido *para*-cumárico. Assim, esse estudo pode indicar que a presença de grupos prenila substituídos ao anel aromático, além da hidroxila livre na posição 4, podem contribuir significativamente para a atividade antimicrobiana dos derivados do ácido cinâmico (AGA et al., 1999).

Extratos aquosos de própolis verde têm sido investigados quanto sua atividade anti-inflamatória. De acordo com Machado e colaboradores (2014), o extrato aquoso de própolis verde apresentou atividade anti-inflamatória (local e sistêmica) resultante de uma ação imunomoduladora. O estudo sugeriu também que a atividade estava relacionada com o sinergismo entre diferentes ácidos fenólicos, sendo que as amostras com melhor atividade anti-inflamatória apresentaram também teores mais elevados de Artepillin C (MACHADO et al., 2014). A literatura relata atividade anti-inflamatória e analgésica para o Artepillin C em ratos, e seu mecanismo de ação também foi descrito (PAULINO et al., 2008).

De Moura e colaboradores (2011^b) destacaram que o extrato aquoso de própolis verde estava envolvido na regulação de citocinas que são secretadas pelas células durante o processo inflamatório, sendo capaz de inibir a angiogênese inflamatória. Os principais componentes da própolis verde com elevada solubilidade em água foram os derivados do ácido cafeoilquínico (como o ácido clorogênico), sugerindo que esses componentes podem ser responsáveis pela resposta anti-inflamatória causada pelo extrato aquoso da própolis verde (DE MOURA et al.,

2011^a). Além da atividade anti-inflamatória, Urushisaki e colaboradores (2011) constataram que esses derivados são os principais responsáveis pela atividade antiviral do extrato aquoso de própolis verde, avaliado contra o *Influenza vírus*.

A própolis atualmente tem sido muito consumida por conta da presença de antioxidantes. Antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de proteger um sistema biológico contra o estresse oxidativo – dano causado às células e tecidos pelo desequilíbrio na geração de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 2011). Atualmente existe um crescente interesse no estudo de substâncias naturais com propriedades antioxidantes, principalmente por conta da correlação existente entre o desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e algumas doenças (LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013).

As EROs (espécies reativas de oxigênio) são derivadas do metabolismo do oxigênio, e além delas, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) também podem ser geradas como consequência de reações mitocondriais, metabolismo oxidativo e função imunológica. Em níveis baixos, as EROs desempenham papéis indispensáveis no metabolismo celular, pois participam ativamente de processos bioquímicos envolvidos na transmissão de mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa (LIMA e BEZERRA, 2012). Em altas concentrações, essas espécies são capazes de causar distúrbios no metabolismo através da reação com diferentes biomoléculas, como as bases nitrogenadas do DNA ou RNA, proteínas, cofatores enzimáticos e lipídios, podendo desencadear um processo de morte celular (VAN DEN ENDE et al., 2011).

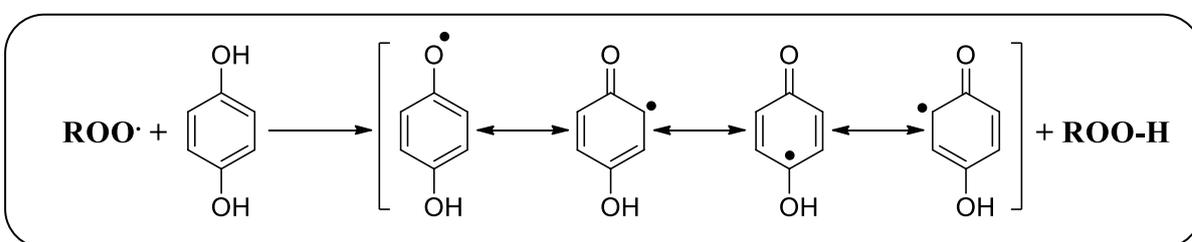
Entre as EROs formadas durante o metabolismo destacam-se o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion hidroperoxila ($\text{HO}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); entre as ERNs destacam-se principalmente o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e o peroxinitrito ($\text{ONO}_2^{\cdot-}$) (ROLEIRA et al., 2015). O dano acumulativo causado às células pelas EROs e ERNs pode estar relacionado com o processo de envelhecimento, e com o desenvolvimento de diversas doenças, tais como: arteriosclerose, câncer, diabetes (tipo 2) e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer (VAN DEN ENDE et al., 2011).

Assim, a capacidade antioxidante de produtos naturais tem recebido atenção científica em diferentes estudos que envolvem, principalmente, produtos naturais populares ou frequentemente consumidos – como é o caso da própolis. A composição química da própolis contém substâncias polifenólicas (como ácidos fenólicos e flavonoides) que são capazes de

combater radicais livres, podendo contribuir para a proteção celular contra o estresse oxidativo e prevenção de algumas doenças (HELENO et al., 2015).

Alguns ácidos fenólicos e flavonoides como ácido gálico, clorogênico, *p*-cumárico, protocatecuico, ferúlico, cafeico, quercetina, canferide e canferol podem ser encontrados em quantidades significativas na própolis, estando diretamente relacionados com seu elevado potencial antioxidante (SALGUEIRO et al., 2014; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Os ácidos fenólicos, bem como os flavonoides, possuem baixo potencial redox e consequentemente, capacidade de interagir com radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio; o radical resultante é então mais estável e menos agressivo.

A capacidade antioxidante de substâncias fenólicas está relacionada com a possibilidade de realizar ressonância, o que estabiliza o radical fenoxila, combinado com fatores estruturais, como número e posição de substituição de hidroxilas ligadas ao anel aromático, além da presença e posição de grupos protetores, como metoxilas e substituintes alifáticos. A diminuição da densidade eletrônica no átomo de oxigênio ocorre por causa da ressonância com o anel aromático, o que facilita a captação do hidrogênio por um radical livre e sua estabilização (**Esquema 3**).



Esquema 3 – Estruturas de ressonância que estabilizam um radical fenólico (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

Outro fator que também pode contribuir para o potencial antioxidante de uma substância fenólica é a capacidade de quelar íons metálicos, principalmente ferro e cobre. Íons como Fe(II) são capazes de gerar radicais hidroxila, sendo estes sequestrados por complexos redox para a prevenção do estresse oxidativo em células (PROUSEK, 2007; KUREK-GÓRECKA et al., 2014). A **Figura 16** apresenta os sítios de quelação de metais que podem estar presentes em uma substância fenólica.

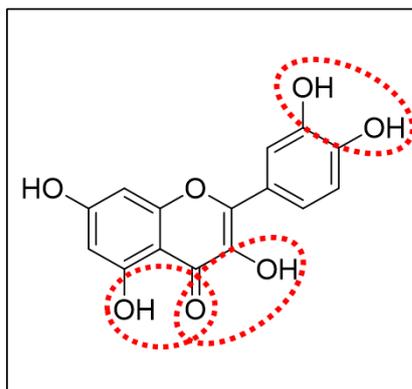


Figura 16 – Sítios de quelação de metais possíveis em um flavonoide (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

Matrizes complexas, como a própolis, desempenham atividade antioxidante através do efeito sinérgico de seus componentes fenólicos. Assim, o uso de diferentes metodologias analíticas para avaliar a capacidade antioxidante, é necessário para verificar os diferentes aspectos da reatividade de uma substância polifenólicas com propriedades antioxidantes (LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013). São essenciais também outros tipos de ensaios que avaliem a resposta antioxidante a nível celular, pois a capacidade antioxidante de uma substância ou extrato natural irá depender da biodisponibilidade dos componentes após o consumo.

A avaliação do potencial antioxidante de substâncias fenólicas é descrita amplamente na literatura por diferentes metodologias *in vitro*, e cada método varia de acordo com o tipo de radical gerado, método de detecção desse radical, quantificação entre outros fatores. A estratégia utilizada nesses ensaios é a de promover uma reação entre um radical livre e uma molécula-alvo, gerando no meio alguma alteração mensurável (cor, potencial redox) que permita a sua quantificação (LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013). Os principais métodos para avaliar a capacidade antioxidante envolvem a captura dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS) e radical peroxila (ORAC – capacidade de absorção de oxigênio radicalar); outros métodos envolvem mecanismos não-radicalares, como o poder antioxidante de redução do íon Fe(III) (FRAP), além da quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico). A estrutura das principais substâncias utilizadas para mensurar a capacidade antioxidante de substâncias fenólicas está apresentada na **Figura 17**.

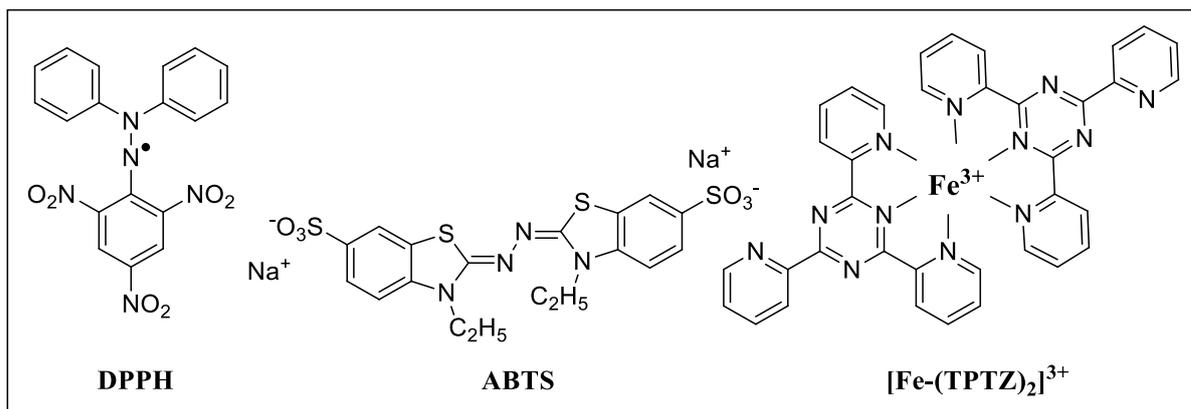


Figura 17 – Radicais DPPH e ABTS utilizados para determinar a capacidade antioxidante, e o complexo de Fe(III) utilizado no ensaio FRAP.

Em um estudo conduzido por Sroka e Cisowski (2003), diferentes derivados do ácido benzóico foram estudados frente ao radical orgânico DPPH por espectrofotometria, sendo possível estabelecer uma relação entre a capacidade antioxidante destes ácidos e a posição dos grupos hidroxila no anel aromático (**Figura 18**). Entre os ácidos avaliados, o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) apresentou 75,0% de inibição dos radicais livres, sendo esta a melhor capacidade antioxidante entre os ácidos testados. Em seguida, os ácidos 3,4-diidroxibenzóico e 2,3-diidroxibenzóico apresentaram atividade semelhante, inibindo respectivamente 41,2 e 46,0% dos radicais DPPH. Os ácidos 3,5-diidroxibenzóico e 2,4-diidroxibenzóico, em que as hidroxilas são substituídas entre si na posição *meta*, apresentaram atividades mais baixas, sendo respectivamente 0,60 e 0,07% de inibição. Os derivados com apenas uma hidroxila substituída não apresentaram atividade antioxidante, independentemente da posição relativa da hidroxila (*orto*, *meta* ou *para*).

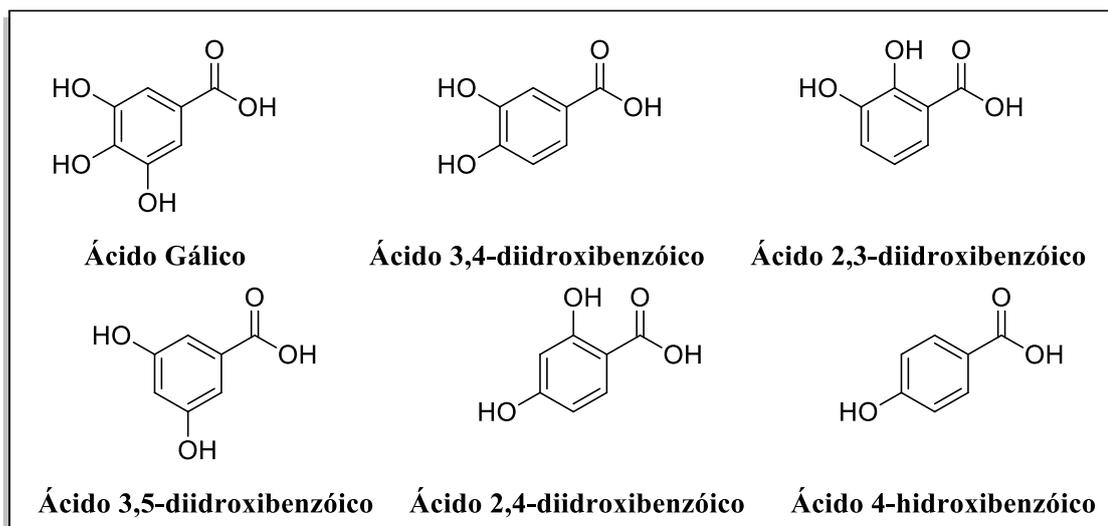


Figura 18 – Derivados do ácido benzóico com atividade antioxidante frente ao radical DPPH.

Para os fenilpropanoides, em especial os derivados do ácido cinâmico, a existência de uma cadeia lateral com grupo etileno contribui, de maneira geral, para uma melhor atividade antioxidante comparada aos derivados do ácido benzóico. Da mesma forma, grupos doadores como metoxilas e hidroxilas aumentam a estabilização dos radicais quando substituídos na posição *orto*, e conseqüentemente melhoram sua capacidade antioxidante (SOARES, 2002; GULÇIN, 2012; KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

2.5. A doença de Chagas

2.5.1. Aspectos gerais da doença

A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários uniflagelados que são exclusivamente parasitas encontrados, primeiramente, em diferentes insetos (PODLIPAEV, 2001). Poucos gêneros são caracterizados por um ciclo de vida que envolve um hospedeiro secundário, que pode ser vertebrado, invertebrado ou vegetal, e tais espécies são de grande interesse clínico por causarem uma série de doenças.

Entre os parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae, a espécie *Trypanosoma cruzi* é conhecida por ser o agente etiológico da doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana), que mesmo após 100 anos de sua descoberta por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), continua a representar um dos maiores problemas de saúde pública na América Latina, incluindo no Brasil (MOLINA-GARZA et al., 2014). Os aspectos infecciosos da tripanossomíase americana – como a identificação do agente etiológico, formas de transmissão, hospedeiros e manifestações clínicas – foram completamente elucidados por

Carlos Chagas, único cientista na história da medicina com esse feito. O mecanismo de infecção vetorial da doença de Chagas encontra-se na **Figura 19**.

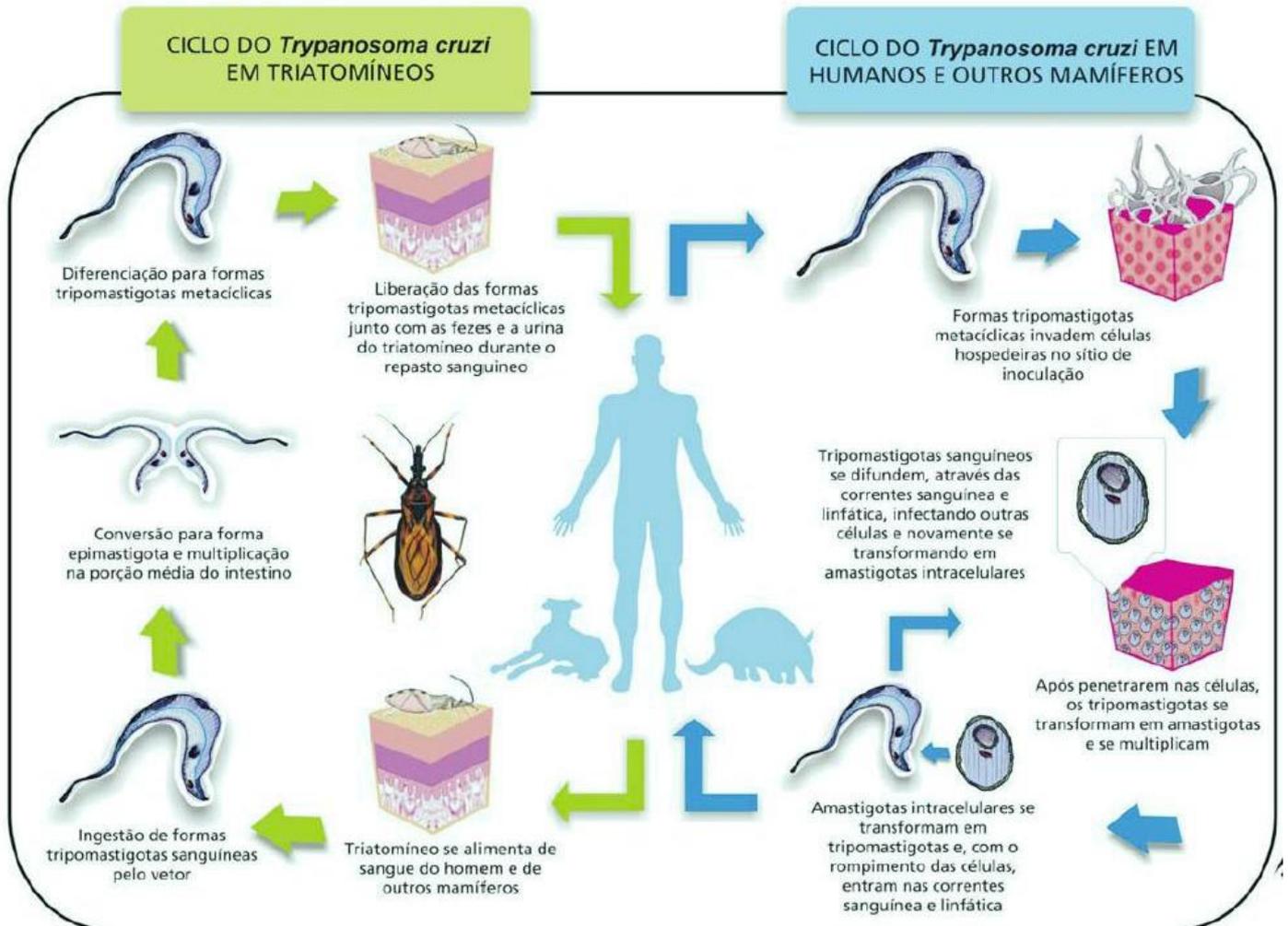


Figura 19 – Ciclo simplificado de transmissão do *Trypanosoma Cruzii*. (Fonte: Infográfico- Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz)

A transmissão do parasito ocorre de maneira vetorial, através da picada de um triatomíneo em um indivíduo sadio. Tais insetos são hematófagos pertencentes à família Reduviidae, onde os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* configuram mais de 140 espécies, sendo 61 delas endêmicas do Brasil (COSTA e PATERSON, 2012). O vetor de transmissão mais conhecido para esta doença foi identificado por Carlos Chagas, sendo da espécie *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro” (CARDENAS-SÁNCHEZ et al., 2003).

A picada do triatomíneo não está envolvida diretamente no processo de transmissão das formas viáveis de *T. cruzi* ao hospedeiro vertebrado. Durante a alimentação do inseto, que

possui um aparelho digestivo relativamente curto, o mesmo defeca no exato momento da alimentação liberando o parasito nas próprias fezes. As formas infectivas são carregadas para corrente sanguínea quando o indivíduo reage ao prurido causado pela picada do inseto, ou ainda através da mucosa ocular (ARGOLO et al., 2008; DE SOUZA et al., 2009).

Outras formas de contágio acidental têm se tornando frequentes nos últimos anos, principalmente por via oral (BASTOS et al., 2010); por conta da migração populacional, rotas de contágio não vetoriais são cada vez mais comuns em países onde a transmissão através do barbeiro não ocorre, principalmente na Europa, Japão, Austrália e Estados Unidos (MOLINA-GARZA et al., 2014; BERN et al., 2011; BERN, 2015). Nessas localidades, as infecções registradas acontecem a partir de indivíduos já infectados com o parasito, principalmente via transfusão de sangue (KIRCHHOFF et al., 2006; GALAVIZ-SILVA et al., 2009), órgãos transplantados e transmissão congênita (GÜRTLER et al., 2003; SCHMUNIS, 2007). Estima-se que o número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* esteja entre 6 e 7 milhões, localizados principalmente na América Latina, em um quadro com cerca de 12 mil mortes para 50 mil casos registrados anualmente (MOLINA-GARZA et al., 2014; PEREIRA et al., 2017).

Uma característica específica dos tripanosomatídeos é a capacidade de se apresentar em diferentes formas, podendo estas ser infecciosas ou não. O ciclo de vida do *T. cruzi* é um dos mais complexos e envolve diferentes estágios de desenvolvimento entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como na corrente sanguínea e em células hospedeiras específicas (DE SOUZA et al., 2010). Uma vez infectado, o parasito na sua forma tripomastigota é capaz de se aderir à célula hospedeira no local de inoculação (fibroblastos, macrófagos ou células epiteliais) através do reconhecimento de moléculas específicas (em sua maioria, glicoproteínas), iniciando assim o processo de internalização que caracteriza seu ciclo de vida intracelular.

Contudo, é preciso ressaltar que os mecanismos envolvidos no processo de adesão do parasito à célula hospedeira são muito complexos, e dependem de diversos fatores como tipo de cepa que causou a infecção, qual forma evolutiva do parasito está envolvida (tripomastigota ou amastigota), além das variações de cada forma (tripomastigota metacíclica, sanguínea ou celular), e a variação da célula hospedeira (ROMANO et al., 2012).

O ciclo de vida do parasito no vetor de transmissão é diferente do seu ciclo dentro do hospedeiro. O triatomíneo pode entrar em contato com *T. cruzi* ao se alimentar do sangue de um paciente infectado, carregando para si o parasito na sua forma tripomastigota. Apesar de

maioria dessas formas acaba se tornando inviável ainda no estômago do triatomíneo (CASTRO et al., 2017), os indivíduos ainda viáveis sofrem um processo de diferenciação para formas epimastigotas (não infectivas), e permanecem aderidos à membrana perimicrovilar do intestino até se “destacarem” nas regiões mais posteriores onde passam por outra diferenciação para formas tripomastigotas metacíclicas, altamente infecciosas, liberadas nas fezes do inseto no momento em que ele entra em contato com outro hospedeiro humano (GARCIA et al., 2007).

2.5.2. Tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas atualmente representa um problema de saúde pública que gera uma série de impactos socioeconômicos negativos, principalmente porque os locais mais afetados são aqueles onde a infecção pelo *T. cruzi* acontece de forma vetorial, sendo países de população pobre: na América Latina, os países mais atingidos são Panamá, Costa Rica, Bolívia, Venezuela e regiões interioranas como o Nordeste do Brasil e o Norte da Argentina (REITHINGER et al., 2011). A prevalência da doença nessas regiões se mantém por anos devido ao fato de que existe pouco interesse por parte da indústria farmacêutica e dos sistemas de saúde pública na investigação e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes que podem levar à cura do paciente (SIMPSON et al., 2006; SUETH-SANTIAGO et al., 2016), o que caracteriza uma doença negligenciada.

O problema mais crítico que envolve as doenças negligenciadas é a quantidade limitada de fármacos disponíveis para o tratamento dos pacientes. Atualmente, os tratamentos disponíveis para a doença de Chagas são eficazes apenas na forma aguda da doença, que ocorre em uma janela de tempo relativamente pequena durante o início da infecção, sendo que esta etapa da doença é sintomática em aproximadamente 10% dos indivíduos infectados, dificultando o diagnóstico (CUNHA et al., 2011). O quadro clínico da fase aguda caracteriza-se por um estado febril prolongado, cefaleia, artralgia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, *rash* cutâneo e edemas (GASCÓN et al., 2007). As manifestações mais perigosas acontecem após um longo período de latência, que caracteriza o intervalo entre a fase aguda e a fase crônica da doença. Após essa etapa, o paciente que não for tratado a tempo passa para a fase crônica, onde apresenta várias formas clínicas, incluindo problemas cardíacos (20 a 30% dos casos) e digestivos (cerca de 10% dos casos), podendo também ocorrer em associação. O paciente infectado pode passar por diferentes períodos de latência, sem nenhum período de

manifestação clínica e este aspecto da doença é o que torna seu diagnóstico ainda mais difícil (CUNHA et al., 2011).

Os fármacos disponíveis no mercado atualmente são nitroheterocíclicos (**Figura 20**) que além de não serem eficientes na fase crônica da doença, possuem elevada toxicidade, podendo causar efeitos graves que podem levar ao abandono do tratamento (CUNHA et al., 2011).

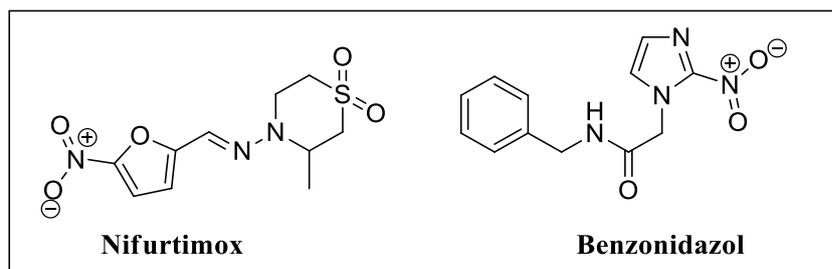


Figura 20 – Fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas.

O Nifurtimox foi um fármaco lançado na década de 1960 cuja distribuição foi descontinuada devido à baixa eficácia na fase crônica da doença e aos severos efeitos adversos caracterizados por problemas gastrointestinais, distúrbios no sistema nervoso central e neuropatia periférica (COURA e DE CASTRO, 2002). O mecanismo de ação desse fármaco no parasito envolve a geração de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), nocivas ao parasito (BOIANI et al., 2010). Por conta da baixa seletividade, essas EROs acabam sendo geradas também em outras células não infectadas, causando diversos danos.

O Benzonidazol é atualmente o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas. Por conta de diferenças no potencial eletroquímico seu mecanismo de ação não se passa pela geração de EROs, sendo relativamente menos perigoso quando comparado ao Nifurtimox. O que pode explicar a toxicidade seletiva deste fármaco é a geração de espécies nitro e nitroso, que se ligam de forma irreversível a tripanotona, um cofator essencial para a viabilidade do parasito (MITSCHER et al., 2012).

A longa administração desses fármacos desencadeia uma série de efeitos adversos, o que torna a relação custo-benefício inviável para o tratamento da fase crônica da doença. Assim, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas tem sido um grande desafio sob diferentes aspectos: além da necessidade de novas moléculas com maior seletividade, ou seja, que sejam menos tóxicas para um melhor tratamento, a falta de

novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas contribuem para o desenvolvimento de resistência aos medicamentos amplamente utilizados ao longo de mais 40 anos (MOLINA-GARZA et al., 2014).

Dentro nesse contexto, produtos naturais têm sido vistos como uma nova abordagem para a identificação de substâncias bioativas e essa alternativa permite que uma grande diversidade estrutural seja investigada (PEREIRA et al., 2017). Em um levantamento feito por Newman e Cragg (2012) acerca do número de fármacos aprovados entre os anos de 1981 e 2010, foi possível constatar que grande parte deles é de origem natural – seja ele um análogo, um derivado semissintético ou uma substância sintética com grupo farmacofórico de uma molécula natural. A literatura relata atividade tripanocida para diversas classes de substâncias naturais, tais como substâncias fenólicas, terpenoides, quinonas e alcaloides (SALEM e WERBOVETZ, 2006).

A biodiversidade brasileira é muito complexa, e diferentes plantas têm sido investigadas quanto a sua atividade antiparasitária em diferentes regiões do país (PIZZOLATTI et al., 2002; DE MESQUITA et al., 2005; ALVES et al., 2011; DE SOUZA et al., 2017). Essa biodiversidade se reflete na complexa composição química da própolis, fator que justifica os estudos sobre suas propriedades biológicas, frequentemente associadas com a presença de substâncias fenólicas (flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres) e suas propriedades antioxidantes (ICHIKAWA et al., 2002; CUNHA et al., 2011). A atividade antiparasitária da própolis brasileira é relatada na literatura frente a diferentes formas de *T. cruzi* com resultados promissores, que impulsionam a investigação acerca de seus princípios ativos (HIGASHI e CASTRO, 1994; CASTRO e HIGASHI, 1995; CUNHA et al., 2004; SALOMÃO et al., 2007; SALOMÃO et al., 2011; SILVA et al., 2017).

De acordo com a literatura, a atividade antiparasitária da própolis verde está relacionada com a presença de derivados do ácido cinâmico, como o biomarcador Artepillin C. Na própolis produzida em zonas temperadas, flavonoides como pinostrombina, pinocembrina e crisina (que estão presentes na própolis verde, porém em quantidades menores) são destacados como principais agentes tripanocida, juntamente com ésteres derivados do ácido cafeico, cinâmico e ferúlico, como o cafeato de fenetila – CAPE (PRYTZYK et al., 2003).

Em trabalho desenvolvido por Cunha e colaboradores (2004), foi possível constatar que a atividade antiparasitária de diferentes extratos da própolis verde produzida no estado de São Paulo estava correlacionada com a presença do Artepillin C e do ácido ferúlico, uma vez

que os extratos mais ativos apresentaram teores elevados dessas substâncias. Salomão e colaboradores (2007) também constataram correlação positiva entre o teor de Artepillin C e a atividade antiparasitária da própolis produzida no estado de Minas Gerais, não havendo correlação significativa com o teor de flavonoides.

Marcucci e colaboradores (2001) avaliaram a atividade antiparasitária de derivados prenilados isolados da própolis verde (**Figura 21**) contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Eles observaram que o Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e a drupanina (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico) apresentaram similar toxicidade frente às formas infectivas do parasito, e entre os seus respectivos derivados heterocíclicos 2,2-dimetil-6-carboxietenil-1-benzopirano (DCBEN) e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-1-benzopirano (DPB), o derivado não-prenilado DCBEN foi o que se mostrou menos tóxico ao parasito. Através dessas observações pôde-se inferir que a presença de pelo menos um grupo prenila ligado ao anel aromático influencia positivamente na atividade dos derivados fenólicos frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

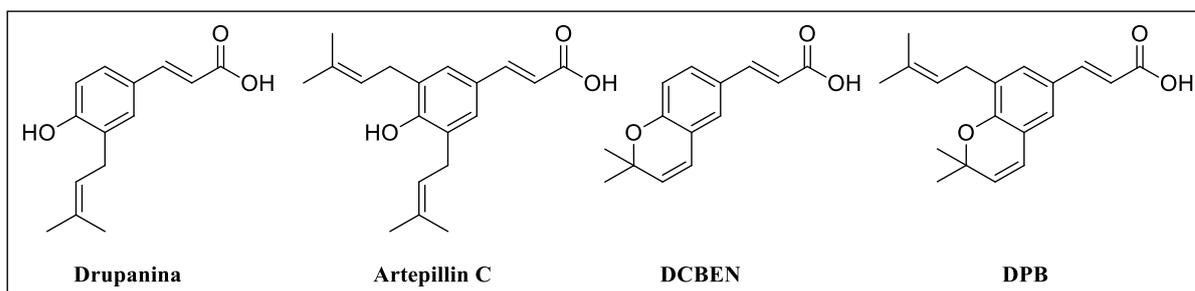


Figura 21 – Estruturas dos derivados da própolis verde com atividade antiparasitária (Marcucci et al., 2001).

Salomão e colaboradores (2011) constataram que a atividade tóxica da própolis verde produzida em Minas Gerais contra *T. cruzi* é dose-dependente, e mais suscetível nas formas amastigotas, quando comparado com as formas epimastigotas. Os estudos se mostraram promissores por conta da elevada atividade do extrato em modelos *in vitro* e *in vivo*. Foi proposto que a toxicidade da própolis sob formas epimastigotas se dá através de mudanças morfológicas em diferentes organelas vitais para o parasito (reservossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias), enquanto nas formas tripomastigotas o tratamento com a própolis causa alterações na membrana plasmática (SALOMÃO et al., 2011).

Com relação a outros tipos de própolis, Silva e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antiparasitária das própolis verde (região Sudeste), vermelha (região Nordeste) e marrom (região Sul). As amostras de própolis vermelha obtida nos estados de Sergipe e

Alagoas apresentaram a melhor atividade frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, quando comparada aos extratos de própolis verde e marrom. Diferente do que foi observado para a própolis verde, a atividade da própolis vermelha nas formas epimastigotas de *T. cruzi* não é dose-dependente, e apresentaram redução de até 99% dos parasitos viáveis (SILVA et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar e identificar os constituintes majoritários da própolis verde, determinar o teor de substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante de três amostras de própolis verde (*Apis mellifera* L.), bem como avaliar sua atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da polaridade dos solventes (etanol e *n*-hexano) no preparo dos extratos de própolis verde.
- Determinar o teor de substâncias fenólicas (fenólicos totais e flavonoides), e a capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) dos diferentes extratos de própolis verde.
- Isolar e caracterizar, espectroscopicamente, os principais constituintes da própolis verde.
- Quantificar os principais constituintes presentes nos extratos de própolis verde por CLAE-DAD com fase reversa,
- Avaliar a atividade antiparasitária dos extratos de própolis verde e seus principais derivados prenilados frente ao parasito *Trypanosoma cruzi*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material e métodos

Todos os solventes usados nos ensaios espectrofotométricos e cromatográficos realizados neste trabalho foram grau espectroscópico (VETEC, RJ), e todas as soluções aquosas foram preparadas usando água ultrapura obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, SP).

Os reagentes: carbonato de sódio anidro e cloreto de alumínio hexaidratado foram comprados da VETEC (RJ). Os reagentes utilizados nos ensaios antioxidantes – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2-2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6 ácido sulfônico (ABTS) e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (Merk).

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

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em um espectrômetro da marca Bruker, modelo Ultrashield Plus (Central Analítica Multiusuário-PPGQ – UFRRJ). Os solventes utilizados nesta análise foram todos deuterados (CDCl_3 e CD_3OD), tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

A análise de cromatografia em fase gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) foi realizada em um aparelho da marca Shimadzu (GC-17A) acoplado a um detector de espectrometria de massas QP2010 Plus (Shimadzu), no modo de ionização por elétrons a 70eV e analisador do tipo quadrupolo, e a varredura foi feita na faixa de massa de 40 a 400 u.m.a. . As análises foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme, Agilent), no modo com divisão de fluxo (*split*) 30:1, com linha de transferência a 290 °C, gás de arraste hélio com vazão de 1 mL.min⁻¹. A temperatura inicial do forno cromatográfico foi de 60 °C por 5 minutos, com taxa de aquecimento de 10 °C/min até 290 °C, permanecendo nesta condição por 15 minutos. Os fragmentos foram descritos como razão de massa atômica por carga (m/z).

4.2. Amostras de própolis estudadas

Neste trabalho, três amostras de própolis verde foram obtidas no ano de 2012 de diferentes localidades no Estado do Rio de Janeiro. A própolis *in natura* foi coletada por apicultores locais pelo método de raspagem (modelo Longstroth). A relação das amostras estudadas encontra-se na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Amostras de própolis verde estudadas neste trabalho.

Amostras	Origem Geográfica
P2	Mesquita - RJ
P5	Carmo - RJ
P12	Paracambi - RJ

As amostras de própolis bruta tiveram suas impurezas (pedaços de madeira, folhas e insetos mortos) removidas por catação, e posteriormente resfriadas. As amostras de própolis completamente resfriadas (nitrogênio líquido) foram então pulverizadas em liquidificador semi-industrial (marca Cadence, modelo Thunder Blender LIQ600), armazenadas em frascos e mantidas, sob refrigeração e abrigo de luz, até o preparo dos extratos (**Figura 22**).



Figura 22 – Amostra de própolis verde bruta e pulverizada (arquivo pessoal).

4.3. Preparo dos extratos de própolis verde

Os extratos foram todos preparados em extrator Soxhlet, partindo-se de 3,00 g da amostra de própolis verde bem triturada compactadas em cartucho de celulose. As amostras foram extraídas separadamente por 6 h com 150 mL de etanol P.A. (96%) e 150mL de *n*-hexano, para obtenção do extrato etanólico de própolis (**EEP**) e do extrato hexânico de

própolis (**EHP**), respectivamente. Após o tempo de extração, os solventes foram removidos com auxílio de evaporador rotativo e o extrato bruto seco foi solubilizado em metanol P.A. (95%). A solução metanólica contendo o extrato bruto (EEP ou EHP) foi mantida sob baixa temperatura durante no mínimo 12 h para decantação do conteúdo de ceras extraído; após o período de descanso, os extratos foram filtrados à vácuo, secos em rotaevaporador, pesados e armazenados até o momento das análises. Este extrato seco foi utilizado em todos os ensaios químicos (fenólicos e flavonoides totais, capacidade antioxidante, CLAE-DAD) e também nos ensaios biológicos (adaptado de SALGUEIRO, 2016).

4.4. 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 descrita por Park e colaboradores (2000), com modificações. Os extratos de própolis verde (EEP e EHP) foram previamente solubilizados em metanol espectroscópico na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. Alíquotas de 10 µL 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 (200 a 500 nm).

4.5. Determinação do teor de fenólicos totais

O ensaio de determinação do teor de fenólicos totais foi realizado 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. Foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Uma alíquota (50 µL) de cada um dos extratos foi transferida para um tubo de ensaio, onde foi acrescentado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10, previamente diluído em água ultrapura) e 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ (4%) recém preparada em água ultrapura. A mistura reacional ficou em repouso durante 5 minutos em banho à 50 °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 total de substâncias fenólicas foi inferido por interpolação da absorbância de acordo com uma curva analítica construída a partir do padrão comercial Ácido Gálico. A curva

analítica foi construída a partir uma solução metanólica do padrão comercial, com faixa de concentração que variou de 25 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e o ensaio foi realizado a partir de 50 μL de cada uma das soluções, de diferentes concentrações, 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 23**). 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 ($E_{AG}\cdot 100\text{ mg}^{-1}$ de extrato).

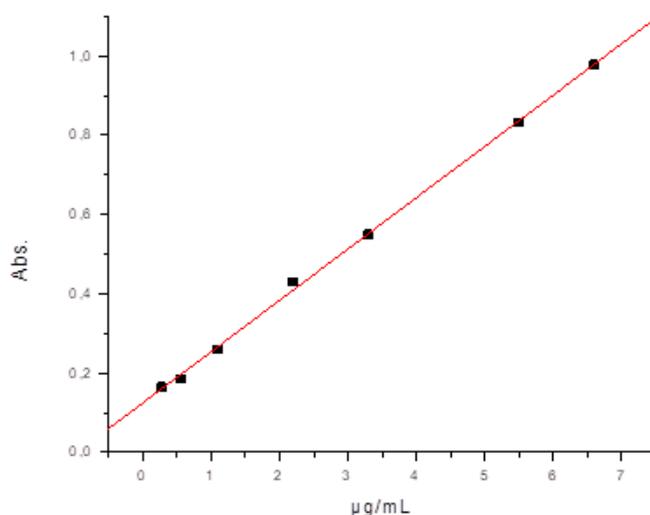


Figura 23 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorbância (Y), construída para a análise de fenólicos totais a partir do padrão comercial de ácido gálico.

4.6. 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 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em metanol espectroscópico no momento do ensaio. Foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Uma alíquota (400 μL) de cada um dos extratos foi transferida para um balão volumétrico com 10 mL de capacidade, onde foi acrescentado 200 μL de uma solução metanólica recém-preparada de AlCl_3 (2%). O volume total do balão com completado com metanol espectroscópico e a solução ficou em repouso à temperatura ambiente durante 30

minutos, quando foi possível observar uma intensificação na cor amarela. A leitura foi feita após o tempo de incubação a leitura foi feita com comprimento de onda fixo em 425 nm, tendo como branco metanol espectroscópico (SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

O teor de flavonoides totais foi inferido por interpolação da absorbância de acordo com uma curva analítica construída a partir da Quercetina. A curva analítica foi construída a partir uma solução metanólica do padrão comercial, com faixa de concentração que variou de 1 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e o ensaio foi realizado a partir de 4000 μL de cada uma das soluções, em diferentes concentrações, sob as mesmas condições reacionais. A construção da curva analítica foi conduzida no *software* Origin 6.0 (**Figura 24**). 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 3 repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato (Eq. 100 mg^{-1} de extrato).

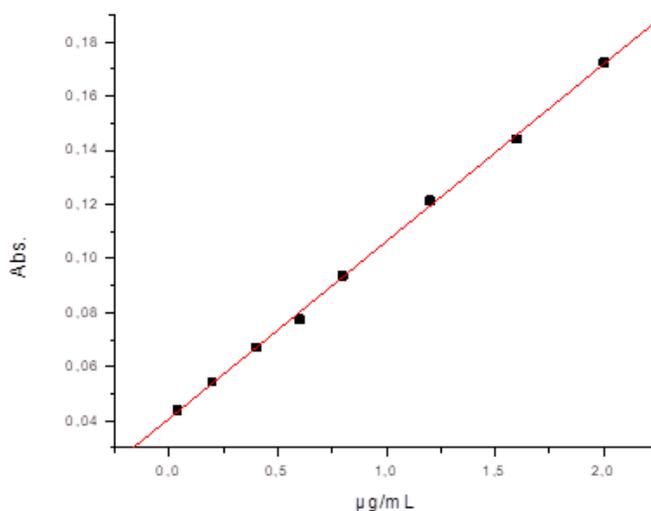


Figura 24 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorbância (Y), construída para a análise de flavonoides totais a partir do padrão comercial de quercetina.

4.7. Determinação da capacidade antioxidante – sequestro de radicais livres DPPH

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada de acordo com a metodologia descrita na literatura por Salgueiro e Castro (2016). Neste ensaio, foi medida 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:

$$AA\% = 100 - \frac{AbsA - AbsB}{AbsC} \times 100$$

Onde: **AbsA** representa a absorbância da amostra com a solução do radical DPPH, **AbsB** representa o branco do ensaio, sendo este a amostra com metanol, e **AbsC** representa o controle negativo do ensaio, sendo este a absorbância do DPPH em solução metanólica.

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 μL 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 μL de metanol espectroscópico. O branco foi preparado a partir de uma alíquota de 29 μL de metanol espectroscópico com 71 μL do extrato de própolis diluído, nas colunas 10, 11 e 12 das respectivas fileiras B, C e D. Em seguida, foram pipetados 29 μL de uma solução recém preparada com o radical DPPH (0,3 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 minutos, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA, com UV fixo em 520 nm (SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

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

4.8. Determinação da capacidade antioxidante – método de redução do Fe^{3+}

O ensaio FRAP (*ferric reducing antioxidant 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

(Fe²⁺-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 minutos, 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 analítica foi construída a partir de uma solução aquosa preparada com o padrão FeSO₄.7H₂O, em uma faixa de concentração que ficou entre 100 e 1000 µM. Alíquotas de 0,5 mL de cada uma das soluções, das diferentes concentrações, foram pipetadas e tratadas sob as mesmas condições do ensaio. A construção da curva foi realizada no *software* Origin 6.0 (**Figura 25**). 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 3 repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de Trolox por 100 mg de extrato (\bar{E}_{TROLOX} .100 mg⁻¹ de extrato).

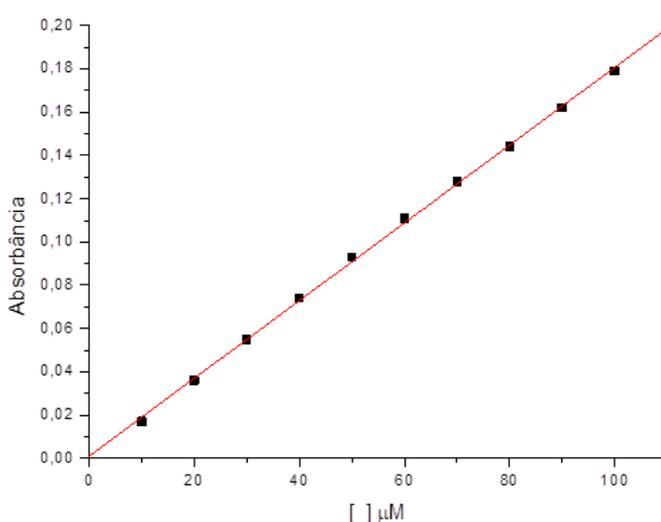


Figura 25 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorbância (Y), construída para a análise de FRAP a partir do padrão comercial de FeSO₄.7H₂O.

4.9. Determinação da capacidade antioxidante – sequestro do radical-cátion ABTS⁺

A capacidade antioxidante avaliada pelo método de sequestro dos radicais ABTS⁺ 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 absorbância de 0,700 (± 0,05) com comprimento de onda fixo em 734 nm.

A uma alíquota de 50 µL de cada um dos extratos (1,0 mg.mL⁻¹) foi adicionado 5,0 mL do reagente ABTS⁺ 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 soluções padrão de Trolox, onde as faixas de concentração ficou entre 0,6 a 2,4 mmol.L⁻¹. A curva analítica foi construída com auxílio do *software* Origin 6.0 (Figura 26), e todas as análises foram realizadas com 3 repetições. Os resultados são expressos em mg equivalentes de Trolox por 100 mg de extrato ($E_{TROILOX}$.100 mg⁻¹ de extrato).

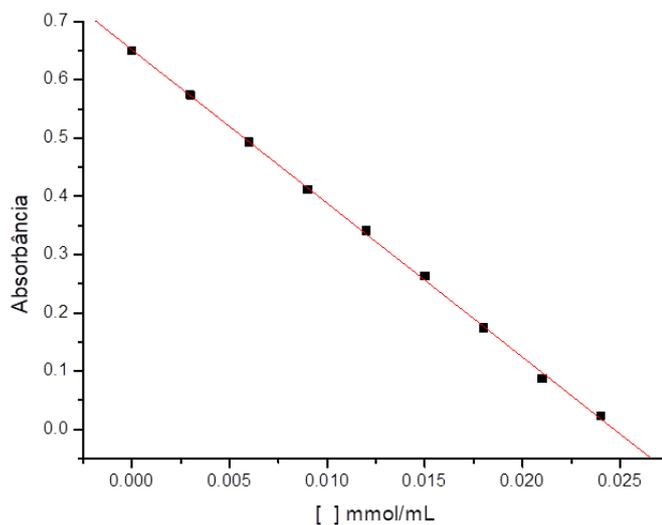


Figura 26 – Curva analítica da relação entre a concentração (X) *versus* a absorbância (Y), construída para a análise de ABTS a partir do padrão comercial de Trolox.

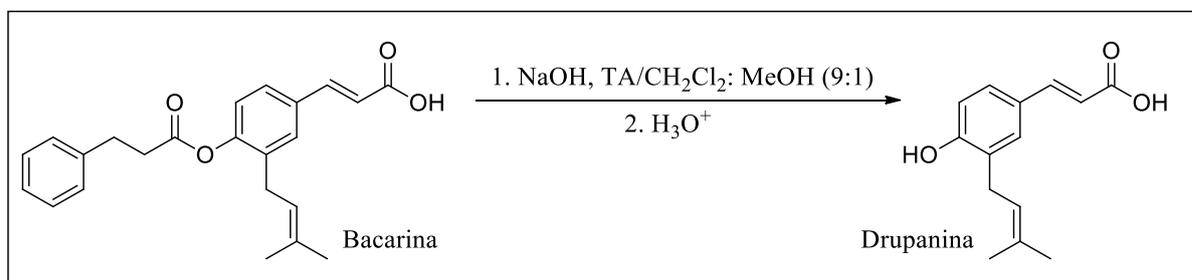
4.10. Isolamento e purificação dos princípios ativos da própolis verde

No isolamento dos princípios ativos da própolis verde, foi escolhido um extrato *n*-hexânico (EHP-5) para fracionamento prévio por cromatografia em coluna aberta. Foi utilizado gel de sílica 60 (230-400 Mesh) como fase estacionária e misturas binárias de clorofórmio e acetona como fase móvel, sempre em ordem crescente de polaridade. Para o fracionamento, uma coluna de vidro (60,0 cm x 3,0 cm) foi previamente empacotada com aproximadamente 70 g de gel de sílica misturados em 150 mL de *n*-hexano. A amostra foi aplicada na forma de pastilha, onde cerca de 300 mg do EHP-5, solubilizados em clorofórmio, foram misturados com uma quantidade mínima de gel de sílica que, após a evaporação completa do solvente, foi aplicada no topo da coluna. A coluna foi então eluída com 200 mL de cada uma das misturas na seguinte ordem: 100% clorofórmio, clorofórmio: acetona 1% (v/v), clorofórmio: acetona 3% (v/v), clorofórmio: acetona 5% (v/v), clorofórmio: acetona 7% (v/v), clorofórmio: acetona 10% (v/v), clorofórmio: acetona 15% (v/v) e clorofórmio: acetona 20% (v/v). Foram recolhidas 108 frações no volume entre 10-15 mL, e as frações foram reunidas de acordo com a semelhança observada por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA em gel de sílica e utilizando clorofórmio: acetona 40% (v/v) como eluente). O solvente foi evaporado e as frações foram pesadas e analisadas por CLAE-DAD.

A sub-fração principal (90 mg) foi purificada através de CLAE-VU semipreparativa. Para as análises por CLAE-UV no modo semipreparativo foi utilizado equipamento da Shimadzu (LC-10AD) com injetor manual Rheodyne (500 µL). Após otimização, o sistema de separação escolhido para transposição foi: coluna C18 Luna (250 mm x 10 mm d.i., 5µm, Phenomenex) e fase móvel mistura binária de metanol e água ultrapura com gradiente linear de concentração (75 – 100%). O fluxo foi de 4 mL.min⁻¹, volume de injeção de 500 µL, detecção a 315 nm e o controle e a aquisição dos dados foram feitos através do *software* LCSolution (Shimadzu). As amostras e solventes foram previamente filtrados a vácuo com membrana 0,45 mm Nylon.

Desta sub-fração, foi possível isolar três componentes: 25 mg do biomarcador Artepillin C (sólido branco, 98% de pureza cromatográfica), 14 mg de bacarina (sólido branco, 98% de pureza por CLAE) e 6 mg do ácido 2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico (sólido branco, 98% de pureza cromatográfica). Estas substâncias isoladas foram utilizadas como padrões para quantificação nos extratos (EEP e EHP) por CLAE-DAD, e também para os ensaios biológicos. As substâncias foram caracterizadas por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C).

A Drupamina, que também foi usada como padrão, foi obtida por hidrólise alcalina em meio não-aquoso a partir da Bacarina. As condições reacionais estão apresentadas no **Esquema 4** (THEODOROU et al, 2018).



Esquema 4 – Hidrólise alcalina da bacarina em meio não aquoso

Em uma balão de 10mL, uma solução do éster (14 mg, 0,038 mmol) preparada em CH₂Cl₂ (0,5 mL) foi adicionada uma solução metanólica de NaOH 3N (0,3 mL), com a concentração final do álcali sendo de 0,3 N, e a mistura de solvente CH₂Cl₂ / CH₃OH (9: 1, v/v, 2 mL). A mistura reacional foi deixada agitando a temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada fina analítica (CCDA). A mistura foi agitada até o éster ser consumido (~1h). Após esse tempo os solventes foram então removidos sob vácuo. O resíduo foi diluído com água (5 mL) e extraído com acetato de etila (2x10 mL) para isolar o álcool insolúvel em água. A fase aquosa foi resfriada, acidificada a pH~ 2 com HCl concentrado e extraída com AcOEt (2 x 10 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas (Na₂SO₄) e o solvente foi removido para fornecer o ácido. A drupamina foi isolada com o sólido amarelo claro de peso 7,1 mg (rendimento de 80% bruto) e caracterizada devidamente por RMN de ¹H e ¹³C. Essa substância foi utilizada como padrão para identificação e quantificação nos extratos por CLAE-DAD .

4.11. Perfil cromatográfico dos extratos de própolis verde por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico dos extratos de própolis (EEP e EHP) foi realizado por CLAE em um equipamento Prominence (Shimadzu), constituído por duas bombas série LC-20AT, com detector de fotodiodos SPD-M20A e autojeter SIL-10A. O controle e a aquisição dos dados foram feitos através do *software* LCsolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. x 5 µm, Betasil-Thermo), mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 1% de ácido acético glacial (solvente A)

e metanol (solvente B), com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi de 20 µL. O gradiente iniciou-se com 35% de solvente B por 2 min, 35 a 80% de B em 20 min, 80 a 92% de B em 25 min, após 3 min retornando a 35% de B, mantido por 2 min.

Os extratos de própolis foram solubilizados em metanol grau espectroscópico na concentração de 2 mg.mL⁻¹, e a solução foi filtrada através de um filtro (13 mm x 0,45 µm, PVDF, Analítica). A identificação das substâncias foi baseada na comparação dos tempos de retenção e suas curvas no UV com os padrões isolados (Artepillin C, Bacarina e Cromano) do extrato *n*-hexânico de própolis verde (EHP-5), 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 315 nm, visto que a maioria dos derivados prenilados identificados na própolis verde absorve nessas regiões. Para o padrão Artepillin C foi preparada uma curva analítica na faixa de 50 – 300 µg.mL⁻¹ ($Y = -38495,91 + 14630X$, onde coeficiente de correlação foi **R = 0,9998**), enquanto a Bacarina foi na faixa de 25 – 300 µg.mL⁻¹ ($Y = -3387,28 + 4951,63X$, onde coeficiente de correlação foi **R = 0,9997**), Cromeno na faixa de 10 – 50 µg.mL⁻¹ ($Y = -21050,20 + 9863,25X$, onde coeficiente de correlação foi **R = 0,9999**) e a Drupanina na faixa de 10 – 50 µg.mL⁻¹ ($Y = -100674,70 + 39520,20X$, onde coeficiente de correlação foi **R = 0,9997**).

4.12. Ensaio de atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*

O ensaio da atividade antiparasitária foi realizado no laboratório da professora Débora Decoté Ricardo Lima (Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária no IV-UFRRJ). O ensaio de atividade inibitória do crescimento das formas infectivas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) foi conduzido em uma placa de 96 poços de material acrílico transparente. Foram semeadas, em cada poço cerca de $1,0 \times 10^4$ células LLC-MK2 (ATTC) em 100 µL de suspensão em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sem vermelho de fenol (DMEM-SVF) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Após a adesão das células (36°C, 5% CO₂, 4 h), foram semeadas, por poço, cerca de $1,0 \times 10^5$ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) em 20 µL de suspensão em meio DMEM-SVF + 5% SFB. Após o período de infecção (36°C, 5% CO₂, *overnight*) os poços foram lavados com solução tampão fosfato (PBS, 2 × 150 µL) e foram adicionados 120 µL de DMEM-SVF + 5% SFB. Em seguida, realizou-se o tratamento com as substâncias isoladas (solubilizadas em DMSO) em triplicata em diluição seriada com 7 concentrações de 100 – 0,41 µM (fator de diluição de 2,5). Controles negativo (sem tratamento - Vivo), do veículo

(DMSO a 0,3 %), positivo (benzonidazol a 10 μM) e branco (LLC-MK2 sem parasitos) foram mantidos a fim de comparação. O experimento permaneceu sob incubação por 120 h em estufa de cultura de células (36°C, 5% CO_2), quando então foram adicionados 30 μL de solução 0,3 mg/mL do reagente vermelho de clorofenol β -galacto-piranosídeo (CPRG, Sigma-Aldrich) contendo 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de detergente Igepal (Sigma-Aldrich). Após 3 h de incubação (36°C, 5% CO_2), foram medidas as absorvâncias dos poços em leitor de placas ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Os valores de absorvância foram convertidos em percentuais de viabilidade celular relativos aos controles veículo e negativo conforme a equação:

$$\%Viab = \frac{x - \bar{C}_P}{\bar{C}_V - \bar{C}_P} \times 100$$

Onde, **%Viab** = percentual relativo de viabilidade celular

x = medida de absorvância da situação tratada

\bar{C}_P = média das medidas de absorvâncias do controle positivo

\bar{C}_V = média das medidas de absorvâncias do controle veículo

Os gráficos que ilustram os experimentos de viabilidade celular foram obtidos a partir do *software* GraphPad Prism 7.00.

4.13. Ensaio de atividade citotóxica sobre células LLC-MK2

A uma placa de 96 poços de material acrílico transparente foram semeadas, em cada poço, $1,0 \times 10^4$ células LLC-MK2 (ATTC) – células epiteliais de rins de macaco-rhesus – em 100 μL de suspensão em meio DMEM sem vermelho de fenol (DMEM-SVF) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Após a adesão das células (36°C, 5% CO_2 , overnight), os poços foram lavados com solução tampão fosfato (PBS, $2 \times 150 \mu\text{L}$) e foram adicionados 120 μL de DMEM-SVF + 5% SFB. Em seguida, realizou-se o tratamento com os compostos em triplicata em diluição seriada em 7 concentrações de 100 – 0,41 μM (fator de diluição de 2,5). Controles negativo (sem tratamento - Vivo), do veículo (DMSO a 0,3 %), positivo (Triton 0,1%) e branco (DMEM-SVF + 5% SFB sem células) foram mantidos a fim de comparação. O experimento permaneceu sob incubação por 120 h em estufa de cultura de células (36°C, 5% CO_2), quando então foram adicionados 20 μL de solução 1,25 mg/mL do sal de MTT (Sigma-Aldrich) contendo 0,11 mg/mL de metassulfato de fenazina (PMS, Sigma-Aldrich). Após 1 h de incubação (36°C, 5% CO_2), o meio de cultura foi removido e os cristais de

formazana de MTT solubilizados em DMSO (150 μ L / poço). As medidas as absorbâncias dos poços foram obtidas em leitor de placas ($\lambda = 570$ nm). Os valores de absorbância foram convertidos em percentuais de viabilidade celular relativos aos controles veículo e negativo conforme a equação:

$$\%Viab = \frac{x - \bar{C}_P}{\bar{C}_V - \bar{C}_P} \times 100$$

Onde, **%Viab** = percentual relativo de viabilidade celular

x = medida de absorbância da situação tratada

\bar{C}_P = média das medidas de absorbâncias do controle positivo

\bar{C}_V = média das medidas de absorbâncias do controle veículo

Os gráficos que ilustram os experimentos de viabilidade celular foram obtidos a partir do *software* GraphPad Prism 7.00.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração das amostras de própolis

A busca por um método de extração eficiente é muito importante quando se trata de investigar as propriedades biológicas dos princípios ativos presentes em matrizes vegetais ou animais, pois muitos parâmetros podem contribuir para que o teor dessas substâncias diminua ao longo do processo. Diferentes métodos de extração estão descritos na literatura para a própolis, não havendo uma padronização. Ao escolher um método extrativo, é preciso avaliar a eficiência do método e estabilidade dos componentes na matriz bruta, entre outros fatores como custo do processo e a finalidade do extrato.

Neste trabalho, três amostras de própolis verde produzidas em diferentes cidades do Rio de Janeiro foram submetidas à extração contínua, durante 6 h, utilizando aparelho de Soxhlet. O uso de dois solventes com polaridades distintas (*n*-hexano e álcool etílico) teve por finalidade avaliar a eficiência para extrair as substâncias preniladas da própolis verde, principalmente o Artepillin C, Bacharina e Cromano. A temperatura do processo foi mantida próxima à ebulição do solvente (~ 68 °C para o hexano e 78°C para o etanol).

Para a produção dos extratos, a própolis bruta foi resfriada de modo a ser moída em um pó fino. Esse processo de resfriamento se fez necessário porque a própolis apresenta uma característica resinosa, não permitindo a sua trituração. Os rendimentos das extrações com *n*-hexano (EHP) e etanol (EEP) em extrator Soxhlet, por 6 horas, para as três amostras de própolis verde encontram-se na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Rendimentos brutos dos extratos *n*-hexânicos e etanólicos de própolis verde, obtidos por Soxhlet (6 horas).

Amostra	EHP (g)	Rendimento (%)	EEP (g)	Rendimento (%)
P-2 (Mesquita)	0,608 ±1,38	20,29	1,832 ±1,53	61,09
P-5 (Carmo)	0,224 ±0,95	7,50	1,146 ±1.16	38,22
P-12 (Paracambi)	0,674 ±1,22	22,47	1,859 ±1.87	61,98

Ao analisar a eficiência do solvente extrator, o etanol apresentou rendimento médio superior quando comparado com a extração com solvente apolar, *n*-hexano. Como pode ser observado na **Tabela 10**, o rendimento dos extratos de própolis verde variou de 0,224 g (**EHP-5**) a 0,674 g (**EHP-12**) com hexano, e de 1,146 g (**EEP-5**) a 1,859 g (**EEP-12**) com

etanol. As amostras de própolis **P-2** e **P-12** apresentaram os maiores rendimentos, tanto para o extrato etanólico quanto para o extrato *n*-hexânico, enquanto a amostra **P-5** apresentou, para ambos os solventes extratores, os rendimentos mais baixos. O baixo rendimento registrado para a amostra **P-5** (Carmo-RJ) pode indicar alguma escassez de espécies vegetais apropriadas à produção de própolis, nesta região do Estado.

Os métodos utilizando o etanol como solvente – ou ainda misturas hidroalcoólicas de diferentes concentrações – são muito tradicionais e amplamente utilizados até hoje porque a própolis apresenta baixa solubilidade em água pura: a maior parte das substâncias da própolis é de caráter lipofílico, dificultando a interação da matriz com o solvente e prejudicando a solubilização dos componentes bioativos. De acordo com Fontana e colaboradores (2004), misturas hidroalcoólicas entre 70 e 80% são as mais apropriadas para preparações farmacêuticas, enquanto a instrução normativa que apresenta os parâmetros de qualidade da própolis estabelece que o extrato alcoólico de própolis deve ter no máximo 70° GL (BRASIL, 2001). O etanol é o solvente mais utilizado no preparo de extratos de matrizes vegetais como a própolis, e apesar do metanol também apresentar excelentes resultados quanto à extração de substâncias polifenólicas (componentes bioativos da própolis), sua utilização para a produção de tinturas se torna inviável por conta de sua elevada toxicidade (JUG et al., 2014).

Paviani e colaboradores (2011) avaliaram a eficiência de diferentes métodos de extração da própolis verde produzida em Minas Gerais por maceração dinâmica (3 g de própolis, 10 mL de etanol ou metanol, sem aquecimento) e extração em Soxhlet (5 g de própolis, 150 mL de *n*-hexano, acetato de etila, etanol ou água destilada, 60° C). O extrato etanólico obtido por maceração dinâmica a frio apresentou rendimento bruto mais elevado (36,78% em massa), sendo inferior ao rendimento dos extratos etanólicos apresentados neste trabalho, com aquecimento por 6 h. Entretanto, o extrato hexânico (Soxhlet, 6h) apresentou rendimento bruto (10,52% em massa) inferior ao obtido neste trabalho para os extratos **EHP-2** e **EHP-12**, sendo superior apenas para o extrato **EHP-5**. Já os extratos preparados com acetato de etila e etanol em Soxhlet por Paviani e colaboradores (2011), apresentaram, respectivamente, os rendimentos de 45,90 e 49,30% em massa, também superiores apenas ao extrato **EHP-5**.

Fávaro e colaboradores (2015) avaliaram o teor de sólidos solúveis em álcool de cereais para amostras de própolis marrom produzida em diferentes cidades no Estado do Paraná, através de extração em aparelho Soxhlet durante 24 h e temperatura controlada a 70 °C. Os extratos obtidos por esta metodologia apresentaram rendimento que variou de 50,92 a 65,40%

em massa, semelhantes ao que foi obtido neste trabalho para os extratos própolis **EEP-2** e **EEP-12**, porém superior ao rendimento do extrato **EEP-5**.

Cottica e colaboradores (2011) compararam a eficiência na extração por maceração dinâmica da própolis produzida no Paraná sob diferentes condições: variações na concentração da solução hidroalcoólica (entre 60 e 96% v/v) e variações na proporção da própolis extraída (entre 5 e 30% m/m). O estudo verificou que a maceração foi mais eficiente em concentrações mais elevadas de álcool etílico (para a solução hidroalcoólica), combinado com uma proporção mais elevada da própolis na metodologia de extração.

Casagrande e colaboradores (2018) estudaram os pontos de otimização (tempo e temperatura) para extrair a matriz vegetal de *B. dracunculifolia* e seus princípios ativos em diferentes solventes e observaram que a extração se mostrou mais eficiente na temperatura de 80 °C com tempo total de 90 min. Os solventes mais eficientes nestas condições foram água pura, e soluções de etanol: água e acetona: água, ambas a 40%. A temperatura foi a variável que mais influenciou no processo de extração, e o etanol se mostrou o solvente extrator mais eficiente. Além disso, a adição de água em pequenas proporções aos solventes orgânicos resultou em diminuição do tempo de extração (CASAGRANDE et al., 2018).

A metodologia mais utilizada para se extrair os princípios ativos da própolis bruta tem sido a maceração dinâmica (extração é conduzida por agitação magnética) ou maceração estática (extração é conduzida em repouso com agitação ocasional), onde a própolis é mantida em um recipiente devidamente fechado, à temperatura ambiente, por um período de horas ou dias. Dos métodos de extração a quente, o aparelho Soxhlet é o mais utilizado. Em geral, a extração conduzida por Soxhlet não requer um período prolongado de tempo, além de ser preciso usar uma quantidade reduzida de solvente, uma vez que a metodologia consiste na recirculação do solvente que é mantido constantemente na sua temperatura de ebulição. Assim, de maneira contínua, o solvente em ebulição é frequentemente condensado em um cartucho de celulose contendo a matriz bruta, que, ao atingir um volume crítico, retorna para um balão saturado com as substâncias bioativas da matriz. É preciso que o solvente apresente certa volatilidade, e por conta do processo contínuo uma quantidade reduzida de solvente é utilizada, apresentando uma vantagem comparada ao método de extração estático, como a maceração.

Após o preparo dos extratos hexânicos e etanólicos, estes foram caracterizados através da reação de Folin-Ciocalteu (para a determinação do teor em substâncias fenólicas totais) e

quanto à sua capacidade antioxidante, avaliada mediante três testes ensaios *in vitro*: atividade de sequestração do radical (DPPH e ABTS), e de redução férrica (FRAP).

5.2. Análise espectrofotométrica na região do UV-Vis

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 bancadas 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 na **Figura 27**.

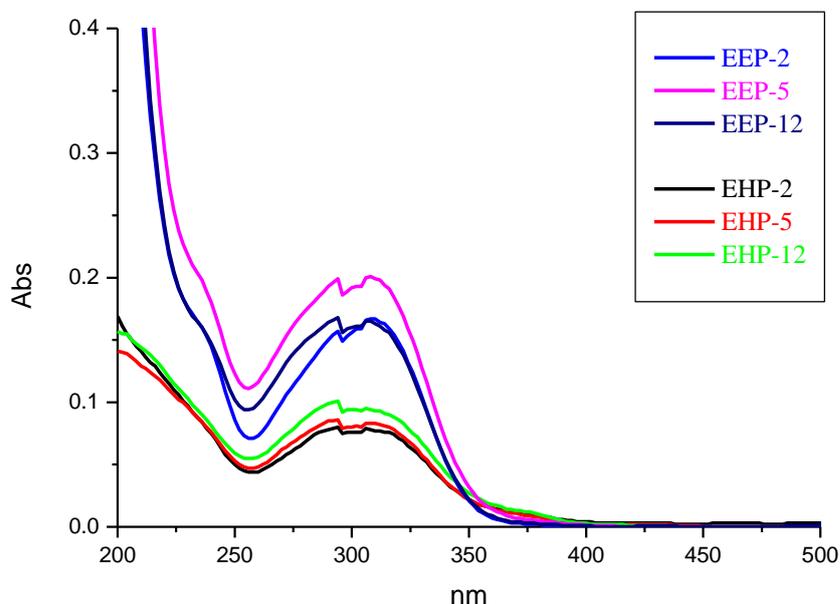


Figura 27 – Espectros de absorção na região do UV-Vis de extratos de própolis verde em *n*-hexano (EHP) e etanol (EEP).

Como pode ser observado na **Figura 27**, todos os espectros mostraram duas bandas características nas regiões de comprimentos de onda indicados, porém uma diferença visual na intensidade dos espectros das amostras feitas em hexano e etanol. Os extratos etanólicos (EEP) apresentaram maior intensidade de absorção que os extratos *n*-hexânicos (EHP), sendo um indicativo do baixo teor de substâncias fenólicas na composição química desses extratos. Isso pode ser explicado pela baixa polaridade do solvente *n*-hexano, com menor capacidade para extrair as substâncias fenólicas, com caráter mais polar, porém solubiliza, preferencialmente, as substâncias com substituintes metilados, metoxilados e prenilados.

Todos os espectros obtidos apresentam bandas características de substâncias fenólicas, com máximo de absorção na região que vai de 290 a 310 nm, comum na matriz de própolis verde. De acordo com a literatura, transições eletrônicas envolvendo um sistema benzênico e um grupo substituinte – hidroxilas, metoxilas e outros – são basicamente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, caracterizado por dois máximos de absorção: um na região entre 180 e 202 nm (banda primária, visível apenas na região do ultravioleta de vácuo), e outra denominada banda secundária, com absorção próximas a 255 nm (PAGANOTTI et al., 2014).

A própolis possui em sua composição química diferentes substâncias fenólicas (ácidos e flavonoides) que possuem como substituintes do anel benzênico grupos hidroxila, metoxila e ligações duplas conjugadas. A presença destes substituintes pode causar um deslocamento batocrômico para maiores comprimentos de onda das bandas no espectro de UV-Vis das amostras como pode ser observado na **Figura 27**, devido à presença de um comprimento de onda para quase todas as amostras próximo de 220 e 230 nm, o que pode ser explicado pelo deslocamento batocrômico para o comprimento de onda de 202 nm do benzeno (banda primária). Outro comprimento de onda observado para os extratos de todas as amostras ficou próximo de 310 nm, que pode corresponder ao deslocamento da banda de 255 nm para o benzeno (banda secundária).

Gregoris e Stevanato (2010) observaram que ao sobrepor os espectros de absorção obtidos de alguns princípios ativos presentes na própolis europeia (pinocembrina, crisina, galangina, ácido cafeico, cafeato de fenetila e cafeato de dimetilalila), o espectro resultante apresentou forte similaridade com aquele observado para diferentes amostras de própolis, com máximo de absorção em 290 nm.

Alencar e colaboradores (2005) verificaram que o espectro de absorção na região do UV-vis (entre 200 e 600 nm) obtido a partir da extração das folhas de *B. dracunculifolia* apresentou o mesmo máximo de absorção que os extratos de própolis verde produzido nos estados de São Paulo e Minas Gerais, com uma banda de absorção característica entre 290 e 310 nm, muito semelhante ao que foi observado neste trabalho.

Os espectros de absorção neste estudo apresentaram semelhanças com os dados apresentados por Cabral e colaboradores (2012) para o extrato de uma amostra de própolis verde produzida em Minas Gerais, cujo máximo de absorção foi de 306 nm, e diferente para a amostra de própolis produzida na Bahia (máximo em 280 nm). Cardoso e colaboradores (2015) observaram máximos de absorção em um intervalo entre 270 e 285 nm para a geoprópolis produzida por abelhas nativas no Estado do Paraná, atribuindo essa região a

presença de derivados do ácido benzóico, como ácido gálico. Abelhas nativas (ou abelhas sem ferrão) fazem parte de uma extensa família de abelhas com hábitos de coleta completamente distintos das abelhas melíferas, e a análise de espectroscopia do UV-vis pode ser usada como ferramenta para diferenciação de diferentes tipos de própolis (CARDOSO et al., 2015).

De maneira semelhante, Figueiredo e colaboradores (2015) avaliaram a variação sazonal da composição polifenólica de diferentes amostras de própolis verde obtidas no estado de Minas Gerais. A análise de espectroscopia na região do UV-vis (entre 200 e 600 nm) mostrou que as amostras obtidas nos meses de verão apresentam maior intensidade de absorção, com máximo entre 280 e 320 nm. A absorção nessa região para as amostras do verão foi cerca de 4 vezes mais intensa, quando comparado com a absorção das amostras de inverno, e 2 vezes mais intensa quando comparado com os meses de outono (FIGUEIREDO et al., 2015).

Paganotti e colaboradores (2014) combinaram análises quimiométrica, como a análise das componentes principais (PCA), com dados de espectroscopia na região do UV-vis para a própolis produzida nas regiões Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), e observaram o agrupamento das amostras de acordo com a região de produção, sendo as amostras obtidas no Sul agrupadas no quadrante superior e as amostras produzidas no Sudeste, agrupadas no quadrante inferior. O estudo relata que a análise supervisionada foi capaz de classificar os extratos etanólicos comerciais produzidas nas duas regiões, e a região do espectro responsável pela discriminação das amostras estava em torno de 210 nm. Essa região está associada com a absorção da banda primária para substâncias fenólicas, indicando que polifenóis com diferentes padrões de substituição são uma variável importante no reconhecimento e diferenciação da própolis produzida no país (PAGANOTTI et al., 2014).

5.3. Teor de fenólicos e flavonoides totais, capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de própolis verde

Na **Tabela 11** estão apresentados os resultados para o teor de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF), e a capacidade antioxidante avaliada pela captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e pela capacidade de redução do ferro (FRAP). Todos os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Salgueiro e Castro (2016).

Tabela 11 – Resultados para a avaliação de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS, FRAP e DPPH.

Extrato	TP ^a	TF ^b	ABTS ^c	FRAP ^d	DPPH ^e
EHP-2	1,90 ±0,037	1,45 ±0,004	40,53 ±0,003	101,32 ±0,012	84,94 ±1,5255
EHP-5	1,91 ±0,035	2,32 ±0,002	44,73 ±0,003	107,34 ±0,001	80,24 ±0,8168
EHP-12	1,73 ±0,037	1,55 ±0,001	47,17 ±0,002	126,91 ±0,041	74,48 ±1,0374
Média	1,90 ±0,101	1,55 ±0,476	44,73 ±3,358	107,34 ±13,379	84,94 ±3,025
EEP-2	8,90 ±0,013	12,73 ±0,001	184,42 ±0,017	598,12 ±0,003	22,46 ±0,4708
EEP-5	11,92 ±0,011	15,69 ±0,005	189,14 ±0,054	623,98 ±0,012	18,62 ±0,2951
EEP-12	12,84 ±0,006	16,82 ±0,005	200,76 ±0,008	727,15 ±0,001	16,49 ±0,7849
Média	11,92 ±2,061	15,69 ±2,112	189,14 ±8,410	623,98 ±68,266	18,62 ±3,0255

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS.+); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg EAG 100mg⁻¹ de extrato; b – mg EQE 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e CE₅₀ em µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

O teor de fenólicos totais (TP) variou de 1,73 (EHP-12) a 12,84 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato (EEP-11). Comparando as respectivas médias, é possível observar a influência da polaridade do solvente extrator, uma vez que o etanol (TP médio 11,92 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato) foi muito mais eficiente em extrair substâncias fenólicas, quando comparado ao *n*-hexano (TP médio 1,90 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato). Para o teor de flavonoides totais (TF), a variação ficou entre 1,45 (EHP-2) e 16,82 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato (EEP-12), mostrando um comportamento semelhante. De maneira geral, a amostra de própolis P-12 apresentou o teor mais elevado de substâncias fenólicas (TP e TF) quando extraída com etanol, e também o maior rendimento na extração (61,98%). O teor de substâncias fenólicas (fenólicos totais e flavonoides) mostrou estar também correlacionado com o perfil de absorção dos extratos na região do UV-vis (Figura 27), onde os extratos etanólicos apresentaram absorção de maior intensidade quando comparados com os extratos *n*-hexânicos, que apresentaram menores teores de fenólicos e flavonoides totais.

Lorenzon e colaboradores (2018) avaliaram o perfil de substâncias fenólicas em amostras de própolis produzidas em diferentes cidades do Rio de Janeiro, obtidas a partir de dois métodos de coleta diferentes: método “*by scraping*” e “*in strips*”. Em seu trabalho, os extratos etanólicos (maceração dinâmica, 48 horas) das amostras obtidas “*by scrapping*” apresentaram, em média, resultados inferiores para o teor de fenólicos totais (8,16 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato) e flavonoides totais (6,25 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato) quando comparados com os extratos de própolis verde avaliados neste trabalho. Entretanto, para as amostras obtidas “*in strips*” o teor de fenólicos totais foi, em média, de 22,84 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato, sendo superior ao que é reportado neste trabalho.

Cabral e colaboradores (2012) avaliaram que o teor de fenólicos (16,96 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato) e flavonoides totais (6,15 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato) para o extrato etanólico de própolis verde produzida em Minas Gerais foram superiores ao extrato etanólico de própolis marrom produzida na Bahia (respectivamente 1,48 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 0,32 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato). Os resultados de fenólicos e flavonoides totais obtidos para os extratos etanólicos da própolis verde do Rio de Janeiro deste trabalho também foram superiores ao que foi reportado para a própolis marrom, porém o teor de fenólicos totais se mostrou inferior ao que foi repostado para a própolis verde de Minas Gerais.

De acordo com a literatura, a própolis verde é a variação da própolis brasileira que apresenta o teor mais elevado de substâncias fenólicas (DE MELLO et al., 2014). A **Tabela 12** apresenta a variação no teor de fenólicos e flavonoides e flavonoides totais para a própolis produzida nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil. O potencial antioxidante da própolis verde é geralmente superior ao das amostras de própolis de outras regiões do Brasil devido ao seu conteúdo polifenólico diferenciado, principalmente pela presença de fenilpropanoides prenilados, como o biomarcador Artepillin C (SALATINO et al., 2011).

Tabela 12 - 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 (própolis verde)	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%

De acordo com Yeo e colaboradores (2015), a técnica de ultrassom pode ser aplicada como alternativa segura no preparo de extratos de própolis substituindo técnicas que demandam mais tempo, porém sem comprometer o perfil de substâncias fenólicas, e conseqüentemente, mantendo suas propriedades biológicas. Os resultados de fenólicos totais e flavonoides totais apresentados neste trabalho foram superiores aos valores reportados por Andrade e colaboradores (2017) para o extrato hidroalcoólico (banho de ultrassom, 35 °C e 60 min) de própolis verde (9,05 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 5,94 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato), própolis vermelha (9,13 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 3,14 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato) e própolis marrom (5,55 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 3,89 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato). Zhang e colaboradores (2017) avaliaram vinte e duas amostras de

própolis verde (*in natura*) obtidas comercialmente através do teor de fenólicos e flavonoides totais presentes no seu extrato etanólico (banho de ultrassom, 45 minutos). De acordo com o estudo, a variação no teor de fenólicos totais foi de 8,75 a 14,85 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato, semelhantes aos valores de TP apresentados neste trabalho. O teor de flavonoides totais ficou abaixo dos resultados obtidos neste trabalho, variando de 3,85 até 6,76 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato.

Monroy e colaboradores (2017) avaliaram o teor de fenólicos totais e flavonoides totais para o extrato etanólico de própolis verde obtido por extração em Soxhlet, sendo respectivamente 15,9 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 6,0 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato. O teor de fenólicos totais foi superior aos resultados apresentados neste trabalho, enquanto o teor de flavonoides totais foi inferior.

O teor de fenólicos e flavonoides totais apresentados neste trabalho são inferiores aos apresentados por Zhang e colaboradores (2016) para a própolis chinesa (19,28 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 29,72 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato, respectivamente). Já para a própolis produzida na Austrália, o teor de fenólicos totais foi superior (21,70 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato), enquanto o teor de flavonoides totais foi inferior (5,57 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato). Para a própolis verde (obtida comercialmente), os resultados de fenólicos e flavonoides foram respectivamente de 13,07 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato e 22,96 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato, superiores aos que estão reportados neste trabalho (ZHANG et al., 2016).

Em trabalho realizado por Coelho e colaboradores (2017), o teor de fenólicos totais obtido para a própolis verde produzida em Minas Gerais foi em média de 20,0 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato, sendo esse resultado superior ao que foi obtido neste trabalho para a própolis verde do Rio de Janeiro. Entretanto, os resultados deste trabalho são superiores ao que foi reportado para a própolis marrom produzida no Paraná (8,0 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato) e no Rio Grande do Sul (3,0 mg E_{AG} por 100 mg⁻¹ de extrato). Com relação ao teor de flavonoides totais, os valores apresentados neste trabalho se mostraram, em média, superiores aos que foram apresentados para a própolis verde (1,7 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato) e marrom (0,9 e 0,3 mg E_Q por 100 mg⁻¹ de extrato, para as amostras do PR e RS respectivamente).

Estudos têm mostrado que o teor de substâncias fenólicas, determinadas por métodos espectrofotométricos, pode ser correlacionado com a capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante dos extratos etanólicos e *n*-hexânicos de própolis verde foi realizada através de

ensaios *in vitro* envolvendo a captura de radicais livres (DPPH e ABTS). A atividade antioxidante dos extractos brutos foi ainda determinada através da reação de avaliação da capacidade antioxidante de redução férrica que mede a capacidade de doação de elétrons por parte das espécies antioxidantes. De acordo com a literatura, diferentes metodologias são necessárias para avaliar os diferentes aspectos da reatividade de uma substância polifenólica (LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013).

Os extratos etanólicos estudados neste trabalho apresentaram os melhores potenciais antioxidantes, e isso pode ser explicado pelo elevado teor de substâncias fenólicas. Entre as amostras estudadas, o extrato **EHP-2** apresentou o menor potencial antioxidante nos ensaios de captura de radicais livres DPPH ($CE_{50} = 84,94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ABTS (40,53 mmol E_{TROLOX} por 100 mg de extrato) e também no ensaio de redução do ferro – FRAP (101,32 mmol $E_{\text{Fe(II)}}$ por 100 mg de extrato). Já a amostra **EHP-12** apresentou o melhor potencial antioxidante para todos os ensaios realizados: DPPH ($CE_{50} = 16,49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ABTS (727,15 mmol E_{TROLOX} por 100 mg de extrato) e também no ensaio FRAP (200,76 mmol $E_{\text{Fe(II)}}$ por 100 mg de extrato).

Segundo Pazin e colaboradores (2016) existe uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de substâncias fenólicas da própolis, principalmente com relação aos flavonoides (ALENCAR et al., 2007), fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico (KOCOT et al., 2018) e componentes específicos como o Artepillin C (MATSUDA e ALMEIDA-MURADIAN, 2008; VEIGA et al., 2017).

Bittencourt e colaboradores (2015) investigaram as possíveis correlações entre o potencial antioxidante (avaliado pela captura de radicais DPPH) e o teor de fenólicos totais (TP) para extratos etanólicos de própolis verde e marrom brasileiras. A média dos CE_{50} para os extratos de própolis verde foi de $28,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto para o teor de fenólicos totais foi de $18,55 \text{ mg } E_{\text{AG}} \text{ por } 100 \text{ mg}^{-1}$ de extrato. Para a própolis marrom, o CE_{50} foi de $60,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto o teor de fenólicos totais foi de $4,82 \text{ mg } E_{\text{AG}} \text{ por } 100 \text{ mg}^{-1}$ de extrato. Assim, devido ao teor mais elevado de substâncias fenólicas, a própolis verde apresentou capacidade antioxidante superior a da própolis marrom.

Os extratos de própolis verde estudados neste trabalho apresentaram capacidade antioxidante – frente ao radical DPPH – mais elevada que os extratos reportados por Zhang e colaboradores (2016) para o extrato etanólico de própolis verde ($CE_{50} 43,85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), própolis produzida na China ($CE_{50} 32,35,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e própolis de eucalipto produzida na Austrália ($CE_{50} 19,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A capacidade antioxidante observada foi proporcional ao teor

de substâncias fenólicas das respectivas amostras, semelhante ao que foi observado neste trabalho para os extratos *n*-hexânicos e etanólicos de própolis verde.

Em trabalho realizado por Veiga e colaboradores (2017), a própolis verde produzida em Minas Gerais foi extraída por duas técnicas diferentes: maceração estática (2 semanas) em álcool etílico (96%) para gerar o EEP e extração por Soxhlet utilizando *n*-hexano (tempo não especificado) para gerar o EHP. O teor de fenólicos e flavonoides totais obtidos para o extrato etanólico se mostrou superior aos resultados obtidos para o extrato *n*-hexânico, semelhante ao que foi observado neste trabalho, e a capacidade antioxidante do extrato *n*-hexânico de própolis verde foi inferior ($95,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ao que foi reportado para os EHP deste trabalho. Já o CE_{50} para o extrato etanólico de própolis obtido por maceração foi de $13,09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, possuindo capacidade antioxidante mais elevada que os extratos etanólicos estudados neste trabalho.

Os teores de fenólicos e flavonoides totais reportados para o extrato etanólico de própolis verde por Pazin e colaboradores (2017) foram inferiores aos resultados apresentados neste trabalho ($4,85 \text{ mg E}_{\text{AG}}$ por 100 mg^{-1} de extrato e $4,75 \text{ mg E}_{\text{Q}}$ por 100 mg^{-1} de extrato, respectivamente); o CE_{50} (captura de radicais DPPH) foi de $32,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que caracteriza uma menor capacidade antioxidante quando comparada aos extratos etanólicos deste trabalho. O fracionamento do extrato hidroalcoólico com diferentes solventes (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e água) mostrou que as frações mais polares apresentavam melhor capacidade antioxidante (PAZIN et al., 2017). Assim, a fração *n*-hexano ($2,95 \text{ mg E}_{\text{AG}}$ por 100 mg^{-1} de extrato e $0,67 \text{ mg E}_{\text{Q}}$ por 100 mg^{-1} de extrato) apresentou menor capacidade antioxidante, enquanto a fração aquosa ($7,25 \text{ mg E}_{\text{AG}}$ por 100 mg^{-1} de extrato e $1,50 \text{ mg E}_{\text{Q}}$ por 100 mg^{-1} de extrato) mostrou a maior capacidade antioxidante.

Cottica e colaboradores (2011) compararam diferentes condições de maceração para a própolis marrom (Maringá – PR) utilizando soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações de álcool etílico, e constataram que o extrato com melhor capacidade antioxidante apresentou CE_{50} de $47,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente ao radical DPPH, e $136,5 \text{ mmol E}_{\text{Fe(II)}}$ por 100 mg^{-1} de extrato no ensaio de redução do íon férrico (FRAP). Os resultados mostrados são superiores aos obtidos neste trabalho para os extratos *n*-hexânicos, porém inferiores aos extratos etanólicos em ambos os ensaios.

Ferreira e colaboradores (2017) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato etanólico obtido a partir de duas amostras de própolis produzidas no Nordeste brasileiro pela captura de radicais DPPH, e o CE_{50} obtido foi de $56,2$ e $72,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os extratos etanólicos

estudados neste trabalho apresentam maior capacidade antioxidante, porém os valores reportados semelhantes aos resultados obtidos para os extratos *n*-hexânicos.

A capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis está dentro da faixa reportada por Belfar e colaboradores (2011) para o extrato metanólico de própolis verde, onde o CE₅₀ (medido pelo radical DPPH) variou entre 7,0 e 66,0 µg.mL⁻¹, mas os extratos *n*-hexânicos apresentaram capacidade antioxidante inferior.

5.4. Isolamento e caracterização das substâncias preniladas do EHP

Por conta da elevada complexidade química, diferentes estratégias são descritas na literatura para a obtenção dos princípios ativos da própolis brasileira. Essas estratégias são planejadas de acordo com o perfil químico do extrato bruto e do componente de interesse para o isolamento. Em estudos de triagem fitoquímica, é comum que se fracione o extrato hidroalcoólico bruto, através de extração líquido-líquido com solventes em gradiente crescente de polaridade (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol) e que as frações obtidas sejam processadas por diferentes técnicas cromatográficas (AGA et al., 1994; BANSKOTA et al., 1998; NEGRI et al., 2003; FREITAS et al., 2008; CAMPOS et al., 2011; OLDONI et al., 2011).

Os principais componentes bioativos presentes na própolis verde são derivados prenilados do ácido cinâmico, e podem ser identificados em extratos apolares da própolis verde e também de alecrim-do-campo (NETO et al., 2011; VEIGA et al., 2017). Isso porque, apesar do grupo ácido carboxílico, a presença de grupos prenila contribui para diminuição da polaridade dessas substâncias. Outro aspecto a ser considerado, ao se utilizar solventes mais polares na extração (metanol, etanol, acetato de etila), é que outras substâncias de maior polaridade deverão ser também extraídas dificultando assim, o isolamento das substâncias de interesse. Assim, o uso de solventes como *n*-hexano, parece ser bem atrativo para o preparo de um extrato mais limpo, por se mostrar mais seletivo aos metabólitos prenilados.

Antes de partir para o fracionamento das substâncias dos extratos de própolis na tentativa de isolar as substâncias preniladas de interesse, avaliou-se qualitativamente os diferentes extratos por CLAE-DAD em fase reversa (condições experimentais item 4.11, pag. 55). A partir da análise comparativa do perfil cromatográfico foi possível observar que os extratos *n*-hexânicos são potencialmente mais viáveis para o isolamento dos princípios ativos prenilados da própolis verde, pois apresentam baixíssima quantidade de substâncias polares (faixa de tR 2,5 a 15 min) quando comparados aos extratos etanólicos (**Figura 28**). A partir

dessa observação, o extrato EHP-2 foi escolhido para o fracionamento das substâncias de interesse através do uso de cromatografia em coluna *flash* (ver item 4.10).

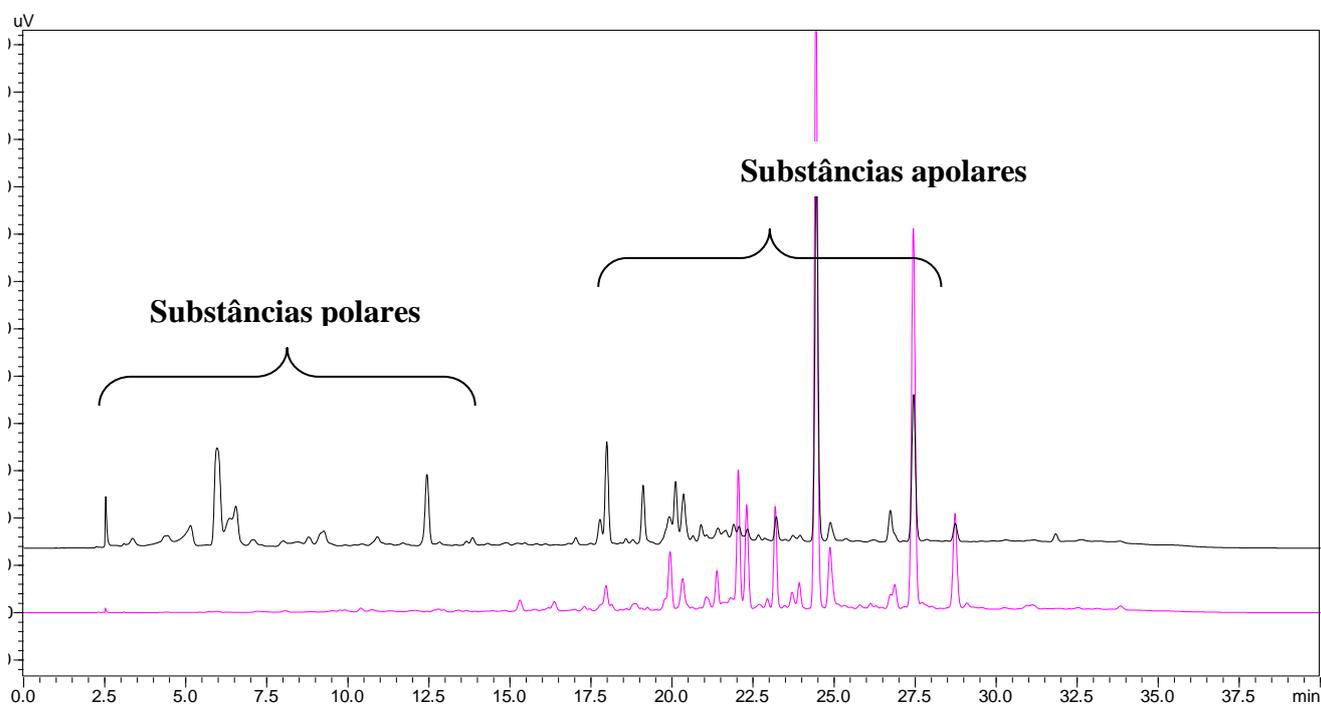


Figura 28 – Sobreposição dos cromatogramas **EEP-2** (preto) e **EHP-2** (rosa) obtidos por CLAE-DAD em fase reversa.

A fração contendo as substâncias de interesse, obtida através do fracionamento cromatográfico do EHP-2, foi analisada por CLAE-DAD. Apesar deste método cromatográfico indicar as substâncias preniladas de interesse da própolis como majoritárias, a análise desta mistura por CLAE revelou nesta fração a presença de outras substâncias além dos derivados não prenilados majoritários. A purificação dos componentes foi conduzida a partir de 90 mg da fração retirada da coluna *flash* que foi solubilizada em 5 mL de metanol espectroscópico em injetado em um *loop* de 500 μ L no injetor Rheodyne do equipamento (10 injeções de 500 μ L).

As substâncias correspondentes aos picos de menores intensidades no cromatograma (**Figura 29**) foram coletadas, mas como o objetivo do trabalho era a separação do Artepillin C, Bacarina e Cromeno, estes componentes não foram analisados.

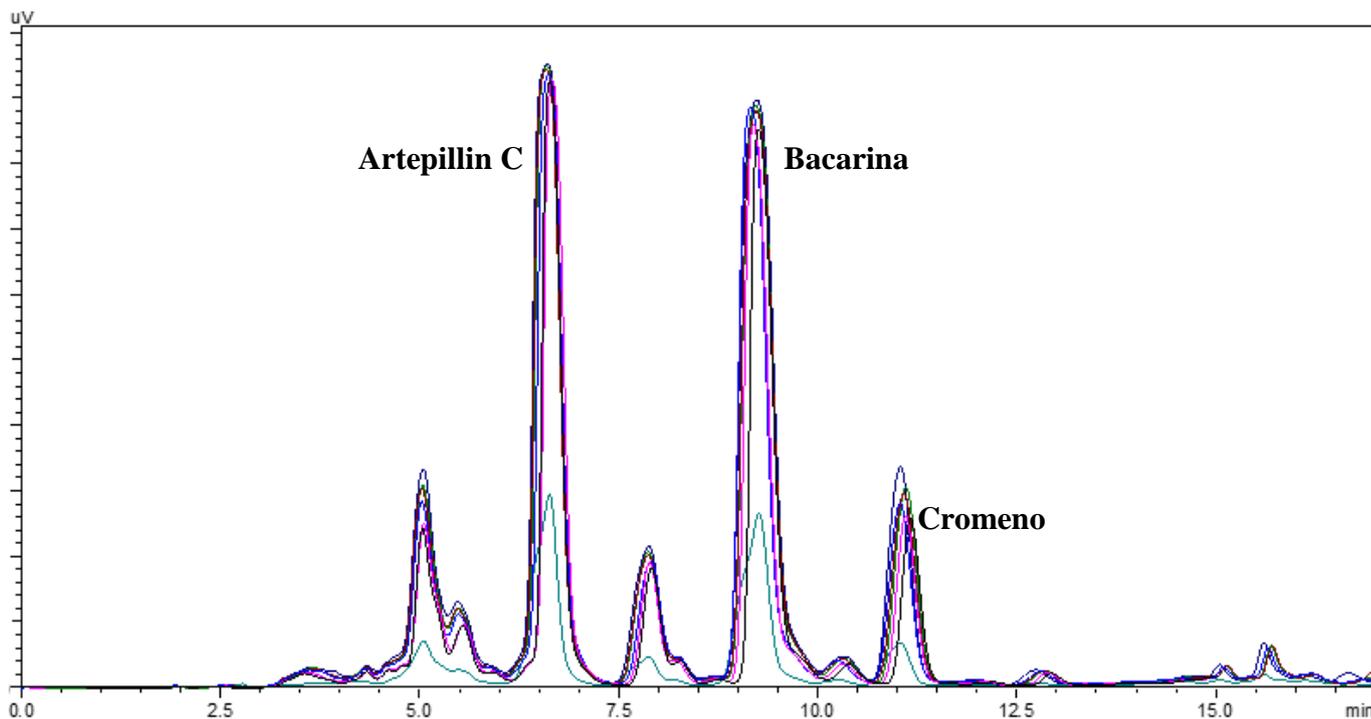


Figura 29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV semipreparativa em fase reversa para a purificação da fração do **EHP-2**.

O cromatograma obtido através do procedimento semipreparativo (**Figura 29**) mostrou o Artepillin C eluindo com t_R de 6,0 min, a Bacarina com t_R de 9,0 min e o Cromeno com t_R de 11,0 min. Foram obtidos 25 mg (27%) de Artepillin C, 14 mg de Bacarina (15%) e 5 mg de Cromeno (5%) a partir de 90 mg da fração proveniente do fracionamento em coluna de sílica do extrato **EHP-2**. Após 10 repetições da injeção no modo semi-preparativo, as frações obtidas foram reunidas e analisadas por CLAE-DAD (**Figura 30**). A identificação e a análise de pureza das substâncias preniladas foi realizada por RMN e CLAE. O ponto de fusão do Artepillin C foi 94-96 °C (PF = 95 °C, lit.), a Bacarina 98-100 °C (PF = 99 °C, lit.) e do Cromeno 190-192 °C (PF = 190-192, lit) (AGA et al., 1994; BANSKOTA et al., 1998; UTO et al., 2002).

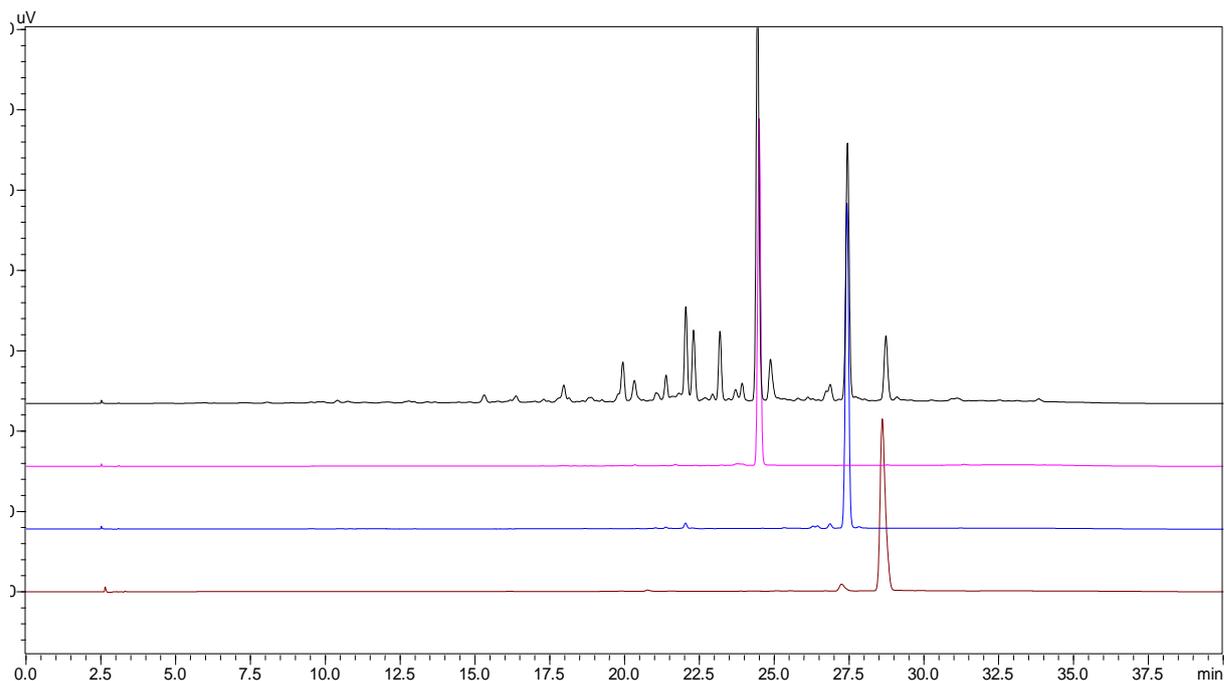


Figura 30 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em fase reversa do extrato e das substâncias isoladas: **EHP-2** (preto), Artepillin C (rosa), Bacarina (azul) e Cromeno (marrom).

Comparado com outras metodologias de isolamento na literatura, a metodologia utilizada neste trabalho se mostrou vantajosa em termos de rendimento para as três substâncias isoladas (**Tabela 13**). O desenvolvimento de um método para a obtenção destes componentes da própolis verde se mostra de grande importância para a química de produtos naturais e a química medicinal por conta dos estudos envolvendo suas propriedades biológicas. Além disso, existem poucas referências na literatura que apresentam rotas sintéticas eficientes para a obtenção desses componentes, principalmente para o Artepillin C.

Tabela 13 – Rendimento do Artepillin C obtido do extrato de própolis.

Solvente extrator	Rendimento (%)	Referências
<i>n</i>-hexano	8.41	Neste estudo
Acetato de Etila	0,79	Aga et al. 1994
Metanol	1,07	Marcucci et al. 2001
Etanol	0.35	Hattori et al. 2011

As três substâncias isoladas e a Drupamina, que foi obtida a partir da hidrólise básica da Bacarina (THEODOROU et al, 2018), foram submetidas à avaliação da capacidade

antioxidante pelo método de captura de radicais livres (DPPH), e desta forma determinada a CE_{50} para cada uma delas a partir de uma solução padrão de 1 mg.mL^{-1} .

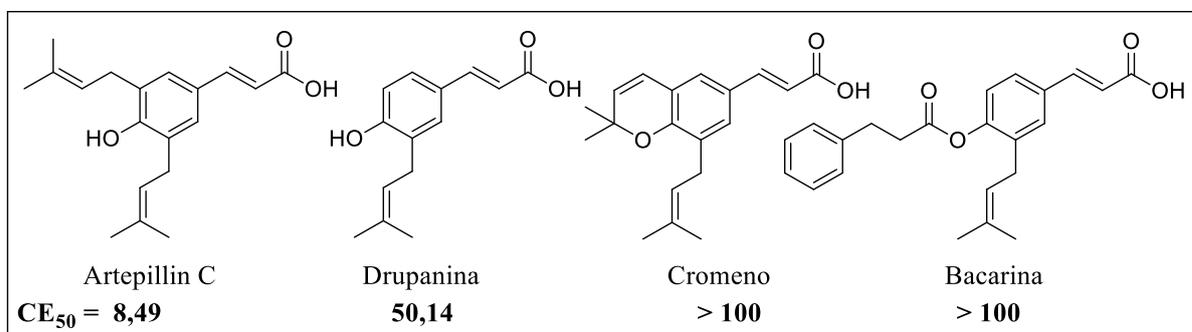


Figura 31 – Estruturas dos derivados prenilados avaliados neste trabalho. CE_{50} em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O Artepillin C foi o derivado prenilado que apresentou melhor capacidade antioxidante ($CE_{50} = 8,49 \pm 0,041 \mu\text{g.mL}^{-1}$), valor compatível com o que é observado na literatura (SALGUEIRO e CASTRO, 2016), enquanto a Drupanina apresentou capacidade antioxidante moderada ($CE_{50} = 50,14 \pm 0,041 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os grupos prenila, que estão substituídos na posição *orto* à hidroxila, funcionam como estabilizadores de radicais por efeito estereoeletrônico impedindo que o radical formado seja capturado, e a falta de um desses grupos na molécula da Drupanina pode explicar a menor capacidade antioxidante dessa substância. Por outro lado, os derivados Bacarina e Cromeno não apresentaram capacidade antioxidante significativa ($CE_{50} > 100$), e isso pode ser explicado em parte pela ausência da hidroxila fenólica nessas estruturas, uma vez que foi substituída por uma função éster (na Bacarina) e éter (no Cromeno). É sabido que a presença de hidroxilas fenólicas contribui positivamente para a capacidade antioxidante, como é observado para os ácidos clorogênico ($CE_{50} = 5,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cafeico ($CE_{50} = 9,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ferúlico ($CE_{50} = 24,71 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e para o flavonoide canferol ($CE_{50} = 6,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e isso pode justificar o fato de que extratos etanólicos, por serem mais polares, possuam uma melhor capacidade de captura de radicais livres (SALGUEIRO e CASTRO, 2016) do que os extratos hexânicos.

5.4.1. Caracterização do Artepillin C

Na **Tabela 14** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos para os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o Artepillin C, em comparação com os dados relatados na literatura (NETO et al., 2011).

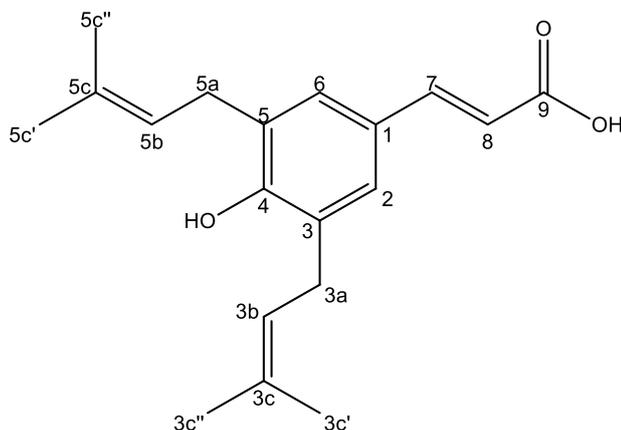


Tabela 14 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do Artepillin C (CDCl_3) comparados com dados da literatura.

C	Artepillin C		NETO et al., 2011 (CDCl_3)	
	$\delta \text{H}(\text{ppm})$	$\delta \text{C}(\text{ppm})$	$\delta \text{H}(\text{ppm})$	$\delta \text{C}(\text{ppm})$
1	-	126,27	-	128,40
7	7,70 (<i>d</i> , $J= 16 \text{ Hz}$, 1H)	147,29	7,68 (<i>d</i> , $J= 15,9 \text{ Hz}$, 1H)	147,40
8	6,29 (<i>d</i> , $J= 16 \text{ Hz}$, 1H)	114,01	6,28 (<i>d</i> , $J= 15,9 \text{ Hz}$, 1H)	114,00
9	-	172,65	-	172,40
2	7,20 (<i>s</i> , 1H)	128,30	7,21 (<i>s</i> , 1H)	128,30
3	-	127,58	-	127,70
4-OH	-	155,32	-	155,40
5	-	127,58	-	127,70
6	7,20 (<i>s</i> , 1H)	128,30	7,21 (<i>s</i> , 1H)	128,40
3a e 5a	3,35 (<i>d</i> , $J= 7,1 \text{ Hz}$, 4H)	29,36	3,34 (<i>d</i> , $J= 7,2 \text{ Hz}$, 2H)	29,50
3b e 5b	5,31 (<i>t</i> , $J= 7,1 \text{ Hz}$, 2H)	121,19	5,30 (<i>t</i> , 2H)	121,30
3c e 5c	-	135,04	-	135,20
3c'e 5c'	1,79 (<i>s</i> , 6H)	25,71	1,79 (<i>s</i> , 6H)	25,80
3c''e 5c''	1,78 (<i>s</i> , 6H)	17,74	1,77 (<i>s</i> , 6H)	17,90

De acordo com os deslocamentos químicos obtidos para o espectro de ^1H RMN, foi possível a elucidação estrutural do Artepillin C. Foi observada primeiramente a presença dos sinais característicos de sistemas cinâmicos em 7,70 ppm e 6,29 ppm, apresentados como um duplete. Esses deslocamentos representam respectivamente os hidrogênios olefínicos do sistema, sendo o maior deslocamento do hidrogênio beta-carboxila (**H7** – mais desprotegido) e o menor deslocamento referente ao hidrogênio alfa-carboxila (**H8** – mais protegido),

causado pelo efeito retirador por ressonância do grupo carboxílico alfa-beta insaturado. Através da constante de acoplamento medida entre os dois hidrogênios olefínicos (H1' e H1'') foi possível caracterizar o sistema como *trans*-cinâmico ($J = 16$ Hz).

O simpleto observado a 7,20 ppm foi atribuído aos hidrogênios **H2** e **H6**, o que caracteriza um sistema aromático tetrasubstituído e simétrico. Os deslocamentos encontrados em 1,79 ppm (**3H'** e **5H'**) e 1,78 ppm (**3H''** e **5H''**) caracterizam dois simpletos de integração para 6 hidrogênios em cada sinal, sendo esses os hidrogênios metílicos característicos de grupos prenila. O número de hidrogênios observados corresponde a presença de dois desses grupos, o que foi confirmado pela identificação do deslocamento químico presente em 3,35 ppm (corresponde a presença de hidrogênio metilênico), cuja integração para quatro hidrogênios foi posteriormente atribuída aos **H3a** e **H5a**. O último deslocamento necessário para a caracterização das prenilas foi identificado como um tripleto em 5,31 ppm, correspondente ao hidrogênio olefínico (**H3b** e **H5b**).

Já os deslocamentos químicos obtidos no espectro de ^{13}C RMN (DEPT-Q) indicaram a presença de seis carbonos quaternários, sinais pouco intensos devido ao tempo de relaxação necessário para esse tipo de núcleo gerar um sinal. Os carbonos quaternários foram utilizados para caracterizar o carbono do ácido carboxílico em 172,65 ppm (**C9**), além dos carbonos *ipso* no sistema aromático com deslocamentos em 126,27 ppm (**C1**), 127,58 ppm (**C3** e **C5**) e 155,32 (**C4-OH**). Os carbonos olefínicos do sistema cinâmico foram confirmados pelos deslocamentos em 147,29 ppm (**C7**) e 114,01 ppm (**C8**), diferença de deslocamento que também pode ser pelo efeito retirador de elétrons por ressonância da carboxila sobre o sistema alfa-beta insaturado.

Já aos carbonos **C3c** e **C5c** foi atribuído o deslocamento em 135,04 ppm, o que caracteriza os carbonos quaternários presentes nos dois grupos prenila. Aos carbonos metílicos dos grupos prenila, foram atribuídos os deslocamentos presentes em 25,71 ppm (**C3c'** e **C5c'**) e 17,54 ppm (**C3c''** e **C5c''**). A diferença entre os deslocamentos químicos que correspondem aos carbonos metílicos (que também é observada no espectro de ^1H RMN) nos indica que tais grupos estão em ambientes químicos diferentes. Isso pode ser explicado pela presença do carbono metilênico em 29,46 ppm (**C3a** e **C5a**), que possui livre rotação por conta de sua hibridização sp^3 , expondo assim os núcleos metílicos a regiões da molécula onde a densidade eletrônica é diferente. As **Figuras 32** e **33** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos e suas principais atribuições que justificam a elucidação estrutural do Artepillin C.

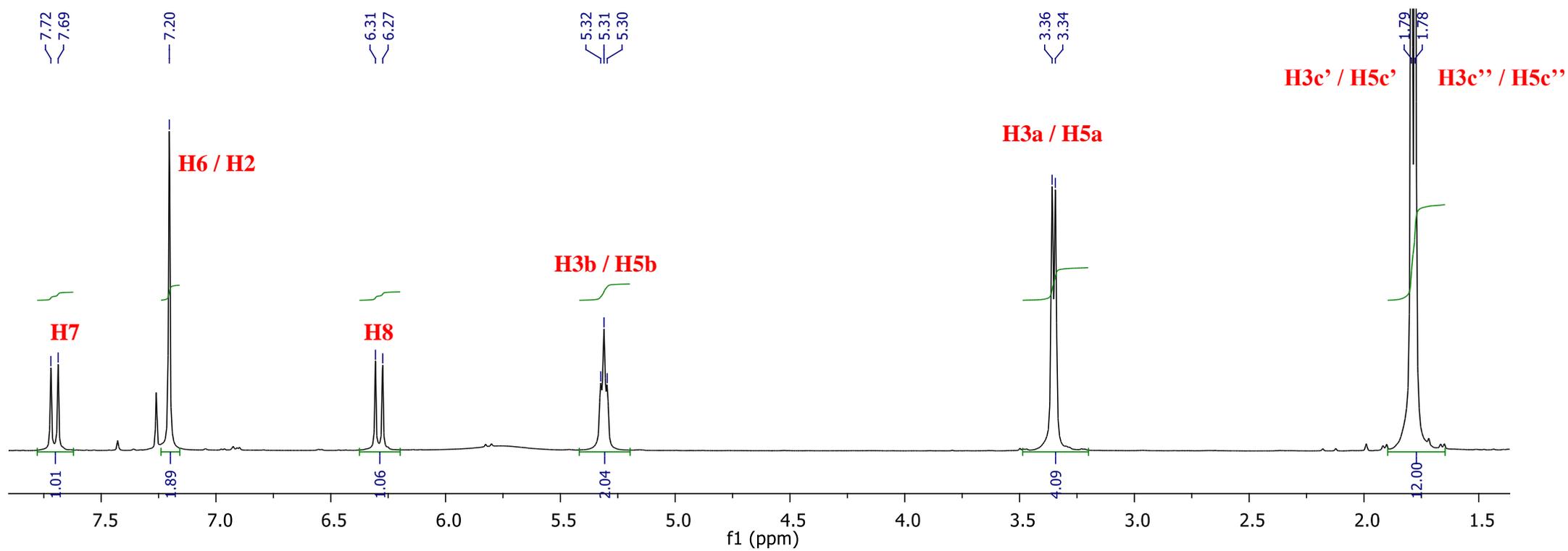


Figura 32 – Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) do Artepillin C com suas devidas atribuições.

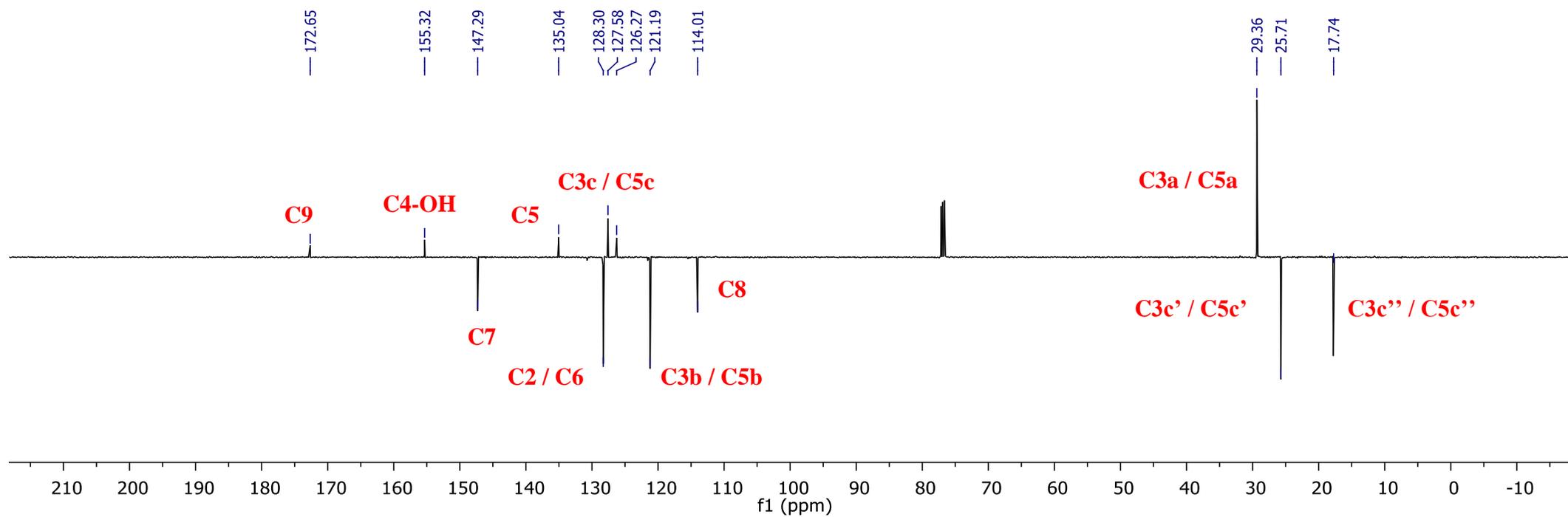


Figura 33 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) do Artepillin C com suas devidas atribuições.

A estrutura do biomarcador Artepillin C da própolis verde também foi confirmada através do perfil de fragmentação obtido por espectrometria de massas (**Figura 34**). O íon molecular (M^+ 300) não foi registrado para o Artepillin C ($C_{19}H_{24}O_3$), mas apresentou um primeiro pico com razão massa/carga (m/z) de 256 ($M^+ - 40$), indicando perda do grupo CO_2 da unidade do ácido carboxílico. Os principais íons detectados apresentaram m/z de 256 (74%), 201 (75%); 145 (100%); 91 (20%), característicos de sistemas cinâmicos prenilados.

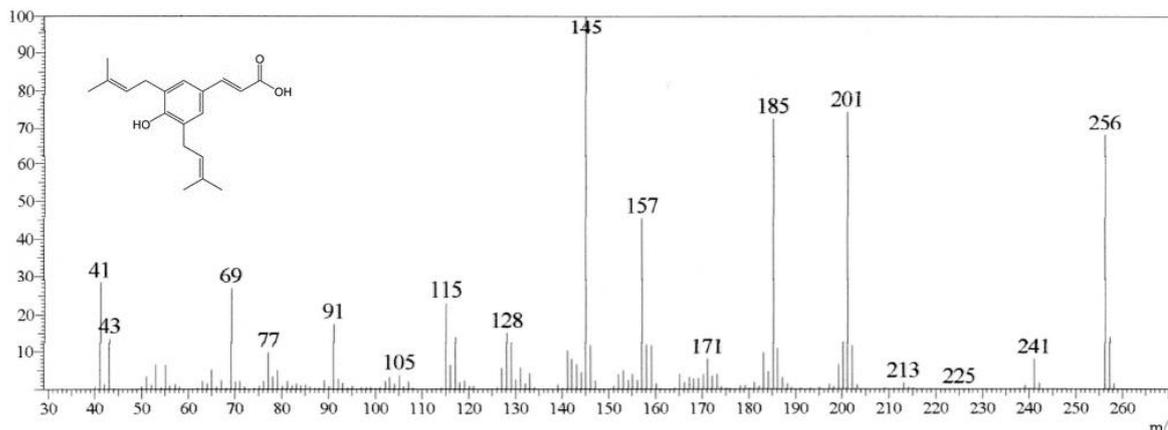
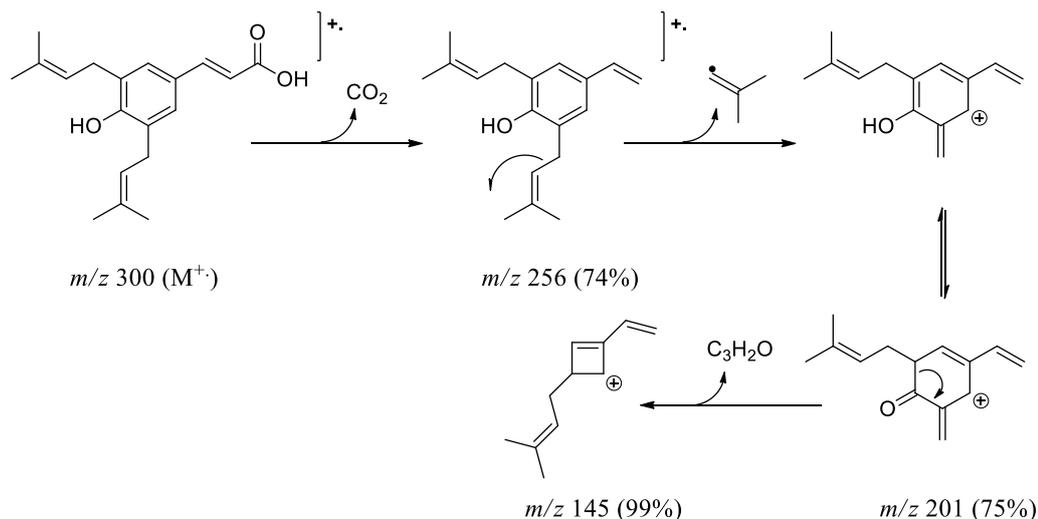


Figura 34 – Espectro de massas do Artepillin C.

No **Esquema 5** é apresentada uma proposta de fragmentação que justifica a elucidação estrutural do Artepillin C.



Esquema 5 – Proposta de fragmentação para o Artepillin C (adaptado de SALGUEIRO, 2016).

5.4.2. Caracterização da Bacarina

Na **Tabela 15** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos para os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da bacarina, em comparação com os dados relatados na literatura (AGA et al., 1994).

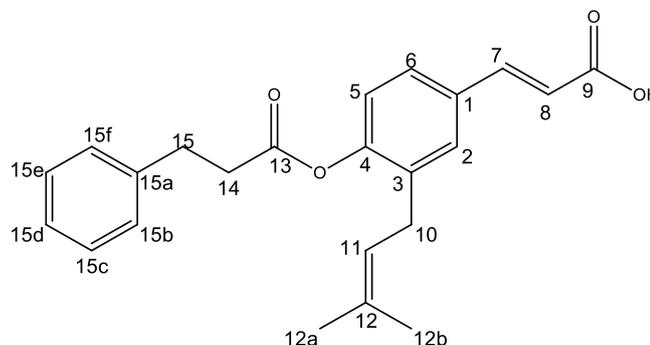


Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do Artepillin C (CDCl_3) comparados com dados da literatura.

C	Bacarina		AGA et al., 1994 (CDCl_3)	
	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1	-	132,08	-	132,00
7	7,75 (<i>d</i> , $J= 15,9$ Hz, 1H)	145,99	7,73 (<i>d</i> , $J= 16$ Hz, 1H)	146,30
8	6,40 (<i>d</i> , $J= 15,9$ Hz, 1H)	117,31	6,38 (<i>d</i> , $J= 16$ Hz, 1H)	117,20
9	-	171,05	-	171,00
2	7,25 – 7,42 (<i>m</i> , 7H)	130,13	7,39 (<i>s</i> , 1H)	130,20
3	-	134,33	-	134,30
4-OR	-	150,64	-	150,70
5	6,98 (<i>d</i> , $J= 8,4$ Hz, 1H)	120,85	6,97 (<i>d</i> , $J= 8,0$ Hz, 1H)	120,80
6	7,25 – 7,42 (<i>m</i> , 7H)	126,85	7,40 (<i>dd</i> , 1H)	126,90
10	3,17 (<i>d</i> , $J= 7,1$ Hz, 2H)	28,46	3,14 (<i>d</i> , $J= 7,3$ Hz, 2H)	28,40
11	5,20 (<i>t</i> , $J= 6,7$ Hz, 1H)	122,84	5,18 (<i>t</i> , $J= 7,3$ Hz, 1H)	122,80
12	-	133,97	-	134,0
12a	1,78 (<i>s</i> , 3H)	25,72	1,75 (<i>s</i> , 3H)	26,70
12b	1,69 (<i>s</i> , 3H)	17,86	1,67 (<i>s</i> , 3H)	17,90
13	-	171,29	-	
14	3,11 (<i>t</i> , $J= 7,7$ Hz, 2H)	35,80	3,09 (<i>t</i> , $J= 7,8$ Hz, 2H)	25,80
15	2,94 (<i>t</i> , $J= 7,7$ Hz, 2H)	30,90	2,92 (<i>t</i> , $J= 8,0$ Hz, 2H)	20,90
15a	-	139,96	-	139,9
9b e 9f		128,37		128,60
9c e 9e	7,25 – 7,42 (<i>m</i> , 7H)	128,64	7,2 – 7,4 (5H, <i>m</i>)	128,5
9d		126,54		126,9

De acordo com os deslocamentos químicos obtidos para o espectro de ^1H RMN, foi possível a elucidação estrutural da bacarina. Com relação aos hidrogênios que pertencem ao sistema cinâmico, pouca diferença pôde ser observada nos deslocamentos químicos com relação ao Artepillin C. Os sinais observados em 7,75 ppm e 6,40 ppm foram respectivamente

atribuídos aos hidrogênios, **H7** e **H8**, onde o efeito de desproteção causado para o **H7** foi causado pelo efeito retirador por ressonância do ácido carboxílico. O grupo prenila foi identificado pelos deslocamentos químicos em 3,17 ppm referente ao hidrogênio metilênico (**H10**) e 5,20 ppm referente ao hidrogênio olefínico (**H11**), ambos com constante de acoplamento de 7,0 Hz, além dos hidrogênios metílicos em 1,78 ppm (**H12a**) e 1,69 ppm (**H12b**), que foram observados como simpletos com integração para três hidrogênios cada. Isso indica a presença de apenas um substituinte prenila, o que é fundamental para a caracterização da bacarina.

Por conta dos dois núcleos aromáticos na estrutura da Bacarina, alguns deslocamentos químicos entre 7,25 – 7,42 ppm acabam se sobrepondo, o que dificulta a elucidação dos sinais. Entretanto, é possível identificar a unidade diidrocinaoil através dos hidrogênios metilênicos em 3,11 ppm (**H14**, ligado ao éster) e 2,94 (**H15**, ligado ao anel aromático).

Através do espectro de ^{13}C RMN (DEPT-Q) foi possível identificar a presença de 7 carbonos quaternários, entre eles, dois carbonos carboxílicos: 171,05 ppm (**C9**) e 171,29 (**C13**), compatível com a presença de uma função ácido carboxílico e éster na bacarina. Os carbonos substituídos **C1**, **C3** e **C4-OR**, presentes no anel aromático do sistema cinâmico, foram atribuídos aos respectivos deslocamentos em 132,08 ppm, 134,33 ppm e 150,64 ppm. Os deslocamentos referentes ao grupo prenila se mostraram semelhantes aos que foram obtidos para o Artepillin C, confirmando a presença deste grupo na estrutura. Aos carbonos metilênicos do grupo diidrocinaoil foram atribuídos os deslocamentos em 35,80 ppm (**C14**) e 30,90 (**C15**). O grau de liberdade desta subunidade na estrutura da bacarina pode causar alterações no ambiente químico dos hidrogênios aromáticos, dificultando sua visualização por conta da sobreposição de sinais.

As **Figuras 35** e **36** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos e suas principais atribuições que justificam a elucidação estrutural da Bacarina.

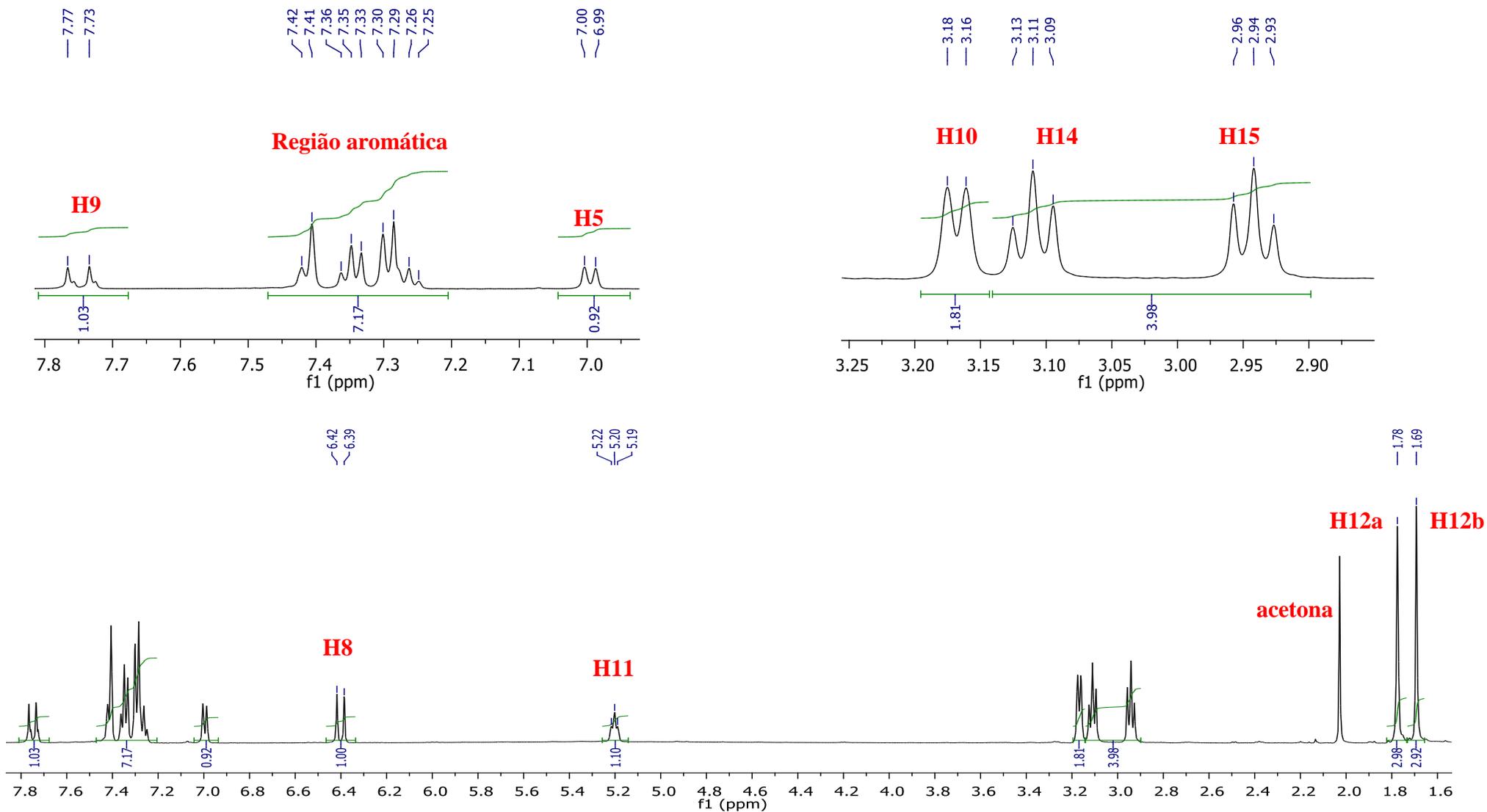


Figura 35 – Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) da bacarina com suas devidas atribuições

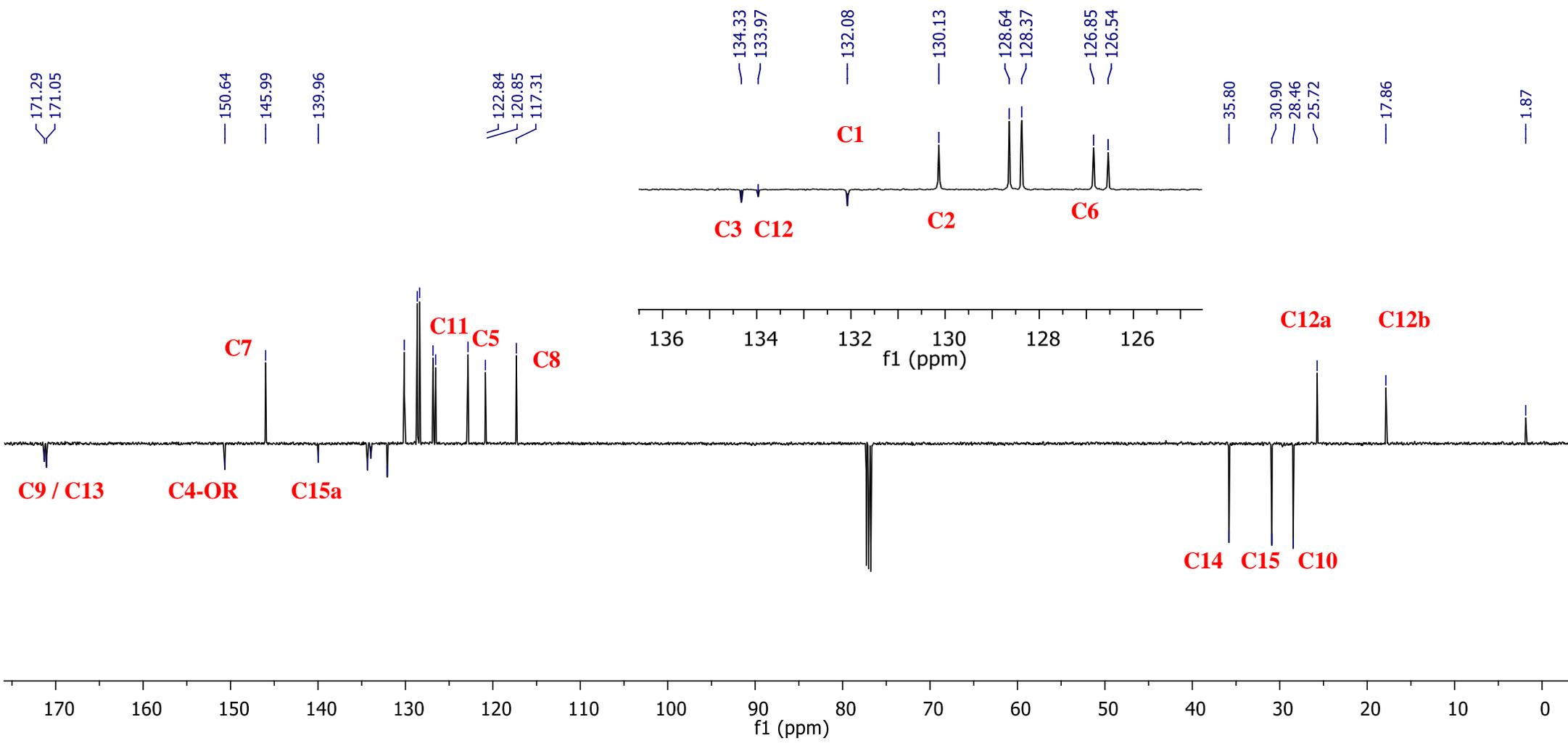


Figura 36 – Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) da Bacarina com suas devidas atribuições.

5.4.3. Caracterização do Cromeno

Na **Tabela 16** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos para os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da ácido 2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico, em comparação com os dados relatados na literatura (BANSKOTA et al., 1998).

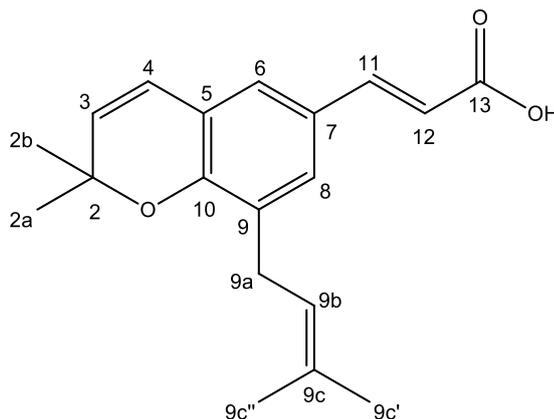


Tabela 16 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do cromeno (CDCl_3) comparados com dados da literatura.

C	Cromeno		BANSKOTA et al., 1998 (CDCl_3)
	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)
2	-		-
2a/2b	1,44 (s, 6H)	28,23	1,46 (s, 6H)
3	5,65 (d, $J= 9,8$ Hz, 1H)	121,97	5,66 (d, $J= 9,9$ Hz, 1H)
4	6,32 (d, $J= 9,8$ Hz, 1H)	129,79	6,78 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H)
5	-		-
6	7,19 (s, 1H)	122,02	7,32 (d, $J= 2,2$ Hz, 1H)
7	-		-
8	7,04 (s, 1H)	129,82	7,18 (d, $J= 2,1$ Hz, 1H)
9	-		-
9a	3,27 (d, $J= 7,5$ Hz, 2H)	28,06	3,18 (d, $J= 7,4$ Hz, 2H)
9b	5,26 (t, 1H)	124,37	5,33 (t, 1H)
9c	-		-
9c'	1,73 (s, 3H)	17,86	1,70 (s, 3H)
9c''	1,74 (s,3H)	25,79	1,73 (s, 3H)
10	-		-
11	7,66 (d, $J= 15,8$ Hz, 1H)	147,16	7,69 (d, $J= 16,0$ Hz, 1H)
12	6,27 (d, $J= 15,8$ Hz, 1H)	113,48	6,29 (d, $J= 15,8$ Hz, 1H)
13	-		-

De acordo com os deslocamentos químicos obtidos para o espectro de ^1H RMN, foi possível a elucidação estrutural do cromeno (2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico). Para os deslocamentos identificados em 7,66 ppm e 6,27 ppm foram atribuídos os hidrogênios

cinâmicos **H11** e **H12**, onde a constante de acoplamento indicou a configuração *trans* ($J=15,8$ Hz). Os respectivos deslocamentos químicos para o espectro de ^{13}C RMN correspondem a 147,16 ppm (**C11**) e 113,48 ppm (**C12**), sendo possível caracterizar o sistema alfa-beta insaturado do ácido carboxílico.

Na região que corresponde aos deslocamentos de hidrogênios aromáticos, foi possível observar a presença de dois simpletos em 7,19 ppm (**H6**) e 7,04 ppm (**H8**) indicando um sistema aromático tetrasubstituído. Porém, diferente do que é característico para o Artepillin C, foram observados diferentes deslocamentos para os hidrogênios metílicos desta estrutura. Os deslocamentos em 1,73 ppm e 1,74 ppm (ambos simpletos) foram associados aos hidrogênios do grupo prenila (**H9c'** e **H9c''**) com auxílio do espectro de ^{13}C RMN, onde foi possível diferenciar com mais clareza os deslocamentos químicos para os carbonos metílicos (**C9c'** e **C9c''**) respectivamente em 17,86 ppm e 6,27 ppm, enquanto o deslocamento químico em 1,44 ppm (**H2a/H2b**) foi atribuído aos hidrogênios metílicos do anel cromeno, com auxílio do sinal presente em 28,23 ppm (**C2a/C2b**). Foi possível observar também a presença de um sistema de olefínico através dos deslocamentos químicos em 5,65 ppm (**H3**) e 6,32 ppm (**H4**), cuja constante de acoplamento (J) apresentou valor de 9,8 Hz. Os deslocamentos químicos para os respectivos carbonos foram de 121,97 ppm (**C3**) e 129,70 ppm (**C4**), contribuindo para a confirmação de uma insaturação presente no cromeno.

As **Figuras 37** e **38** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos e suas principais atribuições que justificam a elucidação estrutural do cromeno.

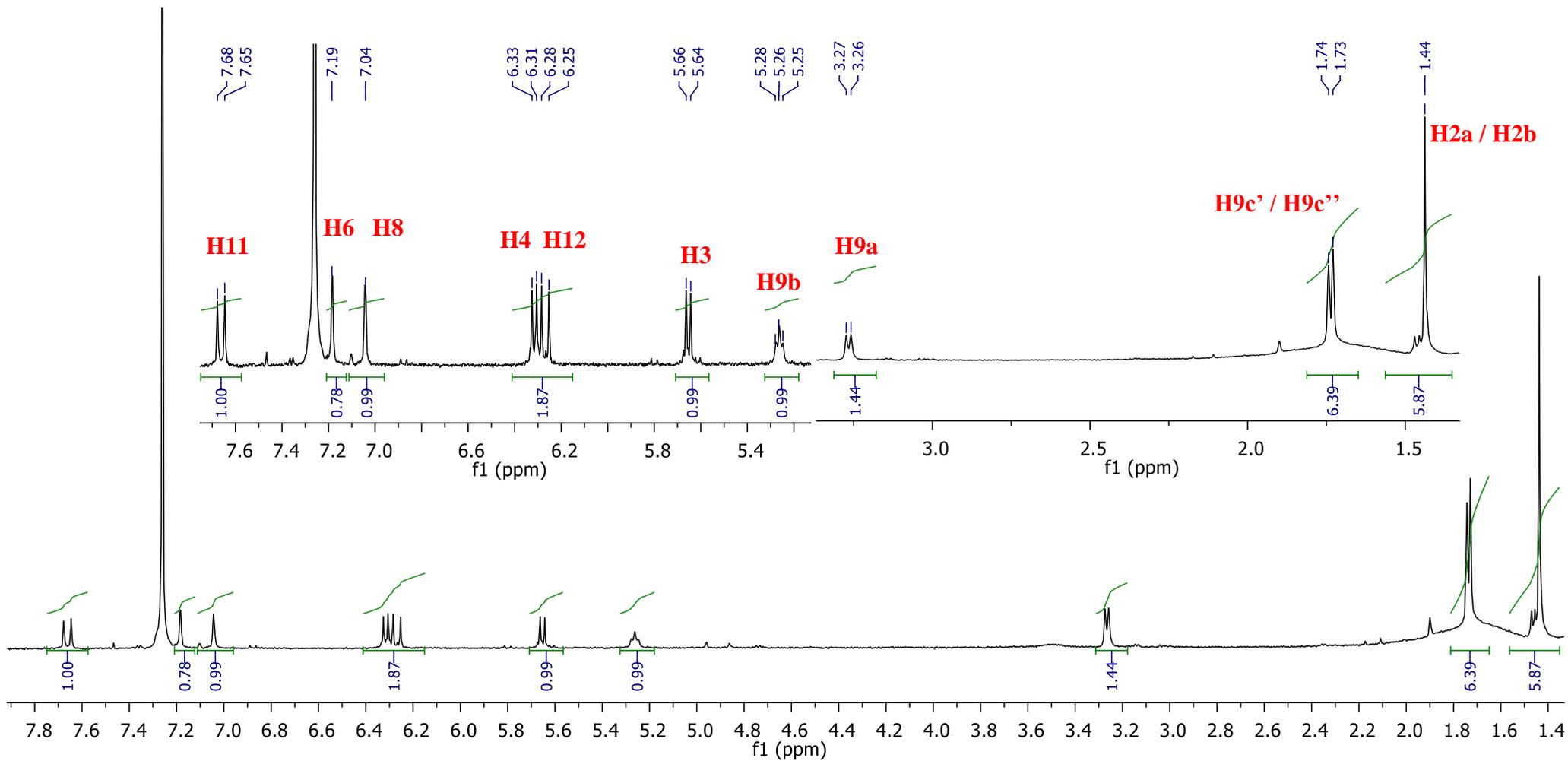


Figura 37 – Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) do ácido 2',2'-dimetilcromo-3-prenil propenoico com suas devidas atribuições.

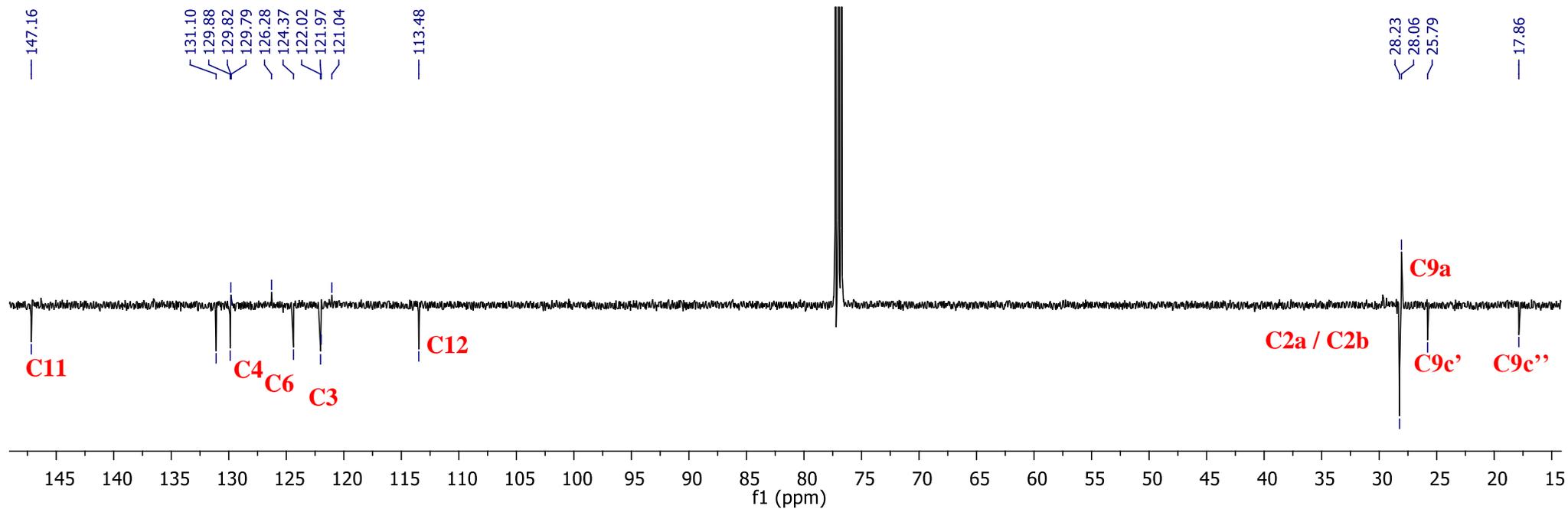


Figura 38 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) do ácido 2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico com suas devidas atribuições.

5.4.4. Caracterização da Drupanina

Na **Tabela 17** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos para os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da drupanina obtida por hidrólise alcalina a partir da bacarina, em comparação com os dados relatados na literatura (HATTORI et al., 2011).

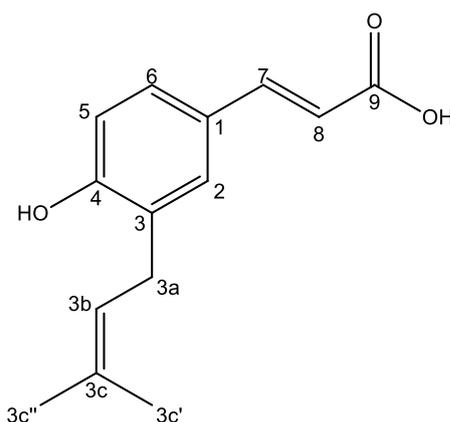


Tabela 17 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da drupanina (CDCl_3) comparados com dados da literatura.

C	Drupanina		HATTORI et al., 2011 (Acetona- d_6)	
	δ H (ppm)	δ C (ppm)	δ H(ppm)	δ C (ppm)
1	-	128,15	-	127,10
7	7,24 (<i>d</i> , $J= 16$ Hz, 1H)	140,21	7,59 (<i>d</i> , $J= 16,1$ Hz, 1H)	145,90
8	6,25 (<i>d</i> , $J= 16$ Hz, 1H)	117,08	6,31 (<i>d</i> , $J= 16,1$ Hz, 1H)	115,60
9	-	174,49	-	168,20
2	7,13 – 7,24 (<i>m</i> , 2H)	127,18		130,70
3	-	127,91	-	129,50
4-OH	-	156,18	-	158,10
5	6,68 (<i>d</i> , $J= 8,1$ Hz, 1H)	114,52	6,90 (<i>d</i> , $J= 8,4$ Hz, 1H)	116,10
6	7,13 – 7,24 (<i>m</i> , 2H)	127,13	7,37 (<i>dd</i> , $J= 8,4$ Hz, 1H)	128,40
3a	3,22 (<i>d</i> , $J= 7,1$ Hz, 2H)	27,71	3,35 (<i>d</i> , $J= 16,1$ Hz, 2H)	28,90
3b	5,26 (<i>t</i> , $J= 7,1$ Hz, 1H)	122,32	5,37 (<i>t</i> , $J= 7,6$ Hz, 1H)	123,20
3c	-	128,46	-	130,70
3c'	1,69 (<i>s</i> , 3H)	22,73	1,73 (<i>s</i> , 6H)	25,90
3c''	1,66 (<i>s</i> , 3H)	24,66	1,73 (<i>s</i> , 6H)	17,90

De acordo com os deslocamentos químicos obtidos para o espectro de ^1H RMN, foi possível a elucidação estrutural da drupanina. Semelhante a elucidação estrutural do Artepillin C, os deslocamentos observados em 7,24 ppm e 6,25 ppm foram atribuídos ao sistema α , β do ácido cinâmico, sendo respectivamente os hidrogênios **H7** e **H8**, com constante de acoplamento (J) no valor de 16 Hz, indicando um sistema com H *trans*. O hidrogênio

aromático cujo deslocamento químico se encontra em 6,68 ppm apresentou constante de acoplamento *orto* ($J= 8,1$ Hz), e por esta razão foi atribuído ao hidrogênio **H5**, mais protegido por estar localizado na posição *orto* com relação à substituinte hidroxila. Os hidrogênios aromáticos **H2** e **H6** não foram elucidados por conta da sobreposição de sinais na região vai de 7,13 ppm a 7,24 ppm, onde é possível observar um multiplete. Os deslocamentos químicos para os hidrogênios referentes ao grupo prenila foram semelhantes àqueles observados para os todas as substâncias preniladas elucidados neste trabalho, com os hidrogênios metílicos sendo atribuídos aos sinais em 1,69 ppm (**H3c'**) e 1,66 ppm (**H3c''**) por conta da diferenciação do ambiente químico causada pela rotação do carbono metilênico, cujo H aparece em 3,22 ppm (**H3a**). Por fim, foi atribuído ao hidrogênio olefínico do grupo prenila (**H3b**) o deslocamento químico em 5,26 ppm.

Já de acordo com o espectro de ^{13}C RMN, foi possível identificar o carbono carboxílico, cujo deslocamento químico foi observado em 174,49 ppm (**C9**). Os carbonos olefínicos referentes ao sistema cinâmico foram observados em 140,21 ppm (**C7**) e 117,08 ppm (**C8**), semelhante ao que foi observado para os demais deslocamentos químicos dos sistemas cinâmicos. Os carbonos metílicos do grupo prenila foram diferenciados pela influência do ambiente químico, sendo seus deslocamentos em 22,73 ppm (**C3c'**) e 24,66 ppm (**C3c''**), e o carbono metilênico foi observado em 27,30 ppm (**C3a**). O carbono olefínico do grupo prenila foi identificado em 122,32 ppm (**C3b**), e os demais carbonos aromáticos foram observados em 128,15 ppm (**C1**), 156,80 ppm (**C4-OH**), 128,46 ppm (**C2**), 127,13 ppm (**C6**) e 114,52 ppm (**C5**).

As **Figuras 39** e **40** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos e suas principais atribuições que justificam a elucidação estrutural da drupanina.

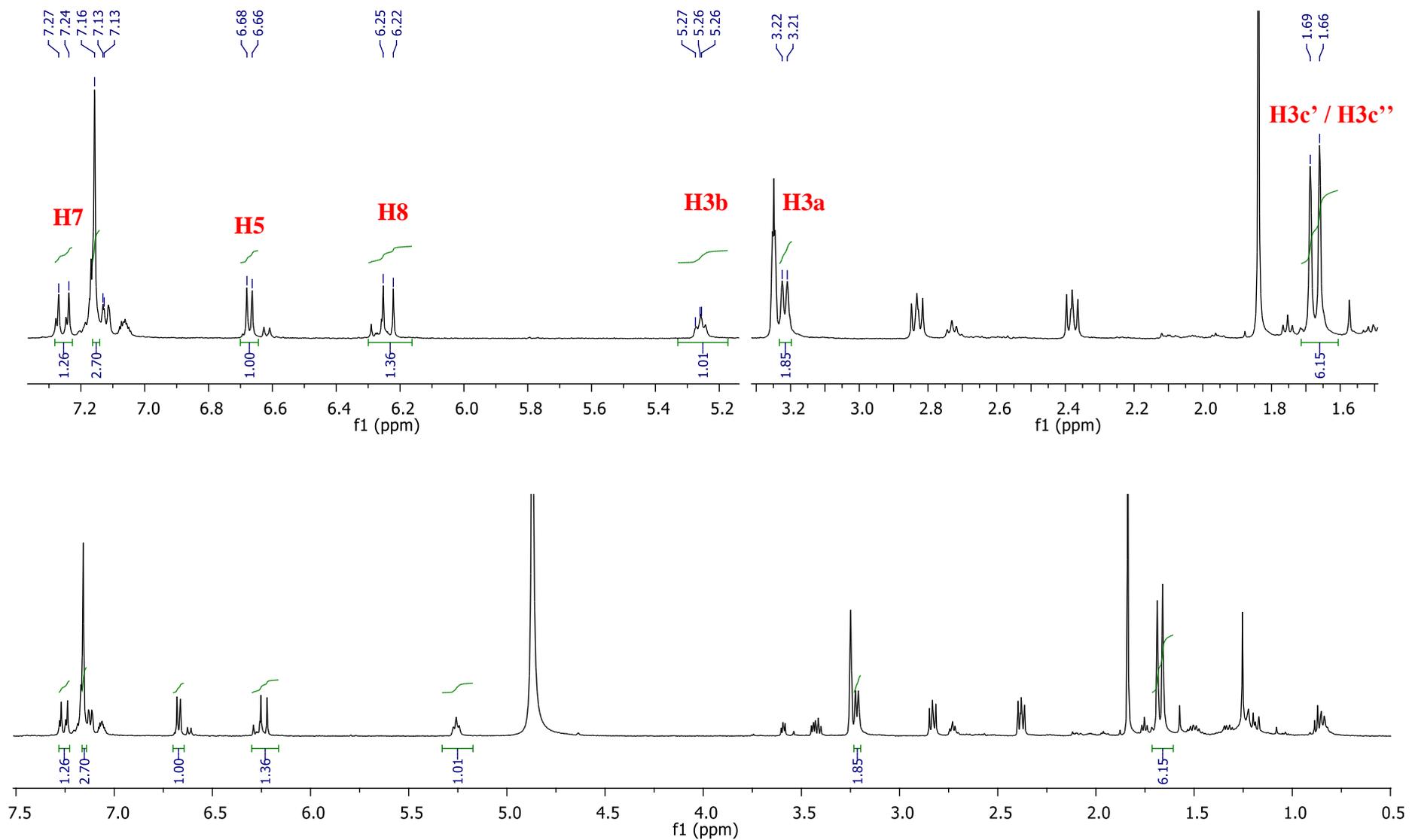


Figura 39 – Espectro de ^1H RMN – (500 MHz, CDCl_3) do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico.

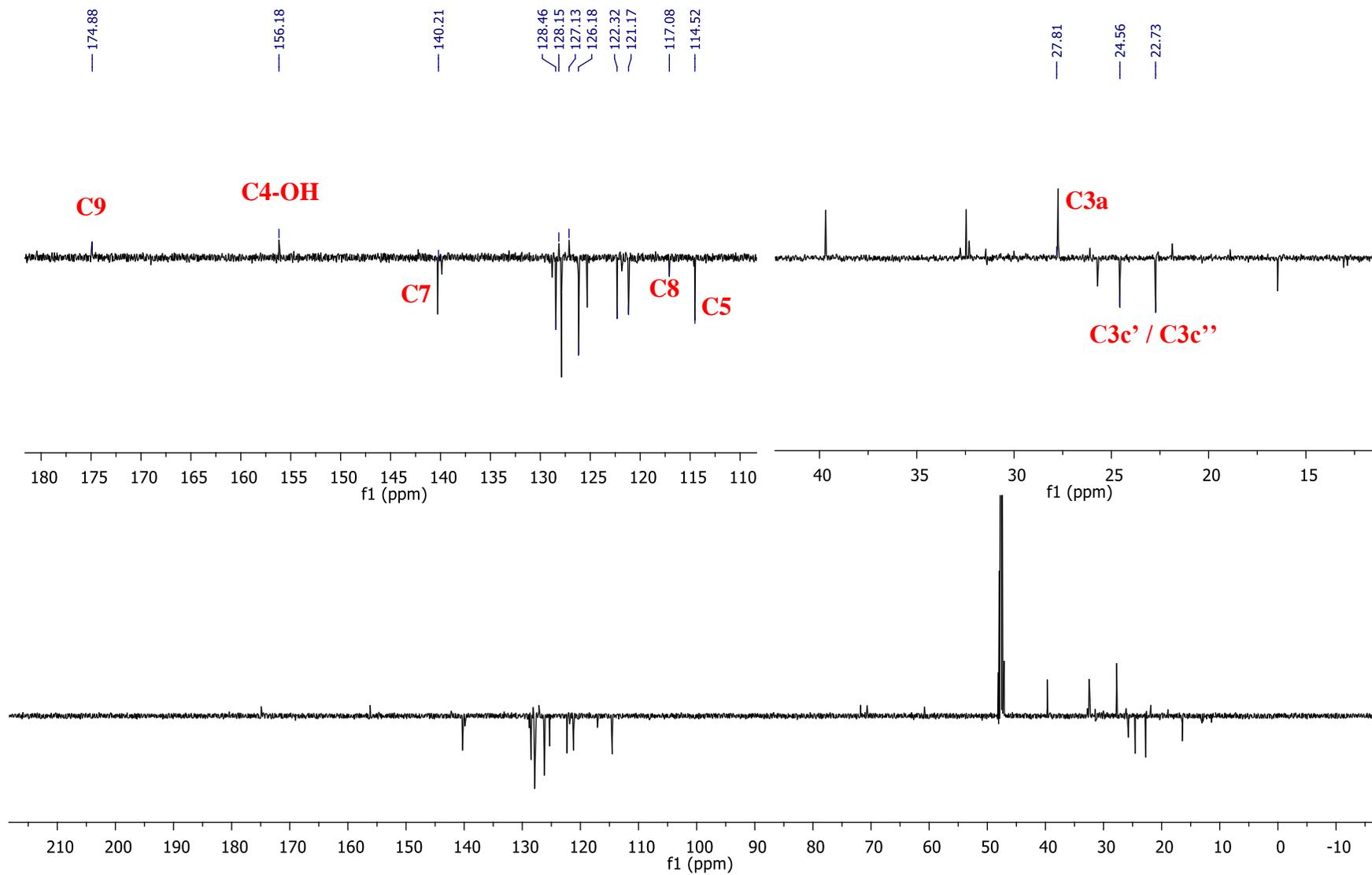


Figura 40 – Espectro de ^{13}C RMN – DEPT-Q (125 MHz, CDCl_3) do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico.

5.5. Quantificação dos constituintes da própolis verde por CLAE-DAD

Neste trabalho, as análises por CLAE-DAD dos extratos (hexânicos e etanólicos) de própolis verde foram realizadas em coluna de fase reversa (C-18) de acordo com a metodologia descrita por Salgueiro e Castro (2016) e apresentada na parte experimental (item 4.10). 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 estrutura. Os padrões de Artepillin C, Bacarina e Cromeno, utilizados para identificação e quantificação por CLAE-DAD, foram isolados da própolis verde, enquanto a Drupamina foi obtida a partir da hidrólise da bacarina. Todas as substâncias utilizadas apresentaram elevado grau de pureza cromatográfica (~98%). Na **Tabela 18** estão apresentados os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão utilizado.

Tabela 18 - Tempo de retenção, máximo de absorção no UV das substâncias fenólicas utilizadas como padrões nas análises por CLAE-DAD

Padrão	tR (min)	λ_{\max} (nm)
Drupamina	17,9	315
Artepillin C	24,4	315
Bacarina	27,4	280
Cromeno	28,7	214; 320

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo, o extrato etanólico de própolis verde utilizado neste estudo teve seu perfil químico analisado por CLAE-DAD e as seguintes substâncias foram identificadas: ácido ferúlico, *p*-cumárico, rosmarínico, 2,3-dimetoxibenzóico, 2,5-dimetoxibenzóico, os ácidos prenilados Artepillin C e drupamina, e os flavonoides hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, pinocembrina, acacetina, canferide, galangina, pinostrombina e tectocrisina (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). A presença dessas substâncias fenólicas justifica em parte a elevada capacidade antioxidante apresentada pela própolis verde do Rio de Janeiro.

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 tR e da curva no ultravioleta com padrões autênticos isolados ou sintetizado. Os extratos *n*-hexânicos apresentaram semelhança entre si, bem como os respectivos extratos etanólicos, variando apenas na intensidade dos picos observados, conforme a cidade de origem. O perfil

cromatográfico dos extratos etanólicos foi muito semelhante ao que é descrito por outros autores para a própolis verde brasileira (SALGUEIRO e CATRO, 2016; VEIGA et al., 2017).

Na **Figura 41** estão apresentados os teores das quatro substâncias que foram quantificados por CLAE-DAD nos extratos n-hexânicos e etanólicos de própolis verde estudados neste trabalho. A Bacarina (Bacch) e o Ácido 2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico (Crom) foram identificados pela primeira vez na amostra de própolis verde estudada pelo nosso grupo, embora já tenha sido descrita na literatura (AGA et al., 1994; SALATINO et al., 2005).

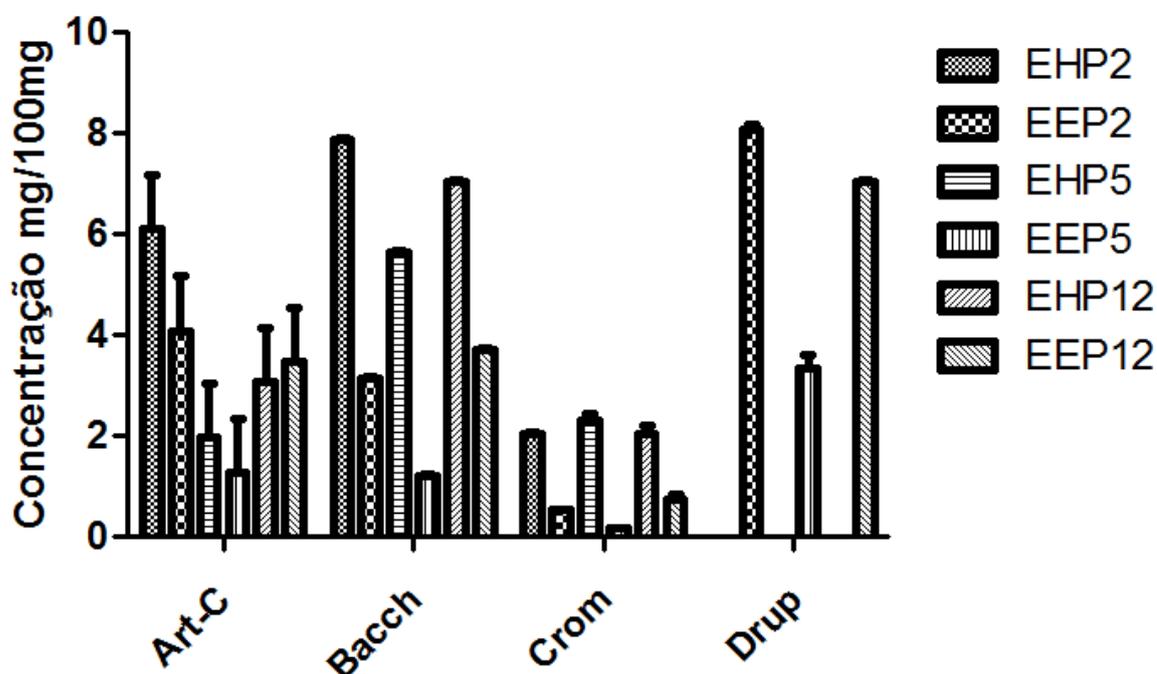


Figura 41 – Teor (em mg por 100 mg de extrato) dos derivados prenilados presentes nos extratos de própolis verde.

Quanto ao teor de Artepillin C, a variação ficou entre 1,26 (**EEP-5**) e 6,09 mg por 100 mg de extrato (**EHP-2**), enquanto a variação no teor de Bacarina foi de 1,20 (**EEP-5**) e 7,87 mg por 100 mg de extrato (**EHP-2**), para o cromeno a variação foi de 0,15 (**EEP-5**) a 2,30 mg por 100 mg de extrato (**EHP-5**). A Drupanina só pode ser quantificada nos extratos etanólicos sendo o **EEP-2** com teor mais elevado (8,06 mg por 100 mg de extrato). A ausência de um grupo prenila na molécula da Drupanina aumenta a sua polaridade, fazendo com que ela seja extraída preferencialmente pelo etanol, em virtude de ser a substância com características mais polares. Dessa forma, os extratos etanólicos apresentaram teores mais elevados de Drupanina, quando comparados com o derivado diprenilado (Artepillin C), e

consequentemente teores mais baixos do Cromeno (substância mais lipofílica). É possível observar a seletividade do solvente mais apolar (*n*-hexano) em extrair os constituintes prenilados da própolis. Para os extratos *n*-hexânicos, a bacarina foi o constituinte majoritário em todos os extratos, enquanto nos extratos etanólicos a drupanina e o Artepillin C foram os principais componentes.

Fernandes-Silva e colaboradores (2013) estudaram amostras de própolis produzidas em Minas Gerais e no Paraná por extração em Soxhlet utilizando metanol como solvente. Os derivados prenilados Drupanina e Artepillin C foram identificados em ambas as amostras, sendo que as amostras oriundas de Minas Gerais apresentaram os teores mais elevados (0,057 mg por 100 mg de extrato e 0,066 mg por 100 mg de extrato, respectivamente), quando comparados com a própolis do Paraná (0,022 mg por 100 mg de extrato e 0,018 mg por 100 mg de extrato, respectivamente), porém inferiores ao nosso extrato etanólico. É de se esperar que o uso do metanol desfavoreça a extração destas substâncias prenilados (que são pouco polares) por conta da elevada polaridade deste solvente, diminuindo assim, o teor destes componentes nos extratos.

Fávaro e colaboradores (2015) realizaram uma análise fitoquímica para extratos etanólicos de própolis produzida no Estado do Paraná, onde foi possível identificar diferentes flavonoides, como quercetina, naringenina, apigenina, crisina e pinocembrina, frequentemente identificados na própolis verde, inclusive por outros autores (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Foram identificados também ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, além de derivados prenilados típicos da própolis verde, como a Drupanina, Bacarina e o Artepillin C. A identificação dessas substâncias em outros tipos de própolis não é comum, mas pode acontecer devido a grande distribuição da espécie *B. dracunculifolia* nas diferentes regiões brasileiras (BASTOS et al., 2010).

O teor de Artepillin C encontrados nos extratos *n*-hexânicos deste trabalho se mostrou superior ao que foi reportado por Salgueiro e Castro (2016), tanto nos extratos etanólicos da própolis *in natura* quanto nos extratos de própolis comercial. O teor de Artepillin C foi uma das principais variáveis para a discriminação entre extratos comerciais e àqueles preparados a partir da própolis *in natura*, estando também correlacionado com a atividade antioxidante apresentada pelos extratos de própolis verde (SALGUEIRO, 2016).

Zhang e colaboradores (2016) quantificaram o Artepillin C em extratos etanólicos de própolis verde obtendo em média 10,77 mg por 100 mg de extrato, valor mais elevado que os resultados obtidos neste trabalho. A matriz bruta foi extraída duas vezes seguidas utilizando a

técnica de ultrassom (50 g para 200 mL de solvente), com tempo total de 3 h para cada extração. A diferença entre a proporção de material (3g de própolis neste trabalho) utilizado na extração, bem como a metodologia empregada podem ser responsáveis pelo maior teor do princípio ativo quantificado.

O teor de Artepillin C obtido por Veiga e colaboradores (2017) para os extratos *n*-hexanos e etanólicos da própolis verde produzida em Minas Gerais (0,26 mg por 100 mg de extrato e 0,15 mg por 100 mg de extrato, respectivamente) se mostrou inferior aos resultados reportados neste trabalho. De maneira semelhante, o teor de Artepillin C variou pouco neste trabalho entre os extratos *n*-hexânicos e etanólicos, exceto para os extratos EHP-2 e EEP-2, que apresentaram a variação mais significativa nos teores deste biomarcador.

5.6. Atividade antiparasitária e citotóxica da própolis verde

Os nitroheterociclos (nifurtimox e benzonidazol) são os únicos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da doença de Chagas, sendo que nenhum deles é eficaz na fase crônica da doença e ambos apresentam muitos efeitos adversos. A própolis verde apresenta, entre outras propriedades, atividade antiparasitária, o que a torna uma matriz desejável para a investigação acerca dos seus componentes que apresentam atividade tóxica contra o *T. cruzi* (MARCUCCI et al., 2001; SALOMÃO et al., 2007; SALOMÃO et al., 2011).

Neste trabalho, um dos extratos *n*-hexânicos (**EHP-2**) e apenas as substâncias isoladas (Artepillin C e Bacarina) foram testados contra formas infectantes de *T. cruzi*. O cromeno e a Drupanina ainda estão em fase de avaliação.

Os ensaios biológicos foram conduzidos após a infecção das células viáveis de mamífero (LLC-MK2) com o parasito na sua forma tripomastigota (Tulahuen C2C4 LacZ). Para a determinação do índice de seletividade (I.S.) sobre as células testadas, foi avaliada a atividade citotóxica do extrato de própolis e de seus componentes frente às células não infectadas com o parasito. As **Figuras 42 e 43** apresentam, respectivamente, os gráficos de viabilidade celular (% de células viáveis) para os tratamentos com o extrato bruto de própolis verde e as substâncias isoladas.

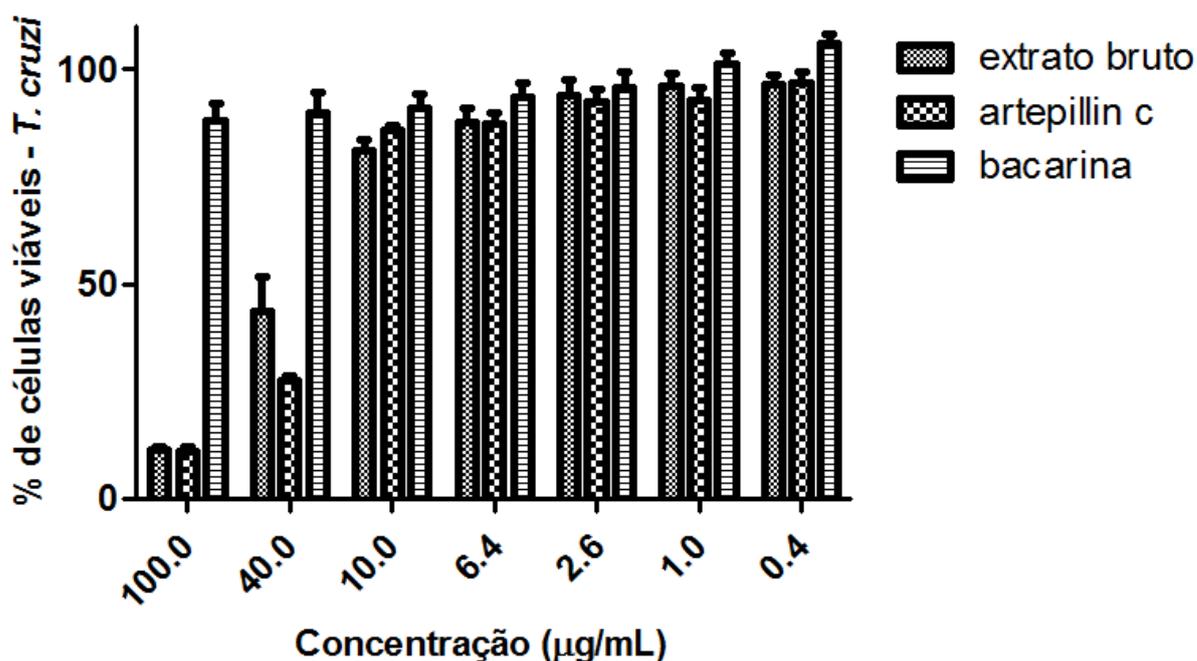


Figura 42 – Médias das células viáveis de *T. cruzi* após o tratamento com o extrato hexânico de própolis e os componentes isolados, em várias concentrações.

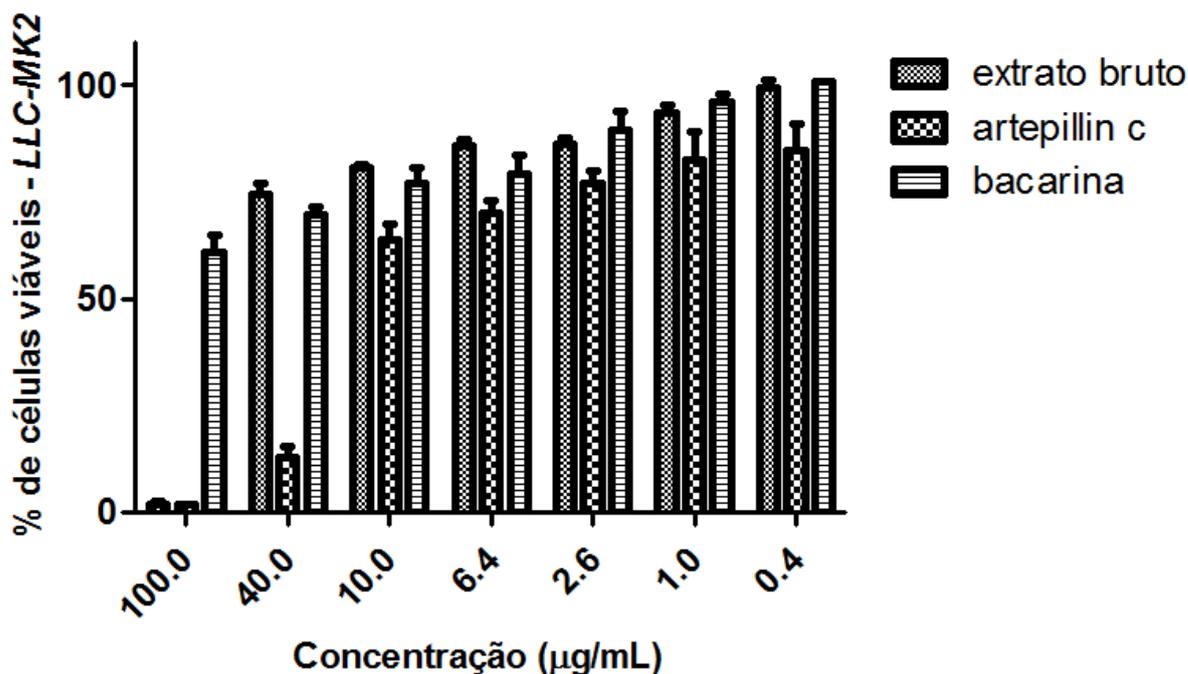


Figura 43 – Médias das células viáveis (LLC-MK2), não infectadas, após o tratamento com o extrato hexânico de própolis e os componentes isolados, em várias concentrações.

A média de viabilidade celular entre os ensaios com as células infectadas e não infectadas com o *T. cruzi* se mostraram semelhantes nas concentrações mais baixas do extrato *n*-hexânico de própolis verde. Na concentração de 40,0 µg.mL⁻¹, o tratamento com o extrato

de própolis verde sobre as células infectadas apresentou aproximadamente 40% de células viáveis, enquanto o tratamento com células não infectadas resultou em aproximadamente 80% de viabilidade celular (I.S. de 1,46). Isso pode ser interpretado como um indicativo de que os componentes do extrato bruto de própolis verde são mais tóxicos ao parasito, característica importante na investigação de substâncias bioativas para o tratamento de doenças negligenciadas. O CE_{50} obtido a partir da porcentagem de células viáveis e o índice de seletividade obtidos nos ensaios biológicos estão apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Resultados dos ensaios biológicos de atividade tóxica contra formas infectantes de *T. cruzi* e atividade citotóxica.

	Tripomastigotas	LLC-MK2	I.S.
	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
EHP-2	$33,70 \pm 5,00$	$49,3 \pm 1,59$	1,46
Art-C	$28,70 \pm 1,62$	$12,8 \pm 1,62$	0,44
Bacarina	$> 100 \pm > 10$	$> 100 \pm > 100$	0,05
Benzonidazol	$0,39 \pm 0,06$	> 26	$> 67,6$

Em um trabalho desenvolvido por Salomão e colaboradores (2007), o CI_{50} dos extratos etanólicos de própolis verde obtidos frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* variaram entre 200 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando uma menor atividade quando comparado com o CI_{50} do extrato *n*-hexânico apresentado neste trabalho. Análises estatísticas presentes na literatura demonstraram que o perfil de atividade contra formas infectivas do parasito está correlacionado com o teor do biomarcador Artepillin C nos extratos (SALOMÃO et al., 2007). Salomão e colaboradores (2011) avaliaram a toxicidade do extrato etanólico de própolis verde frente às formas proliferativas de *T. cruzi* (epimastigotas), com CI_{50} de 149,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após o quarto dia de tratamento. Comparando com o resultado apresentado neste trabalho para o extrato *n*-hexânico pode-se inferir que a atividade tripanocida da própolis verde pode estar mais associada às formas infectivas do parasito (formas tripomastigotas).

Entre os componentes isolados, a Bacarina não demonstrou atividade frente ao parasito e seu índice de seletividade (I.S. de 0,05) nos indica que este derivado também apresenta toxicidade frente à célula hospedeira. Já o Artepillin C apresentou mais seletividade com relação à célula hospedeira (I.S. de 0,44), sendo menos seletivo que o extrato *n*-hexânico de própolis. Os resultados de CI_{50} apresentados foram maiores para controle positivo (benzonidazol), indicando então que os componentes testados são menos ativos contra o parasito que o fármaco de referência. A diferença na atividade biológica entre os dois

derivados prenilados testados pode estar associado à presença de uma hidroxila livre no anel aromático do Artepillin C, uma vez que a presença da unidade diidrocinaoila na Bacarina pode ter causado uma diminuição drástica na sua atividade biológica.

Marcucci e colaboradores (2001) avaliaram a atividade tóxica de derivados prenilados da própolis verde frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e demonstraram que o perfil de atividade depende da presença de pelo menos uma unidade prenila no anel aromático. Entre os derivados testados, a Drupanina (uma unidade prenila) e o Artepillin C (duas unidades prenila) apresentaram atividade biológica semelhante, onde o CI_{50} obtido foi de 73,3 e 77,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. O CI_{50} para os extratos metanólicos e etanólicos de própolis verde foram maiores (109,8 e 264,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) que o resultado apresentado neste trabalho para o extrato *n*-hexânico, indicando que possuem menor atividade biológica.

6. CONCLUSÕES

De acordo com a polaridade do solvente extrator o rendimento bruto dos extratos de própolis verde variou, sendo que os extratos etanólicos apresentaram maiores rendimentos (61,09 a 61,98%) que os respectivos extratos *n*-hexânicos (7,50 a 22,47%).

As curvas obtidas na região do UV-vis para os extratos de própolis verde (*n*-hexânicos e etanólico) apresentaram perfil de absorção semelhante, com um máximo na região entre 220 e 310 nm, indicativo da presença de substância fenólicas. A intensidade de absorção dos extratos etanólicos foi maior que a dos extratos *n*-hexânicos, o que pode ser explicado pela capacidade que o etanol possui em extrair seletivamente substâncias fenólicas mais polares.

O teor de fenólicos e flavonoides totais variou pouco entre os extratos preparados com o mesmo solvente. Porém, os extratos etanólicos apresentaram em média os maiores valores de fenólicos e flavonoides totais (11,92 mg E_{AG} por 100 mg de extrato e 15,95 mg E_Q por 100 mg de extrato), e por consequência apresentaram maior capacidade antioxidante para os três métodos de avaliação (189,14 mmol E_{Trolox} por 100 mg de extrato, 623,90 mmol E_{Fe(II)} por 100 mg de extrato e CE₅₀ de 18,62 µg.mL⁻¹). A partir da determinação do CE₅₀ do Artepilin C, bacarina, cromeno e drupamina foi possível observar a influência dos grupos prenil e a importância da hidroxila livre na capacidade antioxidante dessas três substâncias e, com isso, auxiliar no entendimento da baixa capacidade antioxidante dos extratos *n*-hexânicos brutos.

Através da análise por CLAE-DAD foi possível determinar o perfil químico dos extratos de própolis verde. Observou-se uma forte influência do solvente extrator no perfil qualitativo e quantitativo de substâncias extraídas, sendo possível constatar que os extratos *n*-hexânicos se mostraram mais viáveis para o isolamento das três substâncias preniladas: Artepillin C, Bacarina e o Ácido 2',2'-dimetilcromeno-3-prenil propenoico (cromeno). O método desenvolvido em equipamento analítico foi transposto para o modo semipreparativo, proporcionando metodologia rápida para a obtenção das três substâncias, que depois de identificados e caracterizados foram usados como padrões para controle qualitativo e quantitativo do extrato de própolis verde.

Através da análise por CLAE-DAD com fase reversa foi possível observar maiores teores de bacarina e Artepilin no extrato *n*-hexânico, não havendo variação significativa para o teor de Artepillin C entre os dois tipos de extrato (EEP e EHP), mas sendo observado para Bacarina. A Drupamina só foi identificada nos extratos etanólicos, e o Cromeno foi observado nos dois tipos de extratos, porém em baixas concentrações.

O extrato hexânico de própolis verde, assim como o Artepillin C e Bacarina apresentaram baixa atividade tóxica contra as formas infectivas de *T. cruzi* (formas tripomastigotas) quando comparados com o controle (benzodiazol). O extrato hexânico testado (EHP-2) apresentou o maior índice de seletividade, indicando que pode haver um efeito sinérgico das substâncias no extrato, e, portanto, mais ativos contra o parasito nas células do que as substâncias isoladas. A Bacarina apresentou o maior CI_{50} e o menor índice de seletividade, demonstrando toxicidade para as células não infectadas, e isso pode estar relacionado a ausência da hidroxila fenólica em sua estrutura.

Os resultados presentes neste trabalho contribuem significativamente para os estudos envolvendo a obtenção e a caracterização de substâncias bioativas da própolis verde. O Artepillin C apesar de ter apresentado moderada atividade antiparasitária, pode ser considerado um protótipo para o planejamento de novas moléculas com atividade contra *T. cruzi*.

7. REFERÊNCIAS

- ADELMAN, J.; PASSOS, M.; BREYER, D.H.; SANTOS, M.H.R.; LENZ, C.; LEITE, N.F.; LANÇAS, F.M.; FONTANA, J.D. Exotic flora dependence of na unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. (43), p. 174-178, 2007.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 58 (6), p. 945-946, 1994.
- AGUIAR, A.P.; DEANS, A.R.; ENGEL, M.S.; FORSHAGE, M.; HUBER, J.T.; JENNINGS, J.T.; JOHNSON, N.F.; LELEJ, A.S.; LONGINO, J.T.; LOHRMANN, V. MIKÓ, I.; OHL, M.; RASMUSSEN, C.; TAEGER, A.; YU, D.S.K. Order Hymenoptera. **Zootaxa 3703**. v. 1, p. 51-62, 2013.
- AGUIAR, C.G.; LIMA, L.G.; ATHAYDE, L.A. Efeito antimicrobiano da própolis verde frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**. v. 1 (1), p. 14-18, 2014.
- AGRAWAL, A.D. Pharmacological activities of flavonoids: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**. v. 4 (2), p. 1394-1398, 2011.
- AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivates from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 26 (7), p. 1057-1059, 2003.
- ALBUQUERQUE, I.L.; ALVES, L.A.; LEMOS, T.L.G.; DORNELES, C.A.; MORAIS, M.O. Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 20 (5), p. 414-415, 2008.
- ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**. v. 35, p. 909-915, 2005.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 278-283, 2007.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUIZMÁN, J.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**. v. 35 (4), p. 909-915, 2005.

ALVES, R.T.; REGASINI, O.R.; FUNARI, C.S.; YOUNG, M.C.M.; RIMOLDI, A.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA ROSA, J.A. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22 (3), 258-233, 2011.

ANDRADE, J.K.S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C.S.; NUNES, M.L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. v. 101, p. 129-138, 2017.

ARGOLO, A.M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. Doença de chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2008.

ASCHER, J.S.; PICKERING, K. Discover life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila), 2012.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 181-189, 2008.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. **Chemistry Central Journal**. v. 8 (28), 01-08, 2014.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM**. v. 2 (1), p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**. v. 100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; KRASTEVA-BOUDOUROVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA-MAIMONI, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift Für Naturforschung**. v. 50, p. 401-405, 1999.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J.; FUNARI, S.C. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. **Journal of Essential Oil Research**. v. 10, p. 693-696, 1998.

BANKOVA, V.; BERTELLI, D.; BORBA, R.; CONTI, B.J.; CUNHA, I.B.S.; DANERT, C.; EBERLIN, M.N.; FALCÃO, S.I.; ILSA, M.I.; MORENO, M.I.N.; PAPOTTI, G.; POPOVA, M.; SANTIAGO, K.B.; SALAS, A.; SAWAYA, A.C.H.F.; SCHWAB, N.V.; SFORCIN, J.M.; SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M.; TRUSHEVA, B.; VILAS-BOAS, M.; WILSON, M.; ZAMPINI, C. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**. v. 56, 2016.

BARTWAL, A.; MALL, R.; LOHANI, P.; GURU, S.K.; ARORA, S. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 32, p. 216-232, 2013.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**. v. 61 (3), p. 342-350, 2004.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**. v. 61, p. 896-900, 1998.

BASTOS, C.J.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J.P.; DE JESUS, R.S.; FREIRE, M.S.; DE ARAÚJO, E.G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M.F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 4 (6), e711, 2010.

BELFAR, M.L.; LANEZ, T.; REBIAI, A.; GHIABA, Z. Evaluation of antioxidant capacity of propolis collected in various áreas of Algeria using electrochemical techniques. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 10, p. 9641-9651, 2015.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**. v. 373 (5), p. 456-466, 2015.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M.J.; MONTGOMERY, S.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical Microbiology**. v. 24, p. 655-681, 2011.

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

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**. v. 79, p. 17-36-1745, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 03, 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. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF. 2001.

BÚFALO, M.C.; FIGUEIREDO, A.L.; DE SOUSA, J.P.B.; CANDEIRAS, J.M.G.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real time PCR. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, p. 1669-1680, 2009.

CAMPOS, V.A.C.; JÚNIOR, H.M.S.; OLIVEIRA, D.F.; DE CARVALHO, H.W.P.; MACHADO, A.R.T.; TIRELLI, A.A. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35 (6), p. 1043-1049, 2011.

CARDENAS-SÁNCHEZ, J.D.; MAZARIEGO-ARANA, M.A.; UTRILLA-PASCACIO, F.J.; MONTEÓN-PADILLA, V.M. ALTÚZAR-GONZÁLEZ, M. Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en pacientes con cardiomiopatía dilatada. **Rev. Med. Mex.** v. 41, p. 111-114, 2003.

CARDOSO, J.G.; LOIRO, N.L.P.; RODRIGUES, L.F.; COURI, M.L.B.; FARAH, A.; MAIA, C.L.; 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.** v. 65, p. 77-81, 2016.

CARDOSO, V.D.; MOKOCHINSKI, J.B.; SCHNEIDER, C.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, I.K.; FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R. Variabilidade química da geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química.** v. 7 (6), p. 2457-2474, 2015.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. IKEGAKI, M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 48 (3), p. 557-564, 2012.

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J.; JÚNIOR, A.W.; BUSSO, C.; WOUK, J.; IURCKEVICZ, G.; MONTANHER, P.F.; YAMASHITA, F.; MALAFATTI, C.R.M. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: *In vitro* antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products.** v. 125, p. 207-219, 2018.

CASTRO, D.P.; SEABRA, S.H.; GARCIA, E.S.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology.** v. 117 (2), p. 201-207, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAN, G.C.F.; CHEUNG, K.W.; SZE, D.M.Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology.** v. 44 (3), p. 262-273, 2013.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and CG-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18 (4), p. 549-556, 2008.

CHEUNG, K.W.; SZE, D.M.Y.; CHAN, W.K.; DENG, R.X.; TU, W.; CHAN, G.C.F. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 138, p. 463-471, 2011.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. p. 01-20, 2013.

COELHO, J.; FALCÃO, S.I.; VALE, N.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; VILAS-BOAS, M. Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and South Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**. v. 56 (1), p. 21-31, 2017.

COSTA, J.; PETERSON, T. Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts and etiologic agentes of Chagas disease. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**. Capítulo 7, p. 59-70, 2012.

COSTA, P.; ALMEIDA, M.O.; LEMOS, M.; ARRUDA, C.; CASOTI, R.; SOMENSI, L.B.; BOEING, T.; MARIOTT, M.; DA SILVA, R.C.M.V.A.F.; STEIN, B.D.P.; DE SOUZA, P.; DOS SANTOS, A.C.; BASTOS, J.K.; DA SILVA, L.M.; DE ANDRADE, S.F. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 229, p. 82-89, 2018.

COTTICA, S.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; FRANCO, S.L.; ZEOULA, L.M.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22 (5), p. 929-935, 2011.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L.; A critical review on Chagas' disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 03-24, 2002.

CUNHA, L.C.; ALVES, L.D.S.; SANTANA, L.C.L.R.; NUNES, G.B.L.; NETO, P.J.R. A própolis no combate a tripanosomatídeos de importância médica: Uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40 (2), p. 105-124, 2011.

DA SILVA CUNHA, I.B.; SALOMÃO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V.S.; CUSTÓDIO, A.R.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 52 (5), p. 602-604, 2004.

DA SILVA FILHO, A.A.; RESENDE, D.O.; FUKUI, M.J.; SANTOS, F.F.; PAULETTI, P.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.I.A.; GREGÓRIO, L.E.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARA, N.P.D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Fitoterapia**. v. 80, p. 478-482, 2009.

DE BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; LEITE, M.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolics acids found in Brazilian green propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 372-377, 2008.

DE GARA, L.; LOCATO, V.; DIPIERRO, S.; DE PINTO, M.C. Redox homeostasis in plants: The challenge of living with endogenous oxygen production. **Respiratory, Physiology and Neurobiology**. v. 173, p. 13-19, 2010.

DE MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100 (7), p. 783-787, 2005.

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

DE MOURA, S.A.L.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; LIMA, L.D.C.; DOURADO, L.P.A.; MENDES, J.B.; ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A.N.D.; CARA, D.C. Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing

by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.748283. 2011^a.

DE MOURA, S.A.L.; FERREIRA, M.A.N.D.; ANDRADE, S.P.; REIS, M.L.C.; NOVIELLO, M.L.; CARA, D.C. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.182703. 2011^b.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – a review. **Current Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 1672-1703, 2011.

DE SOUSA, L.I.O.; BEZZERA-SILVA, P.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; DA SILVA, A.G.; CORREIA, M.T.S.; DA SILVA, M.V.; DE FIGUEIREDO, R.C.B.Q. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 96, p. 1055-1064, 2017.

DE SOUSA, W.; DE CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**. 295394, 2010.

DOMINGOS, A.T.S.; NÓBREGA, M.M.; SILVA, R.A. Biologia das abelhas *Apis mellifera*: Uma revisão bibliográfica. **Acta Apícola Brasileira**. v. 4 (2), p. 08-12, 2016.

DOS SANTOS, A.P.; PEREIRA, A.F.M.; TRUGO, L.C.; NETO, F.R.A. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolics compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift Für Naturforschung**. v. 58, p. 590-593, 2003.

DOTA, K.F.D.; CONSOLARO, M.E.L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BRUSCHI, M.L. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2011.

FÁVARO, L.S.; MANZANO, M.I.; GONÇALVES, J.E. Análise química de própolis e extrato de própolis visando a produção de enxaguantes bucais. **Anais Eletrônico – IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar**. v. 9, p. 04-08, 2015.

FERRACINI, V.L.; PARAIBA, L.C.; LEITÃO FILHO, H.F.; DA SILVA, A.G.; NASCIMENTO, L.R.; MARASAIOLI, A.J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**. v. 7, p. 355-367, 1995.

FERREIRA, J.M.; FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, p. 3552-3558, 2017.

FIGUEIREDO, S.M.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A.; ALMEIDA, B.M.; ABREU, S.R.L.; ABREU, J.A.S.; FILHO, S.A.V.; BINDA, N.S.; CALIGIORNE, R.B. Immunomodulatory properties of green propolis. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery**. v. 8, p. 85-94, 2014.

FIGUEIREDO, F.J.B.; DIAS-SOUZA, M.V.; NASCIMENTO, E.A.; DE LIMA, L.R.P. Phisicochemical characterization and flavonoid contentes of artesanal Brazilian green propolis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 7 (3), p. 64-68, 2015.

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

FISCHER, G.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M.C.; SIEDLER, B.; MUNHOZ, L.S.; FINGER, P.F.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T.; ROEHE, P.M. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellulaar responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. v. 105 (7), p. 908-913, 2010.

FREITAS, M.O.; PONTE, F.A.F.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 19, p. 532-535, 2008.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Micological Research**. v. 112, p. 231-240, 2008.

GALAVIZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, D.P.; FONZÁLEZ-SANTOS, M.A.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.; GONZÁLEZ-GALAVIZ, J.R.; ROSALES-ENCINA, J.L.; MOLINA-GARZA, Z.J. Update on seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donos in northeast Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, p. 404-406, 2009.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALES, M.S.; AZAMBUJA, O. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**. v. 53 (1), p. 11-21, 2007.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. Evolution of the insects (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2005).

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venitian propolis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 76-82, 2010.

GASCÓN, J.; ALBAJAR, P.; CAÑAS, E.; FLORES, M.; PRATE, J.G.; HERRERAF, R.N.; LAFUENTEG, C.A.; LUCIARDIF, H.L.; MONCAYOH, A.; MOLINAI, L.; MUÑOZA, J.; PUENTEJ, S.; SANZK, G.; TREVIÑO, B.; SERGIO-SALLES, X. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. **Revista Española Cardiología**. v. 60, p. 285-293, 2007.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**. v. 86, p. 345-391, 2012.

GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, p. 29-32, 2003.

GUZMAN, J.D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**. v. 19, p. 19292-19349, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 32 (3), p. 125-130, 2011.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parent compounds: A review. **Food Chemistry**. v. 173, p. 501-513, 2015.

HISANORI, H.; OKUDA, K.; MURASE, T.; SHIGETSURA, Y.; NARISE, K.; SEMENZA, G.L.; NAGASAWA, H. Isolation, identification and biological evaluation of HIF-1-

modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 5392-5401, 2011.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.Q.; HU, F. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**. v. 19, p. 19610-19632, 2014.

ICHIKAWA, H.; SATOH, K.; TOBE, T.; YASUDA, I.; USHIO, F.; MATSUMOTO, K.; ENDO, K.; OOJUBO, C. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**. v. 7 (5), p. 347-350, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Boletim: Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 44, 2016.

IOSHIDA, M.D.M.; YOUNG, M.C.M.; LAGO, J.H.G. Chemical composition and antigungal activity of essential oil from Brazilian propolis. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 13 (5), p. 633-637, 2010.

JUG, M.; KONICIC, M.Z.; KOSALEC, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of polpar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT – Food Science and Technology**. v. 57, p. 530-537, 2014.

KAKINO, M.; IZUTA, H.; TSURUMA, K.; ARAKI, Y.; SHIMAZAWA, M.; ICHIHARA, K.; HARA, H. Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 192 (12), p. 01-08, 2012.

KIRCHHOFF, L.V.; PAREDES, P.; LOMELÍ-GUERRERO.; PAREDES-ESPINOZA, M.; RON-GUERRERO, C.S.; DELGADO-MEJÍA, M.; PEÑA-MUÑOZ, J.G.; Transfusion-associated Chagas disease (American tripanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. **Transfusion**. v. 46, p. 298-304, 2006.

KLEIN, A.M.; VAISSIÉRE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEM, C.; TSCHAMTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 274, p. 303-313, 2007.

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIDA, M.; YOSHIOKA, E. Absorption and bioavailability of Artepillin C in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 9928-9933, 2005.

KLOPELL, F.C.; LEMOS, M.; SOUSA, J.P. COMUNELLO, E.; MAISTRO, E.L.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 62 (8), p. 537-542, 2007.

KOCOT, J.; KIELCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 7074209. 2018.

KREBS, C.J. Ecology. Benjamin Cummings Press, 5^a edição, 695 p. 2001.

KRELL, R. Value-added products from beekeeping. **FAO Agricultural Services Bulletin 124. Food and Agriculture Organization**. Roma, 1996.

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

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**. 162750, 2013.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, p. 740-742, 2003.

KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M.; STOJKO, J.; SOSADA, M.; SWIERCZEK-ZIEBA, G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**. v. 19, p. 078-101, 2014.

LAGE, T.C.A.; MONTANARI, M.; FERNANDES, S.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SERNA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R.S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its

constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**. v. 148, p. 24-29, 2015.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**. p. 23-67, 2006.

LEONHARDT, S.D.; ZEILHOFER, S.; BLÜTHGEN, N.; SCHMITT, T. Stingless bees use terpenes as olfactory cues to find resin sources. **Chemical Senses**. v. 35, 603-611, 2010.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria. v. 13 (1), p. 111-124, 2012.

LOPEZ, B.G-C.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**. v. 146, p. 174-180, 2014.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**. v. 763, p. 01-10, 2013.

LORENZON, M.C.A.; CASTRO, R.N.; PIRES, L.O.; KOSHIYAMA, A.S.; BENTO, K.J.B. Biological values of different types of Brazilian propolis. v. 8 (5), p. 90-99, 2018.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 447-454, 2008.

MACHADO, J.L.; ASSUNÇÃO, A.K.M.; DA SILVA, M.C.P.; DOS REIS, A.S.; COSTA, G.C.; ARRUDA, D.S.; ROCHA, B.A.; VAZ, M.M.O.L.L.; PAES, A.M.A.; GUERRA, R.N.M.; BERRETTA, A.A.; DO NASCIMENTO, F.R.F. Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by its immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 157662. 2012.

MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 56, p. 296-301, 2002.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74, p. 105-112, 2001.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28 (1), p. 178-181, 2008.

MARUYAMA, H.; SUMTTOU, Y.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; HARA, H. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 32 (7), p. 1244-1250, 2009.

MASSIGNANI, J.J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**. v. 23, p. 1355-1360, 2009.

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

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

MISHIMA, S.; ONO, Y.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 28 (6), p. 105-1030, 2005.

MISTCHER, L.A.; LEMEKE, T.L.; GENTRY, E.J. Foye's principles of medicinal Chemistry. 6ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2012.

MOLINA-GARZA, Z.J.; BAZALDÚA-RODRÍGUEZ, A.F.; QUINTANILLA-LICEA, R.; GALAVIZ-SILVA, L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Tropica**. v. 136, p. 14-18, 2014.

MONROY, Y.M.; RODRIGUES, R.A.F.; RODRIGUES, M.V.N.; SANT'ANA, A.S.; SILVA, B.S.; CABRAL, F.A. Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 130, p. 189-197, 2017.

NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D.C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18 (3), p. 379-386, 2008.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; FELICE, M.D.; SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47 (4), p. 1453-1459, 1999.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, V.E.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 418-425, 2001.

NEGRI, G.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A. 'Green propolis': unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**. v. 42 (3), p. 39-41, 2003.

NETO, M.A.B.M.; LIMA, I.M.D.; FURTADO, R.A.; BASTOS, J.K.; DA SILVA FILHO, A.A.; TAVARES, D.C. Antigenotoxicity of artemisinin C *in vivo* evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**. v. 31, p. 714-719, 2011.

NGATU, N.R.; SARUTA, T.; HIROTA, R.; EITOKU, M.; MUZEMBO, B.A.; MATSUI, T.; NANGANA, L.S.; MBENZA, M.A.; KUMAGAI, N.; SUGANUMA, N. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tinea capitis* and *Tinea versicolor*. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 3, p. 281-287, 2011.

NOBUSHI, Y.; OIKAWA, N.; OKAZAKI, Y.; TSUTSUMI, S.; PARK, Y.K.; KUROKAWA, M.; YASKUAWA, K.; Determination of Artemisinin-C in Brazilian propolis by

HPLC with photodiode array detector. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**. v. 2, p. 127-131, 2012.

NUNES, C.A.; GUERREIRO M. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace CG/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, p. 433-438, 2017.

OLDONI, T.L.C. **Dissertação de Mestrado**. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Piracicaba – SP. Universidade de São Paulo, 2007.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; d'ACRE, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoides and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**. v. 77, p. 208-213, 2011.

OLIVEIRA, M.L.; CUNHA, J.A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazônica**. v. 35 (3), p. 389-394, 2005.

OLIVEIRA, A.P.; FRANÇA, H.S.; KUSTER, R.M.; TEIXEIRA, L.A.; ROCHA, L.M. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 16 (1), p. 121-130, 2010.

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.

PAULINO, N.; ABREU, S.R.L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V.M.; VOLLMAR, A.M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**. v. 587, p. 296-301, 2008.

PAVIANI, L.; SACODA, P.; SAITO, E.; CABRAL, F. Extraction techniques of red and green propolis: Extraction yield of phenolic compounds. **11th International Congress on Engineering and Food, Greece**. Maio, 2011.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 1100-1103, 2002.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, Schistosomicidal and Antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**. v. 7, 993-1001, 2010.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUSMAN, J. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**. v. 35, p. 909-915, 2005.

PAZIN, W.M.; MÔNACO, L.M.; SOARES, A.E.E.; MIGUEL, F.G.; BERRETTA, A.A.; ITO, A.S. Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. **Journal of Apicultural Research**. v. 56 (1), p. 40-49, 2017.

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 (2), p. 321-326, 2002.

PEREIRA, A.S.; NASCIMENTO, E.A.; AQUINO NETO, F.R. Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**. v. 57 (8), p. 721-726, 2002.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. Organização social e desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera*. **EMBRAPA**, 2003.

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 Semiárido**. v. 11 (2), p. 01-21, 2015.

PEREIRA, R.M.; GRECO, G.M.Z.; MOREIRA, A.M.; CHAGAS, P.F.; CALDAS, I.S.; GONÇALVES R.V.; NOVAES, R.D. Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: A systematic review of preclinical in vivo evidence. **Parasitology**. v. 144 (10), p. 1275-1287, 2017.

PETERS, R.S.; KROGMANN, L.; MAYER, C.; DONATH, A.; GUNKEL, S.; MUSEMANN, K.; KOZLOV, A.; PODSIADLOWSKI, L.; PETERSEN, M.; LANFEAR, R.; DIEZ, P.A.; HERATY, J.; KJER, K.M.; KLOPFSTEIN, S.; MEIER, R.; POLIDORI, C.; SCHMITT, T.; LIU, S.; ZHOU, X.; WAPPLER, T.; RUST, J.; MISOF, B.; NIEHUIS, O. Evolutionary history of the Hymenoptera. **Current Biology**. v. 27, p. 1013-1018, 2017.

PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomrfvine**. v. 9, p. 422-426, 2002.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**. v. 31, p. 648-652, 2011.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; NAYDENSKY, Ch.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**. v. 50, p. 09-14, 2004.

PROUSEK, J. Fenton chemistry in biology and medicine. **Pure and Applied Chemistry**. v. 79, p. 2325-2338, 2007.

PRYTZYK, E.; DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A.S.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; AQUINO NETO, F.R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 88, p. 189-193, 2003.

QUEIROGA, L.C.; BASTOS, J.K.; DE SOUSA, J.P.B.; DE MAGALHÃES P.M. Comparison of the chemical composition of the essential oil and the water soluble oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**. v. 20, p. 111-114, 2008.

RATCLIFFE, N.A.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; BUTT, T.M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and process: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 41, p. 747-769, 2011.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation and Allergy**. v. 8, p. 229-235, 2009.

REITHINGER, R.; TARLETON, R.L.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. Eliminating Chagas' disease: challenges and a roadmap. **BMJ**. v. 338, p. 1283, 2011.

RESENDE, F.A.; MUNARI, C.C.; NETO, M.A.B.M.; TAVARES, D.C.; BASTOS, J.K.; FILGO, A.A.S.; VARANDA, E.A. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**. v. 17, p. 2335-2350, 2012.

RIGHI, A.A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eith brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ID 267878, 2013.

ROLEIRA, F.M.F.; SILVA, E.J.T.; VARELA, C.L.; COSTA, S.C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**. v. 183, p. 235-258, 2015.

ROMAGNOLO, D.F.; SELMIN, O.L. Flavonoids and câncer prevention: A review of the evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**. v. 31 (3), p. 206-238, 2012.

RUFATTO, L.C.; SANTOS, D.A.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J.A.P.; ELY, M.R.; MOURA, S.; Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 7 (7), p. 591-598, 2017.

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

SALATINO, A.; TEICEIRA E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary Aternative Medicine**. v. 02, p. 33-38, 2005.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ. K.A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 2571-2598, 2006.

SALGUEIRO, F.B.; LIRA, A.F.; RUMJANEK, V.M.; CASTRO, R.N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. **Química Nova**. p. 01-06, 2014.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**. p. 01-08, 2016.

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.

SALOMÃO, K.; DE SOUZA, E.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Brazilian green propolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 185918, 2011.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; CASTRO, S.L. Brazilian green prpolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2011.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; MAIA, A.B.R.A. et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research** v. 17, p. 285-289, 2003.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic contries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 75-85, 2007.

SEBRAE. Boletim: Agronegócios: produção de própolis. Bahia, 2017.

SEBRAE. Boletim: O mercado da própolis. Brasil, 2014.

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

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 424, p. 181-188, 2004.

SILVA, R.P.D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; CARVALHO, A.A; PADILHA, F.F.; BARBOSA, J.D.V.; UMSZA-GUEZ, M.A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**. v. 12 (3), p. 01-18, 2017.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ID 206439, 2015.

SIMÕES-AMBROSIO, LM.C.; GREGÓRIO, L.E.; SOUZA, J.P.B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**. v. 81, p. 1102-1108, 2010.

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, p. 59-65, 2004.

SIMPSON, A.G.B.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The Evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**. v. 22 (4), p. 168-174, 2006.

SINGH, R. Chemotaxonomy: A tool for plant classification. **Journal of Medicinal Plants Studies**. v. 4 (2), p. 90-93, 2016.

SINGH, R.; GEETANJALI. Chapter 6 – Chemotaxonomy of medicinal plants: Possibilities and limitations. **Natural Products and Drug Discovery**. p. 119-136, 2018.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, p. 71-81, 2002.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 749-767, 2012.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**. v. 41, p. 753-758, 2007.

SUETH-SANTIAGO, V.; MORAES, J.B.B.; ALVES, E.S.S.; VANNIER-SANTOS, M.A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MAGALHÃES, L.G.; ANDRICOPULO, A.D.; SANT'ANNA, C.M.R.; DECOTÉ-RICARDO, D.; DE LIMA, M.E.F. The effectiveness of natural diarylheptanoids against *Trypanosoma cruzi*: Cytotoxicity, ultrastructural alterations and molecular modeling studies. **PLoS One**. v. 11 (9), p. 01-20, 2016.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**. p. 05-27, 2011.

SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**. v. 129, p. 739-744, 2004.

SZLISZKA, E.; ZENON, P.A.M.; KRÓL, W. Inhibition of inflammatory response by Artepillin C in activated RAW264.7 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 735176, 11, 2013.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A.Z.; SKÓL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KRÓL, W. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KROL, W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**. v. 38, p.941-953, 2011.

TAURA, H; LAROCA, S. Biologia da polinização: Interações entre as abelhas (Hym., Apoidea) e as flores da *Vassobia breviflora* (Solonacea). **Acta Biológica Paranaense**. v. 33, p. 143-162, 2004.

TAVARES, L.C.; DE LEMOS, T.L.G.; ARRIAGA, A.M.C. SANTIAGO, G.M.P.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de passa quatro, Minas Gerais, Brasil. **Química Nova**. v. 33 (10), p. 2051-2054, 2010.

TEIXEIRA, É.W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R.M.S.A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis: Importância e perspectivas. **Boletim de Indústria Animal**. v. 60 (1), p. 83-106, 2003.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2 (1), p. 85-92, 2005.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; Bauer-7-en-3 β -yl-acetate: A major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**. v. 29, p. 245-247, 2006.

THEODOROU, V.; ALAHIANNIS, M.; NTEMOU, N.; BRENTAS, A.; VOULGARI, P.; POLYCHONIDOU, V.; GOGOU, M.; GIANNELOS, M.; SKOBRIDIS, K. Mild alkaline hydrolysis of hindered esters in non-aqueous solution. **The Free Internet Journal for Organic Chemistry**. 2018.

TORETI, V.C.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Recent progress of propolis for its biological and chemical composition and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ID 697390, 2013.

TOMAZZOLI, M.M.; NETO, R.D.P.; MORESCO, R.; WESTPHAL, L.; ZEGGIO, A.R.S.; SPECHT, L.; COSTA, C.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M. Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-vis scanning data. **Journal of Integrative Bioinformatics**. v. 12 (4), p. 279-291, 2015.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**. v. 4, 147-157, 2006.

URUSHISAKI, T.; TAKEMURA, T.; TAZAWA, S.; FUKUOKA, M.; HOSOKAWA-MUTO, J.; ARAKI, Y.; KUWATA, K. Caffeoylquinic acids are major constituents with potente anti-influenza effects in Brazilian green propolis waater extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2011.

UTO, Y.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First Total Synthesis of Artepillin C established by o,o'-diprenylation of p-halophenols in water. **Journal of Organic Chemistry**. v. 67, p. 2355-1257, 2002.

VAN DEN ENDE, W.; PESHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**. v. 22, p. 689-697, 2011.

VEIGA, R.S.; MENDONÇA, S.; MENDES, P.B.; PAULINO, N.; MIMICA, M.J.; LAGAREIRO-NETO, A.A.; LIRA, I.S.; LÓPEZ, B.C-G.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M.C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidante activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122 (4), p. 911-920, 2017.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**. v. 3 (1), p. 02-20, 2010.

WEINSTOCK, G.M. et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**. v. 44 (26), p. 931-949, 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from na ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. v. 64, p. 03-19, 2003.

WINKEL, B.S.J. The biosynthesis of flavonoids. In: GROTWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. The Ohio State University: Columbus, Ohio, USA. Cap. 3, p. 71-75, 2006.

WILSON, E.O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Stated of America**. v. 102 (38), p. 13367-13371, 2005.

WOLFF, L.F. Apicultura sustentável na propriedade familiar de base ecológica. **Circular Técnica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2007.

YANOVIK, S.P.; KASPARI, M.; DUDLEY, R. Gliding hexapods and the origins of insect aerial behavior. **Biology Letters**. v. 5, p. 510-512, 2009.

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, p. 562-570, 2015.

ZHANG, C.; SHEN, X.; CHEN, J.; JIANG, X.; HU, F. Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. **Journal of Food Science**. v. 82 (2), p. 1602-1607, 2017.

ZHANG, J.; SHEN, X.; WANG, K.; CAO, X.; ZHANG, C.; ZHENG, H.; HU, F. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, p. 2220-2235, 2016.