



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos



GABRIELE DE ABREU BARRETO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA PRÉ-
TRATADOS COM ULTRASSOM**

SALVADOR

2018

GABRIELE DE ABREU BARRETO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA PRÉ-
TRATADOS COM ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcelo Andrés Umsza Guez

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Aparecida Souza Machado

SALVADOR

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Barreto, Gabriele de Abreu
Obtenção e Caracterização de Extratos de Própolis Vermelha Pré-Tratados com Ultrassom / Gabriele de Abreu Barreto. -- Salvador, 2018.
89 f. : il

Orientadora: Prof^o Dr^o Marcelo Andrés Umsza Guez.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Bruna Aparecida Souza Machado. Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2018.

1. Própolis brasileira. 2. Extração de biocompostos.
3. Otimização de processo. I. Guez, Marcelo Andrés Umsza. II. Machado, Bruna Aparecida Souza. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIELE DE ABREU BARRETO

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA PRÉ-TRATADOS COM ULTRASSOM

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 29 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Drª. Josiane Dantas Viana
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

Dr. Ricardo Wagner Dias Portela
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, força, perseverança, saúde e sabedoria, por guiar meu caminho sempre pelo lado da Luz rumo aos meus objetivos.

A minha família, em especial aos meus pais por todo apoio e base necessária, obrigada Mãe por todo conselho e palavras de motivação.

Ao meu Orientador, Prof^o Dr^o Marcelo Umsza, pelo incentivo apoio, paciência, dedicação e confiança e a minha coorientadora, Prof^a Dr^a Bruna Machado pela confiança depositada desde o início da minha carreira científica, obrigada por cada ensinamento compartilhado, oportunidade dada e incentivo para este novo passo da minha vida.

A UFBA e ao PGALI pela oportunidade e estrutura disponibilizada.

Aos professores do PGALI, em especial a Prof^a Dr^a Itaciara Nunes por suas aulas excepcionais, obrigada por cada orientação e atenção.

Ao SENAI pela disponibilidade da sua estrutura.

A equipe do SENAI CIMATEC e SENAI Dendezeiros por toda ajuda técnica e companheirismo, em especial à Ingrid Lessa, Jamile Cerqueira (Jam), Jéssica Santos obrigada pelo empenho e dedicação sem igual.

A Milena Sousa, Roseane Oliveira, Rejane Pina, Verônica Silva, Camila Duarte, Rita Souza (Ritinha), e Ana Carolina Souza (Carol) pelas palavras amigas, incentivo e participação desde o início.

A Carol e Jam, obrigada pelo apoio nos momentos de choro, ansiedade e pelos momentos de descontração. Agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos!

A FAPESB pela concessão da bolsa.

“Nunca recuem. Nunca se esgotem. Nunca se desesperem.”
Sir Winston Churchill

RESUMO

Distintas pesquisas investigam compostos bioativos advindos de fontes naturais e seus produtos que possam ter aplicabilidade versátil, como por exemplo, a própolis, em setores industriais como de cosméticos, de alimentos e farmacêutico devido a ampla variedade de compostos identificados com efeitos benéficos à saúde. Neste estudo, avaliou-se a influência da aplicação da tecnologia de ultrassom na liberação de compostos bioativos presente na própolis vermelha brasileira originária do Estado de Alagoas. Os extratos foram obtidos em diferentes condições de processos com e sem pré-tratamento por ultrassom e avaliados quanto à quantificação fitoquímica, capacidade antioxidante por DPPH, quantificação dos biomarcadores por HPLC-DAD, atividade antimicrobiana através de microdiluição em placa de 96 poços utilizando as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 1775 e atividade citotóxica frente a cinco linhagens tumorais (HCT-116 (carcinoma de cólon), HL-60 (leucêmica), PC3 (carcinoma de próstata), SF295 (glioblastoma), SNB19 (glioblastoma)) pelo método MTT. Os resultados demonstraram que a tecnologia de ultrassom não influenciou na liberação dos compostos fenólicos, porém, o oposto foi observado para a liberação dos flavonoides que constituem própolis vermelha, influenciando na atividade antioxidante exercida pelos extratos. A análise dos constituintes químicos permitiu quantificar os compostos formonometina e kaempferol, sendo a formonometina o constituinte majoritário nos extratos e biomarcador da própolis vermelha brasileira. Os resultados dos ensaios microbiológicos demonstraram que todos os extratos desempenharam atividade inibitória para as cepas Gram positiva e negativa. A alta atividade biológica dos extratos foi evidenciada nos ensaios citotóxicos in vitro; oito das dez amostras apresentaram potencial citotóxico acima de 75% frente as linhagens tumorais. O extrato E:50-20 destacou-se pelo elevado conteúdo de formonometina e kaempferol, efeito antiproliferativo frente as linhagens de células tumorais avaliadas, alta atividade antioxidante e elevada atividade antibacteriana. Os resultados dispostos neste estudo são promissores e permitem reconhecer a qualidade dos extratos de própolis vermelha brasileira, assim como, a influência da tecnologia de ultrassom no processo de extração dos biocompostos presentes na referida matriz.

Palavras-chave: própolis brasileira, extração de biocompostos, otimização de processo.

ABSTRACT

Several studies have investigated the natural sources of biocomposites and their products that may have versatile applicability, such as propolis. Propolis has shown great interest in industrial sectors, such as cosmetics, food and pharmaceuticals, because of the wide variety of compounds identified with potential beneficial effects on health. This study evaluated the influence of the application of ultrasonic technology on the release of matrix compounds, the Brazilian red propolis, from the State of Alagoas. The extracts were obtained by different process conditions using different temperatures and time of exposure pre-treatment ultrasonic, an extract without pre-treatment was obtained as control of this study. The extracts were evaluated for phytochemical quantification, antioxidant capacity by DPPH, quantification of biomarkers by HPLC-DAD, antimicrobial activity by microdilution in a 96-well plate using *Staphylococcus aureus* strains ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 1775 and cytotoxic activity against five tumor lines (HCT-116 (colon carcinoma), HL-60 (leukemic), PC3 (prostate carcinoma), SF295 (glioblastoma), SNB19 (glioblastoma)) by the MTT method. The results showed that the ultrasonic technology did not influence the release of phenolic compounds, however, the opposite result was observed for the release of the flavonoids that constitute the red propolis, influencing the antioxidant activity exerted by the extracts. The analysis of the chemical constituents allowed to quantify the compounds for formononetin and kaempferol, formononetin being the main constituent in extracts and biomarkers of Brazilian red propolis. The results of the microbiological tests showed that all the extracts performed inhibitory activity for Gram positive and negative strains. The high biological activity of the extracts was evidenced in the in vitro cytotoxic assays; eight of the ten samples presented cytotoxic potential above 75% in relation to the tumor lines. The extract E: 50-20 was highlighted by the high content of formononetin and kaempferol, antiproliferative effect against the tumor lines evaluated, high antioxidant activity and high antibacterial activity. The results obtained in this study are promising and allow to recognize the quality of Brazilian red propolis extracts, as well as the influence of ultrasonic technology in the extraction process of the biocomposites present in the matrix.

Keywords: Brazilian propolis, biocomposite extraction, process optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 - Própolis bruta verde (A), marrom (B) e vermelha (C) 21

Figura 2 - *Dalbergia ecastophyllum* em manguezal do Estado de Alagoas (a). Abelha *Apis mellifera* coletando exsudado proveniente do rabo-de-bugio (b). Abelha depositando própolis vermelha na colmeia (c)24

Figura 3 - Processo de cavitação celular..... 28

CAPÍTULO II

Figura 1 - Classes dos Códigos de Classificação Internacional (IPC) mais usuais em patentes com própolis 43

Figura 2 - Evolução dos depósitos de patentes relacionadas à própolis desde 1982 ... 44

Figura 3 - Depósito de patentes por país de origem 46

CAPÍTULO III

Figura 1 - Quantificação do teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (CE₅₀) dos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições 62

Figura 2 - Perfil cromatográfico do extrato de própolis vermelha (amostra E:50-20): kaempferol (10), formonometina (11) 66

Figura 3 - Determinação do conteúdo de 7-hidroxi, 4'-metoxi-isoflavona (Formonometina) (A) e 3,4',5,7-tetrahidroxiflavona (kaempferol) (A) presentes nos extratos etanólicos pré tratados com tecnologia de ultrassom 67

Figura 4 - Percentual de inibição de crescimento das linhagens tumorais (A) HL-60 (leucêmica), (B) HCT-116 (carcinoma de cólon), (C) PC3 (carcinoma de próstata), (D) SF295 (glioblastoma) e (E) SNB19 (glioblastoma) pelos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Panorama mundial: resultado da pesquisa na base de patentes <i>Espacenet</i> no período 1982 a 2017	42
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Condições empregadas para obtenção dos extratos de própolis vermelha aplicando ultrassom (Frequência de 50-60 Hz)	56
--	----

Tabela 2. Parâmetros de identificação e quantificação por HPLC-DAD dos compostos ativos dos extratos de própolis vermelha obtidos sob diferentes condições	58
---	----

Tabela 3. Determinação da MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) e MBC (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos extratos de própolis vermelha brasileira obtidos em diferentes condições	69
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
Capítulo I	19
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1. A PRÓPOLIS	20
1.2. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS DA PRÓPOLIS	22
1.3. PRÓPOLIS VERMELHA	24
1.4. EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS	26
1.4.1. Extração Etanólica	27
1.4.2. Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	27
Capítulo II	38
Artigo I: Aplicabilidade da Própolis em Cosméticos: Um Estudo Prospectivo em Documentos de Patentes	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. METODOLOGIA	41
2.1. Estratégia de Busca	41
2.2. Escopo	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CONCLUSÃO	46
Capítulo III	50
Artigo II: Avaliação da Composição Química e da Atividade Biológica dos Extratos de Própolis Vermelha obtidos após Tratamento com Ultrassom	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55

2.1.	Material e Reagentes	55
2.2.	Obtenção e Processamento da Própolis vermelha	56
2.3.	Obtenção dos Extratos de Própolis Vermelha	56
2.4.	Análise Cromatográfica dos Extratos	57
2.5.	Compostos Fenólicos Totais dos Extratos	58
2.6.	Conteúdo de Flavonoides dos Extratos	59
2.7.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dos Extratos	59
2.8.	Avaliação Antimicrobiana dos Extratos	60
2.9.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos Extratos de Própolis	61
2.10.	Análise Estatística	62
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1.	Compostos Fenólicos Totais, Flavonoides e Atividade Antioxidante dos Extratos	62
3.2.	Quantificação dos Compostos por HPLC	65
3.3.	Determinação da Atividade Antimicrobiana	69
3.4.	Determinação da Atividade Antitumoral <i>in vitro</i>	72
4.	CONCLUSÃO	75
Capítulo IV	88
1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

1. INTRODUÇÃO

As exigências dos consumidores por produtos naturais que apresentem atividades biológicas e/ou funcionais fizeram com que pesquisas sobre biomoléculas aflorassem o interesse da comunidade científica (ROSA, 2014; PINTO et al., 2002). Em paralelo, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que proporcionassem a extração de compostos naturais com maior estabilidade química, possibilitando melhor aproveitamento de seus benefícios à saúde (FIGUEIREDO JUNIOR, 2017; SULLIVAN et al., 2018).

Dentre as matrizes naturais exploradas tem-se a própolis, uma substância resinosa e algumas vezes cerosa, coletada por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais (BANKOVA et al., 2000; KUROPATNICKI et al., 2013). Pelo menos 300 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres fenólicos, flavonoides, terpenos, *b*-esteroides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (MARCUCCI et al., 2001; RIGHI et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Park et al. (2002) identificaram e classificaram 12 tipos diferentes de própolis no Brasil de acordo com suas características físico-químicas. Em 2006, Trusheva et al. identificaram e classificaram um novo tipo de própolis, a de coloração vermelha (tipo 13) que merece especial atenção, pois é uma matriz ainda pouco explorada e possui resultados promissores na literatura devido aos seus constituintes químicos que atuam em diversos tratamentos voltados à saúde, como por exemplo prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose (PARK et al., 2002; SILVA et al., 2008; LOTTI et al., 2010; IIO et al., 2012).

A própolis tipo vermelha pode ser encontrada no Brasil, Cuba, México, China e Nigéria (RUFATTO et al., 2017). Recentes investigações caracterizaram amostras de própolis vermelha brasileira e identificaram compostos como elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpin, quercetina e vestitol; tais compostos permitem distinguir este tipo de própolis dos demais tipos de própolis brasileiras (CAVENDISH et al., 2015; DE MENDONÇA et al., 2015).

Relatos na literatura indicam propriedades biológicas da própolis vermelha contra resfriados, mau hálito, inflamações, câncer, eczema, úlceras e infecções urinária. (LUSTOSA et al., 2008; PALASKA et al., 2013; CATCHPOLE et al., 2015), despertando

assim o interesse da indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (SILVA et al., 2016; FRANCHIN et al., 2017, THAMNOPOULOS et al., 2018).

O tipo de método de extração dos compostos de interesse das matrizes, principalmente naturais, exerce um papel fundamental nos tipos de componentes e o rendimento de extração (GALANAKIS et al., 2010; KONG, et al., 2015). Uma quantidade expressiva de trabalhos que envolvem a própolis utiliza o processo de extração convencional para obtenção dos extratos (alcoólico ou aquoso) resultando em baixo rendimento dos componentes de interesse e maior uso de solvente orgânico (HAMZAH & LEO, 2017).

Visando a otimização, Yeo, et al. (2015) relatam ter utilizado tecnologia de ultrassom no processo de obtenção de compostos biologicamente ativos advindos da própolis da Malásia. Um dos efeitos do ultrassom é proporcionar o aumento temporário da permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada do solvente na matriz (PENG et al, 2014). Essa tecnologia pode ser atrelada aos métodos convencionais de extração para um melhor rendimento dos componentes químicos de interesse na matriz avaliada (YEO et al., 2015).

Com a utilização da tecnologia de ultrassom se tem menor tempo de extração e melhor aproveitamento de compostos termossensíveis, possibilitando dessa forma melhor viabilidade dos compostos que podem ser empregados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (DONG et al., 2010).

REFERÊNCIAS

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. **Apidologie**, v. 31, n.1, p. 3-15, 2000.

CATCHPOLE, O.; MITCHELL, K.; BLOOR, S.; DAVIS, P.; SUDDER, A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. **Fitoterapia**, v. 106, n.1, p. 167-174, 2015.

CAVENDISH, R. L.; SANTOS, J. S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A. O.; OLIVEIRA, J. V.; ARAÚJO, E. D.; et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Brazilian Red Propolis Extract and Formononetin in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, n.1, p. 127-133, 2015.

DE MENDONÇA, I. C. G.; PORTO, I. C. C. DE M.; do NASCIMENTO, T. G.; de SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, J. M. dos S.; ARRUDA, R. E. dos S.; et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC**

Complementary and Alternative Medicine, v. 15, n.1, p. 357-369, 2015.

DONG, J.; LIU, Y.; LIANG, Z.; WANG, W. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, n.1, p. 61-65, 2010.

FIGUEIREDO JUNIOR, H. S. D.; MEUWISSEN, M. P. M.; VAN DER LANS, I.A.; OUDE LANSINK, A. G. J. M. Beyond upgrading typologies – In search of a better deal for honey value chains in Brazil. **Plos One**, v. 12, n.7, e0181391, 2018.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; NANI, B. D.; DA CUNHA, M. G.; COLÓN, D. F.; et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, *in press*, 2017.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERGBAND, E.; VASSILIS GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n.8, p. 1148-1155, 2010.

HAMZAH, N.; LEO, P. C. Fouling evaluation on membrane distillation used for reducing solvent in polyphenol rich propolis extract. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. *In press*, 2017.

IIO, A.; OHGUCHI, K.; MARUYAMA, H.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; ICHIHARA, K.; et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 19, n.5, p. 383-388, 2012.

KONG, F.; YU, S.; FENG, Z.; WU, X. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) leaves using response surface methodology. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n.43, p. 463-469, 2015.

KUROPATNICKI, A, K.; SZLISZKA, E.; KŁÓSEK, M.; KRÓL, W. The Beginnings of Modern Research on Propolis in Poland. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n.1, p. 1-6, 2013.

LOTTI, C.; CAMPO FERNANDEZ, M.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.4, p. 2209-2213, 2010.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM-NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.3, p. 447-454, 2008.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GUARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; et al. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with Pharmacological Activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n.2, p. 105–112, 2001.

PALASKA, I.; PAPATHANASIOU, E.; THEOHARIDES, T. C. Use of polyphenols in periodontal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n.1-3, p. 77-83, 2013.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.9, p. 2502-

2506, 2002.

PENG, D.; XU, T.; MASON, T. J.; WU, W. A study of ovarian cancer biomarker amplification using ultrasound for early stage detection. **Ultrasonics**, v. 50, n.2, p. 451-454, 2014.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n.6, p.278-283, 2001.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n.1, p. 1-14, 2013.

ROSA, A. A. A. Uso da Extração Supercrítica na Obtenção de Produtos com Valor Agregado a Partir de Resíduos Sólidos da Indústria Vinícola. Dissertação de Mestrado—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2014.

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

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n.3, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G.A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; et al. Antioxidant, Antimicrobial, Antiparasitic, and Cytotoxic Properties of Various Brazilian Propolis Extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; COSTA, S. S.; BARRETO, G. A.; PADILHA, F. F.; UMSZA-GUEZ, M. A. Aplicação de Extrato de Própolis em Produtos Alimentícios: Uma Prospecção Baseada em Documentos de Patentes. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1251, 2016.

SULLIVAN, D. J.; AZLIN-HASIM, S.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P.; MORRIS, M. A. Natural Antimicrobial Materials for Use in Food Packaging. **Handbook of Antimicrobial Coatings**, p. 181-233, 2018.

THAMNOPOULOS, I. A. I.; MICHAELIDIS, G. F.; FLETOURIS, D. J.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G.; ANGELIDISA, A. S. Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. **Food Microbiology**, v. 73, n.1, 168-176, 2018.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n.2, p. 249-254, 2006.

YEO K. L.; LEO, C. P.; CHAN, D. J. C. Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. **Journal of Process Engineering**, v. 38, n.6, p. 562–570, 2015.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da tecnologia de ultrassom na extração de compostos bioativos e/ou funcionais da própolis vermelha de Alagoas.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Realizar prospecção em documentos de patentes depositadas no mundo baseada na aplicação de extratos de própolis em produtos cosméticos;
- 2) Obter extratos de própolis de Alagoas com e sem pré tratamento por ultrassom utilizando etanol como solvente.
- 3) Caracterizar os extratos obtidos quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e quanto a sua capacidade antioxidante;
- 4) Identificar e quantificar os marcadores biologicamente ativos presentes nos extratos através de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).
- 5) Avaliar a capacidade antimicrobiana dos extratos da própolis obtidos extração convencional com e sem pré tratamento ultrassônico contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- 6) Realizar a avaliação citotóxica dos extratos frente a linhagens de células tumorais HCT-116 (carcinoma de cólon), HL-60 (leucêmica), PC3 (carcinoma de próstata), SF295 (glioblastoma), SNB19 (glioblastoma).

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A PRÓPOLIS

A própolis, produto natural gerado por abelhas da espécie *Apis mellífera*, é definida segundo Cabral (2009) como um adesivo forte, substância resinosa coletada, transformada e utilizada pelas abelhas para selar as imperfeições em seus favos de mel, suavizar as paredes internas, proteger a entrada de intrusos e proporcionar estabilidade microbiológica da colmeia.

As abelhas aproveitam os produtos gerados de diversos processos botânicos que ocorrem em distintas partes das plantas (exsudatos de feridas nas plantas, materiais lipofílicos nas folhas e gemes, látex, resinas, etc.) como matéria prima para a produção da própolis (LUSTOSA et al., 2008). A própolis é composta basicamente por resinas e bálsamos (55%), cera (30%), óleos voláteis (10%) e pólen (5%), incluindo também vitaminas (provitaminas A e todas do complexo B), ésteres cafeinados, flavonoides e minerais (CONAPIS, 2008, citado por SILVA et al., 2008).

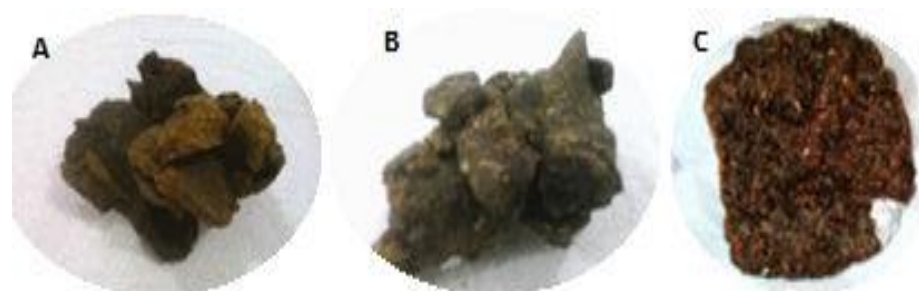
A própolis é referenciada na literatura científica como um dos produtos naturais mais complexos quimicamente (ISHIDA et al., 2011; SFORCIN & BANKOVA, 2011), sua composição pode variar devido a fatores como região geográfica, variedade genética da colmeia, fonte vegetal e época do ano da coleta; seu espectro de cor varia entre amarelo, amarelo escuro, castanho claro e escuro, marrom esverdeado e vermelho (Figura 1).

As propriedades biológicas e terapêuticas dos compostos fitoquímicos identificados em própolis tem benéficos reconhecidos e comprovados para a saúde: atividade antimicrobiana (ONG et al., 2017), anti-inflamatória (MOURA et al., 2011), cicatrizante (SOUZA et al., 2009), antiulcerogênica (BARROS et al., 2007), antiparasitária (PONTIN et al., 2008; SENA-LOPES et al., 2018) e antioxidante (OLDONI et al., 2011; BONAMIGO et al., 2017, FRANCHIN et al., 2017).

No Brasil foram classificados 13 tipos de própolis, sendo a maior parte dos estudos realizados com a própolis do tipo verde (*green propolis*) devido ao reconhecimento internacional das propriedades de seus componente, principalmente, ao Artepelin C, composto presente somente em própolis verde

brasileira e que possui diversas atividades biológicas (PARK et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2009; OLIVEIRA, 2015; FRANCISCO et al., 2018). Distintas propriedades biológicas e composições químicas das amostras de própolis brasileiras foram descritas, o que é explicado pela grande dimensão continental do Brasil e a grande diversidade da flora e variedade do ecossistema, conferindo assim uma gama de estudos com diferentes amostras desse material provenientes de um mesmo país (SILVA, 2016; MACHADO et al., 2016; BUENO-SILVA et al., 2017).

Figura 1. Própolis bruta verde (A), marrom (B) e vermelha (C)



Fonte: Autoria própria

A própolis é utilizada em diversos segmentos; na medicina veterinária é usada para cicatrizar feridas, em cortes pós-operatórios, controle de hemorragias e tratamento de mastite; na agricultura é aplicada no tratamento de doenças de algumas espécies vegetais, substituindo produtos químicos, enquanto na indústria de cosméticos é utilizada como constituinte de produtos higiênicos e estéticos; na indústria de alimentos é empregada como ingrediente funcional (PINTO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2009; OSÉS et al., 2016; MEHAISEN et al., 2017).

Uma enorme quantidade de marcas e produtos feitos à base de própolis encontra-se disponível em lojas de produtos naturais, tais como balas, chocolates, doces, chá, protetor solar, gel pós-barba, *shampoos*, cremes para pele, soluções antissépticas, pastas de dente, sabonetes, batom, cápsulas, extratos, *spray* bucal, pastilhas, xaropes, comprimidos, etc. (PARK & IKEGAKI, 1998; SANTOS et al., 2017).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de própolis, com produção estimada em torno de 150 toneladas por ano, sendo que cerca de 75%

desse total é exportado, especialmente para o Japão (92% das exportações) (PEREIRA et al., 2002; SEBRAE, 2014). Segundo o *Market Research Future* (2015), espera-se que, até 2021, o mercado mundial da própolis aumente em até 3,5%, com produção mundial de 2.900t em 2021.

Por ser um país exportador dessa matriz, o Brasil possui a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, que dispõe do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Extrato de própolis, a fim de classificar a própolis quanto ao seu teor de flavonoides, definir a composição e conter os requisitos necessários para a produção do extrato de própolis, assim como outros prosseguimentos (BRASIL, 2001).

A padronização química da própolis é um desafio internacional, sendo necessários estudos detalhados da composição química e das suas propriedades biológicas para viabilizar a aplicação tecnológicas da própolis e seus derivados nos diversos setores comerciais (SILVA, 2016).

1.2. COMPOSTOS FITOQUÍMICOS DA PRÓPOLIS

As fontes dos compostos orgânicos presentes na própolis incluem plantas, substâncias segregadas do metabolismo da abelha e materiais que são inseridos no decorrer da elaboração da própolis (MARCUCCI, 1995). A resina que constitui a própolis bruta é composta de flavonoides e ácidos fenólicos, conhecida como fração polifenólica (PARK et al., 2002; FUNARI & FERRO, 2006).

Investigações sobre os polifenóis possuem grande importância científica, pois, estes compostos promovem consideráveis efeitos benéficos para a saúde (efeitos antimutagênicos, anticancerígenos, antiaterogênicos, etc.) (SFORCIN & BANKOVA, 2011). As propriedades biológicas da própolis vêm de variados compostos (terpenos, pterocarpans, benzofenonas preniladas), porém têm-se um foco em especialmente aos flavonoides, por estes seres os responsáveis pelas ações farmacológicas desempenhadas pela própolis (VOLPI & BERGONZINI, 2006; SFORCIN & BANKOVA, 2011).

A literatura lista mais 300 constituintes foram identificados em amostras de própolis. Entre os principais componentes estão os ácidos fenólicos, flavonoides e aminoácidos, ácido *p*-cumárico e Artepillin C, ácidos aromáticos e

ésteres, aldeídos e cetonas, ácidos benzoicos, esteroides, polissacarídeos, ácidos graxos, entre outros (PARK et al., 2002; HUANG et al., 2014; RUFATTO et al., 2017). Elementos inorgânicos tais como o alumínio, cálcio, cobre, lítio, manganês, ferro, alumínio, vanádio, potássio, sódio e silício também foram identificados (PEREIRA et al., 2002; MACHADO et al., 2016).

Na própolis verde brasileira os principais constituintes são o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, naringenina, kaempferol, isorhamnetina, sakurametina, pinocembrina, kaempferida e artepellin C (SZLISZKA et al., 2013; ANDRADE et al., 2017). As espécies de própolis verdes e vermelhas são as mais estudadas no Brasil devido ao potencial farmacológico de seus constituintes químicos (HATANO et al., 2012; FROZZA et al., 2017).

Alguns compostos foram identificados apenas em amostras de própolis vermelha, como os isoflavonoides isosativan e medicarpin com atividades antimicrobianas e antioxidantes (TRUSHEVA et al., 2006). Righi et al. (2011) detectaram em amostras de própolis vermelha, a presença de dois novos compostos químicos, o 3,4,2',3' - tetrahidroxialcano e flavona C-glicosídeo. Bueno-Silva et al. (2017) relatam presença majoritária do composto formonometina em extratos e resina de própolis vermelha brasileira; os autores ainda identificaram isoliquiritigenina, neovestitol, vestitol e sugerem que estes são responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis vermelha. A formonometina é um isoflavonoide com atividades estrogênicas, antiradical, citotóxicas e antifúngicas (FROZZA et al., 2013). A formonometina é metabolizada por mamífero e convertida em daidzeína, que possui ação eficiente contra células tumorais mamária e da próstata (RAMASAM et al., 2017; SCHNEKENBURGER & DIEDERICH, 2015).

Em um estudo comparativo entre própolis vermelhas brasileiras e cubanas, a isoliquiritigenina foi um dos constituintes principais em ambas as amostras (PICCINELLI et al., 2011). Este composto juntamente com a formonometina, biochanina A, xantochimol, daidzeína, isoliquiritigenina, neovestitol e vestitol são considerados marcadores químicos presentes na própolis vermelha (PICCINELLI et al., 2011; FROZZA et al., 2013).

As diferenças na composição química e atividades biológicas de diferentes amostras de própolis vão de acordo com sua origem geográfica (HATANO et al., 2012). A própolis brasileira tem despertado grande interesse em

pesquisadores ao redor do mundo devido a sua composição química diferenciada das própolis de regiões de zona tropical (TRUSHEVA et al., 2006), principalmente pela gama de compostos flavonoides presentes em sua composição.

1.3. PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis vermelha brasileira é elaborada, majoritariamente, a partir do exsudato da *Dalbergia ecastophyllum*, planta típica dos manguezais do Brasil mais conhecida como rabo-de-bugio. Seu exsudado possui dois pigmentos, retusapurpurina A e B, de tom avermelhado que são responsáveis pela coloração da própolis vermelha do Brasil (PICCINELLI et al., 2011; FRANCHI et al., 2012; SOARES, 2012) (Figura 2). Sua casca e raízes são popularmente utilizadas no tratamento da anemia e de inflamações uterinas (GUEDES et al., 2014).

Figura 2. *Dalbergia ecastophyllum* em manguezal do Estado de Alagoas (a). Abelha *Apis mellífera* coletando exsudado proveniente do rabo-de-bugio (b). Abelha depositando própolis vermelha na colmeia (c)



Fonte: Google imagens

Devido à grande faixa de manguezais na costa brasileira, a própolis vermelha pode ser encontrada em diversos Estados: Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco e Roraima. Apesar da vasta biodisponibilidade, somente a própolis advinda do Estado de Alagoas possui Indicação Geográfica, registro IG201101 na categoria Denominação de Origem, reconhecida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Este reconhecimento é visto como importante avanço para a apicultura do Estado (único produtor da própolis vermelha certificada no mundo), sendo a primeira denominação de origem do setor (SEBRAE, 2012).

A própolis vermelha sobressai-se dos demais tipos de própolis por ser

matriz ainda pouco estudada, entretanto, relatos na literatura referenciam seu potencial com ação antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, contra HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), anticarcinogênica (HARISH et al., 1997; GEKKER et al., 2005; ONG et al., 2017; BONAMIGO et al., 2017). Alguns componentes químicos foram encontrados somente na própolis vermelha, como a daidzeína, formononetina, xantocimol, bioquanina A, vestitol, neovestitol, medicarpin, liquiritigenina e isoliquiritigenina (BUENO-SILVA et al., 2017; ANDRADE et al., 2017).

Alguns estudos relatam o tipo de atividade biológica exercida pelos biomarcadores da própolis vermelha. Kohena et al. (1998) desenvolveram um método mais rápido e prático para quantificação do composto daidzeína e relatam sua ação no combate a células carcinogênicas. Neves et al. (2016) estudaram o extrato etanólico desta matriz e suas porções fracionadas em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e afirmam que a formononetina é um composto importante para a atividade antifúngica desempenhada pela própolis vermelha. Atrelado a formononetina, o xantocimol presente no extrato de própolis vermelha brasileira (Alagoas), inibiu o crescimento das células cancerosas em ensaio citotóxico (NOVAK et al., 2014).

Barbosa et al. (2016) avaliaram as alterações comportamentais e histológicas promovidas pela administração de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Sergipe em roedores submetidos à compressão no nervo ciático e verificaram um importante efeito neuroprotetivo dos extratos na recuperação funcional dos roedores e atribuíram este efeito a ação da biochanina A na redução de déficits comportamentais e neuroquímicos. Kole et al. (2011) relatam a ação da bioquanina A como composto anti-proliferativo e anti-inflamatório.

Com relação aos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, Franchin et al. (2016) utilizaram neovestitol, isolado de própolis vermelha, em camundongos e verificaram a redução da inflamação aguda e crônica administrando dose de 3 e 10 mg / kg por via subcutânea. Um estudo usando formononetina isolada da própolis vermelha mostra que a administração deste composto em modelos de inflamação experimental em camundongos reduziu a migração de leucócitos e a formação de edema (CAVENDISH et al., 2015).

Apesar de suas ações biologicamente ativas, não existe ao certo um regulamento que vise a fiscalização do uso da própolis e seus extratos nos

diversos setores. Pontes et al. (2018) apontam que o uso medicinal e nutracêutico das substâncias advindas da própolis deve ser certificado por uma agência reguladora oficial. No âmbito da área de alimentos, Silva et al. (2016) relatam a necessidade dos estudos envolvendo a aplicação de própolis em produtos alimentícios definirem a concentração de própolis a ser ingerida pelos consumidores.

1.4. EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

A obtenção de biocompostos, conhecidos também como substâncias bioativas, em matrizes naturais pode ocorrer através de muitos métodos de extração. Para a identificação e isolamento destes compostos é necessária a realização da extração com solventes com polaridade compatível às características dos fitocompostos de interesse.

Outro fator a ser levado em conta é a facilidade de separação entre solvente do soluto (composto) ao final da extração (ANDREO & JORGE, 2006). Além do solvente, outros fatores devem ser analisados, pois influenciam o processo de extração, como: o tamanho de partícula, razão sólido-líquido, temperatura, tempo de extração, dentre outros. (GALANAKIS et al., 2010).

As extrações ocorrem comumente através de técnicas de fervura, aquecimento, extração por *Soxhlet* e infusão. Atualmente novos métodos alternativos são utilizados devido a sua alta eficiência e menor consumo de tempo e solvente orgânicos, como por exemplo a extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom (EAU), extração de fluido supercrítico, extração de solvente pressurizado, extração assistida por campo elétrico pulsado, extração assistida por enzima e extração com solventes intercambiáveis e líquidos iônicos (BARROS et al., 2013; GROSSO et al., 2015; MACHADO et al., 2013; MACHADO et al., 2016).

Os biocompostos existem tanto em formas livres como ligadas em células vegetais, podendo os livres serem extraídos com o uso de solventes aquosos e orgânicos ou suas misturas. Contrariamente, os compostos ligados são mais laboriosos para serem extraídos, sendo necessário a conjugação de outras etapas de extração, como por exemplo hidrólise ácida, básica ou tratamento enzimático (MAZZA, 2017; ALBAHARI, et al., 2018).

1.4.1.Extração Etanólica

A extração etanólica fornece compostos lipofílicos, que estão presentes em grandes quantidades e atrai um interesse considerável dos pesquisadores (MACHADO et al., 2016). Silva, 2016 descreve o processo de obtenção de extratos etanólicos de própolis com base no seguinte fluxo: o extrato é obtido através da adição, que leva consideração uma porcentagem pré-estabelecida, da amostra e o solvente etanol. A extração dos biocompostos da mistura é realizada em agitador tipo *shaker*, posteriormente, a mistura é centrifugada, os sobrenadantes são recolhidos, homogeneizados e levado à secagem em estufa a temperatura de 50 °C.

No entanto, este método de extração requer grande quantidade de solventes; tempos de longa duração e a perda de alguns compostos devido à oxidação, ionização e hidrólise durante a extração, o que restringe as suas aplicações industriais (KONG et al., 2015). Ainda apresentam desvantagens como geração de resíduos tóxicos, que a longo prazo promove danos prejudiciais ao meio ambiente (SILVA et al., 2016).

Dias (2015) aborda que a extração dos biocompostos exclusivamente por solventes orgânicos é uma tarefa complexa, devido à necessidade do emprego de elevadas temperaturas que são nocivas aos compostos extraíveis por serem substâncias termolábeis e susceptíveis à oxidação. O autor ressalva que restrições legislativas propondo a eliminação do uso geral de solventes orgânicos em plantas industriais de extração são obstáculos para o uso deste tipo de método.

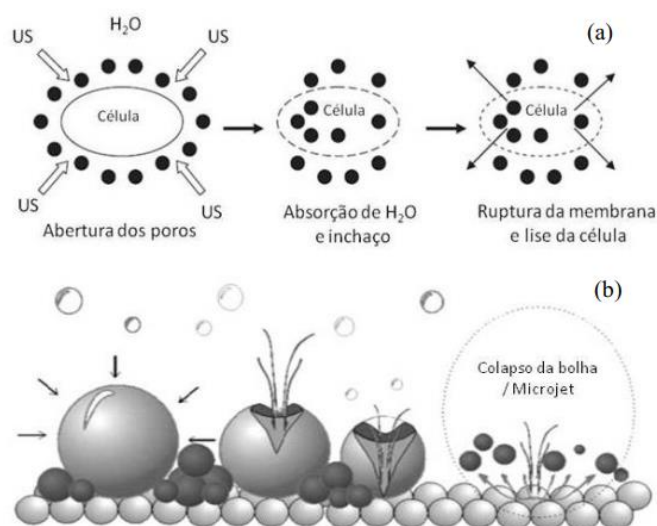
1.4.2.Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

Devido às atuais modificações ambientais, o campo científico vem a cada dia propondo métodos mais ambientalmente corretos visando adequar-se às normas ambientais vigentes, assim como utilizar os recursos naturais de forma sustentável. Neste contexto, enquadra-se a tecnologia de ultrassom utilizada para melhorar a extração de compostos de matrizes naturais (ZHAO et al., 2014; CHEN et al., 2015; LI et al., 2016)

Desde o começo do século XX a tecnologia do ultrassom passou a ser explorada em uma variedade de finalidades na medicina, indústria química e engenharia (ALVES et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Atualmente, o ultrassom é objeto de pesquisa e desenvolvimento na indústria de alimentos, pois os seus equipamentos emissores de ultrassom são práticos e confiáveis, sendo utilizado em processos de homogeneização, emulsificação, esterilização, secagem, filtração, separação e extração de compostos. (CHEMAT et al., 2011; BERNADO et al., 2016).

A extração assistida por ultrassom trata-se de um o processo baseado na ação de ondas mecânicas de baixa frequência responsáveis pela formação e colapso de microbolhas gerando zonas pontuais de alta pressão e temperatura durante a extração. Em meio líquido as microbolhas são geradas devido ao fenômeno de cavitação, onde os gases presentes no sistema geram ciclos de expansão e compressão até implodirem, promovendo liberação de energia em forma de calor e pressão nas zonas próximas a micro implosões como demonstra a Figura 3 (CAVALHEIRO, 2013; GROSSO et al., 2015).

Figura 3. Processo de cavitação celular.



Fonte: VIGGI, 2013

Na Figura 3 (a) é demonstrado a geração de bolhas devido a emissão ultrassônica no meio com ciclos de expansão e compressão das bolhas, ao atingirem um determinado tamanho sofrem colapso implosivo (cavitação). A

Figura 3 (b) mostra uma bolha de cavitação em sofrendo colapso assimétrico desencadeando um *microjet* que rompe a parede celular da matriz.

As ondas ultrassônicas são classificadas com base na sua frequência e intensidade. Alta frequência (2 a 20MHz) e baixa intensidade ($<1 \text{ W.cm}^{-2}$), compõem ultrassons de baixa energia, que podem ser empregados na área de alimentos, em técnicas analíticas para promover informações sobre propriedades físico-químicas, composição, estrutura e estado físico de alimentos. Os equipamentos de ultrassom com alta capacidade energética têm baixa frequência (20 a 100kHz) e alcançam níveis de intensidade mais altos (10 a 1000 W.cm^{-2}), com energia suficiente para romper ligações intermoleculares e modificar algumas propriedades físicas e/ou favorecer reações químicas (ALVES et al., 2013; BERNADO et al., 2016).

Os principais efeitos do uso da tecnologia por ultrassom na extração são o aumento da permeabilidade das paredes celulares, facilitando a dilatação e a hidratação do material, aumentando o tamanho dos poros da parede celular e otimizando os processos de difusão e de transferência de massa (VIGGI, 2013). Possui ainda a vantagem em termos de produtividade, rendimento e seletividade, além de reduzir a necessidade de utilização de substâncias químicas ou aplicação de calor, em diversos processos industriais (CHEMAT et al., 2011).

A extração assistida por ultrassom é de simples operação e eficiente para extração de elementos em amostras de alimentos, não necessitando de longos períodos para o preparo das amostras nem da utilização de altas temperaturas e pressão elevada (CAVALHEIRO, 2013). É uma alternativa barata, simples e eficiente às técnicas de extração convencional, possui maior eficiência de extração, menor consumo de energia e solventes (LIU et al., 2015).

Yeo et al. (2015) relatam que com a utilização do ultrassom houve uma redução de aproximadamente 20% no tempo de extração dos biocompostos constituintes da própolis asiática (Sibu, Malásia). Os autores ainda ressaltam que o método é bioquimicamente seguro, não interferindo de forma negativa na recuperação de compostos ativos da matriz. Outros autores também relatam a superioridade da EAU na extração de compostos fenólicos quando comparada a extração por métodos convencionais (WANG et al., 2013; MAJD et al., 2014).

A extração assistida por ultrassom possui promissoras aplicações por se tratar de uma técnica de extração econômica e verde, podendo ser utilizada em

consonância com outros métodos para produzir produtos funcionais passíveis de comercialização (ALVES et al., 2013; ROCHA et al., 2017).

REFERÊNCIA

ALBAHARI, P.; MARIO JUG, M.; RADIĆ, K.; JURMANOVIĆ, S.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S. R.; ČEPO, D. V. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. **Food Science and Technology - LTW**, v. 92, n.1, p. 22-31, 2018.

ALVES, L. L.; CICHOSKIII, A. J.; BARINII, J. S.; RAMPELOTTOI, C.; DURANTE, E. C. O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v. 43, n.8, p. 1522-1528, 2013.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAIA, M.; OLIVEIRA, C. D. de.; NUNES, M. L.; NARAINA, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, n.1, p. 129-138, 2017.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **Digital Library of Journals**, v. 24, n.2, p. 319-336, 2006.

BARBOSA, R. A.; NUNES, T. L.; NUNES, T. L.; PAIXAO, A. O.; NETO, R. B.; MOURA, S.; et al. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n.6, p. 993-1004, 2016.

BARROS, J. M.; BEZERRA, M. A.; VALASQUES, G. S.; NASCIMENTO, J. B. B.; SOUZA, A. S.; ARAGÃO, N. M. Multivariate Optimization of an Ultrasound-assisted Extraction Procedure for Cu, Mn, Ni and Zn Determination in Ration to Chickens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n.3, p. 891-902, 2013.

BARROS, M. P.; SOUZA, J. P.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. Effect of Brazilian green própolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n.3, p.567-571, 2007.

BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. de. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, n.4, p.739-746, 2016.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J. F.; OLIVEIRA, A.S.; TORQUATO, H. F. V.; BALESTIERI, J. B. P.; CARDOSO, C.; et al. L. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (*Hymenoptera, Apidae*) from the Brazilian Cerrado biome. **Plos One**, v. 12, n.9, p. e0183983, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 3, 19 de maio, 2001: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Extrato de

própolis.

BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n.11, p. 1318-1324, 2017.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; SEVERINO, R. M. N. B.; ALENCAR, M. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1523, 2009.

CAVALHEIRO, C. V. Extração de Compostos Fenólicos Assistida por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Minerais em Folhas de *Olea europaea* L. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 93 p., 2013.

CAVENDISH, R. L.; SANTOS, J. S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A. O.; OLIVEIRA, J. V.; ARAÚJO, E. D.; et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Brazilian Red Própolis Extract and Formononetin in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, n.1, p. 127-133, 2015.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n.4, p. 813-835, 2011.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation Of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from *Sugar Beet Molasses*. **Food Chemistry**, v. 172, n.1, p. 543-550, 2015.

DIAS, A. L. B. Extração supercrítica de compostos bioativos da pimenta dedo de moça (*capsicum baccatum* L. var. *Pendulum*) assistida por Ultrassom. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 189 p., 2015.

FRANCHI, G. C. J.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A. NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n.1, p. 1-6, 2012.

FRANCHIN, M.; COLÓN, D. F.; DA CUNHA, M. G.; CASTANHEIRA, F. V.; SARAIVA, A. L.; BUENO-SILVA, B.; et al. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n.1, p. 3640, 2016.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; NANI, B. D.; DA CUNHA, M. G.; COLÓN, D. F.; et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, in press, 2017.

FRANCISCO, L.; PINTO, D.; ROSSETO, H.; TOLEDO, L.; SANTOS, R.; TOBALDINI-VALÉRIO, F.; et al. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product.

Food Research International, v. 105, n.1, p. 537-547, 2018.

FROZZA, C. O. S.; SANTOS, D. A.; RUFATTO, L. C.; MINETTO, L.; SCARIOT, F. J.; ECHEVERRIGARAY, S.; et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n.1, p. 951-963, 2017.

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. DE; SALVADOR, M.; MOURA, S.; et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n.1, p. 137-142, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciências e Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 26, n.1, p. 171-17, 2006.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERGBAND, E.; VASSILIS GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n.8, p. 1148-1155, 2010.

GEKKER, L.; HU, S.; SPIVAK, H.; LOKENSGARD, JR.; PETERSON, PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n.2, p. 158-163, 2005.

GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; FERRERES F.; ANDRADE, P. B. Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. **Marine Drugs**, v. 13, n.3, p. 3182-3230, 2015.

GUEDES, G. M. M.; ALBUQUERQUE, R. S.; SOARES-MACIEL, R. S.; FREITAS, M. A.; SILVA, V. A.; LIMA, E. O.; et al. Isolation of phytosterols of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae) and modulation of antibiotic resistance by a possible membrane effect. **Arabian Journal of Chemistry**, in press, 2014.

HARISH, Z.; RUBINSTEIN, UM.; GOLODNER, H.; ELMALIAH, H.; MIZRAHI, Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 23, n.2, p. 89-96, 1997.

HATANO, A.; NONAKA, T.; YOSHINO, M.; AHN, M. R.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; et al. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n.4, p. 577-584, 2012.

HUANG, S.; ZHANG, C. P.; WANG, K.; LI, G. Q.; HU, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

ISHIDA, V. F. C.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; BANDEIR A, M. F. C. L. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, n.3, p. 966-972, 2011.

KOHENA, F.; LICHTERA, S.; GAYERA, B.; DEBOEVERB, J.; LUC, L. J. W. The

measurement of the isoflavone daidzein by time resolved fluorescent immunoassay: a method for assessment of dietary soya exposure. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 64, n.3-4, p. 217-222, 1998.

KOLE, L.; GIRI, B.; MANNA, S. K.; PAL, B.; GHOSH, S. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF κ B nuclear translocation. **European Journal of Pharmacology**, v. 653, n.1-3, p. 8-15, 2011.

KONG, F.; YU, S.; FENG, Z.; WU, X. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) leaves using response surface methodology. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n.43, p. 463-469, 2015.

LI, H. Z.; ZHANG, Z. J.; XUE, J.; CUI, L. X.; HOU, T. Y.; LI, X. J.; et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 36, n.4, p. 686-693, 2016.

LIU, L.; SHEN, B. J.; XIE, D. H.; CAI, B. C.; QIN, K. M.; CAI, H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cimicifugae* rhizoma with response surface methodology. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n.44, p. 682-689, 2015.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM-NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.3, p. 447-454, 2008.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, v. 11, n.1, p. e0145954, 2016.

MACHADO, B. A. S.; NUNES, S. B.; PEREIRA, C. G.; PADILHA, F. F.; UMSZAGUEZ, M.A. Supercritical fluid extraction using CO₂: main applications and future perspectives. **Separation Science and Technology**, v. 48, n.18, p. 2741-2760, 2013.

MAJD, M. H.; RAJAEI, A.; BASHI, D. S.; MORTAZAVI, S. A.; BOLOURIAN, S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 57, n.1, p. 195-202, 2014.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n.2, 83-99, 1995.

MARKET RESEARCH FUTURE. Global & US Propolis Market Research Report – Forecast 2016-2027. Disponível em <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/propolis-market-782>> Acesso em 03 de mar 2018.

MAZZA, K. E. L. Extração assistida por ultrassom e microencapsulação por spray drying de compostos fenólicos do bagaço de uva. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 118 p., 2017.

MEHAISEN, G. M. K.; IBRAHIM, R. M.; DESOKY, A. A.; SAFA, H. M.; EL-SAYED, O. A.; ABASS, A. O. The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. **Plos One**, v. 12, n.10, p. e0186907, 2017.

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**, v. 8, n. 1, p.1-7, 2011.

NASCIMENTO, C. S.; NUNES, L. C. C.; LIMA, A. A. N. de; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROLIM NETO, P. J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, n.4, p. 334-339, 2009.

NEVES, M. V. M.; DA SILVA, T. M. S.; LIMA, E. O.; CUNHA, E. V. L.; OLIVEIRA, E. J. Isoflavone formononetin from Red Propolis Acts as a Fungicide Against *Candida* sp. **Braz. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n.1, p. 159-166, 2016.

NOVAK, E. M.; SILVA, M. S. C.; MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; LÓPEZ, B. G. C.; FORTES, M. A. H. Z.; et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n.1, p. 91-102, 2014.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M, et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n.2, p. 208-13, 2011.

OLIVEIRA, M. O. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **ACTA Apicola Brasílica**, v. 3, n2, p. 1-6, 2015.

ONG, T. H.; CHITRA, E.; RAMAMURTHY, S.; SIDDALINGAM, R. P.; YUEN, K. H.; AMBU, S. P.; et al. Correction: Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Plos One**, v. 12, n.4, p. e0176629, 2017.

OSÉS, S. M.; MELGOSA, L.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. Design of a food product composed of honey and propolis. Diseño de un alimento a base de miel y propóleos. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n.5, p. 461-467, 2015.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n.11, p. 2230-2232, 1998.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n.1, p. 321-326, 2002.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.12, p. 6484-6491, 2011.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n.6, p.278-283, 2001.

PONTES, M. L. C.; VASCONCELOS, I. R. A.; DINIZ, M. F. F. M.; PESSÔA, H. L. F. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n.1, p. 34-39, 2018.

PONTIN, K.; SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, F. F.; SILVA, M.L.; CUNHA, W. R.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, n.3, p. 487-492, 2008.

RAMASAMY, K.; SAMAYOA, C.; KRISHNEGOWDA, N.; TEKMAL, R. R. Chapter Six - Therapeutic Use of Estrogen Receptor β Agonists in Prevention and Treatment of Endocrine Therapy Resistant Breast Cancers: Observations from Preclinical Models. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 151, p. 177-194, 2017

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; HENRIQUE BREYERD, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

ROCHA, J. C. G.; PROCÓPIO, F. R.; MENDONÇA, A. C.; Luciana Marques VIEIRA, L. V.; PERRONE, I. T.; BARROS, F. A. R. de.; STRINGHETA, P. S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology (Campinas)**, p.1-9, 2017.

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

SANTOS, N. W.; YOSHIMURA, E. H.; MAREZE-COSTA, C. E.; MACHADO, E.; AGUSTINHO, B. C.; PEREIRA, L. M.; et al. Supplementation of cow milk naturally

enriched in polyunsaturated fatty acids and polyphenols to growing rats. **Plos One**, v. 12, n.3, p. e0172909, 2017.

SCHNEKENBURGER, M.; DIEDERICH, M. Chapter 18 – Nutritional Epigenetic Regulators in the Field of Cancer: New Avenues for Chemopreventive Approaches. **Epigenetic Cancer Therapy**, p. 393-425, 2015.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Boletim: O Mercado da Própolis. Disponível em <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf)>. Acesso em 31 de jan 2018.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Indicação Geográfica reconhece a própolis vermelha alagoana. Disponível em <<http://www.al.agenciasebrae.com.br/sites/asn/uf/AL/indicacao-geografica-reconhece-a-propolis-vermelha-alagoana,e4eab7579f716410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em 01 de fev 2018.

SENA-LOPES, A.; BEZERRA, F. S. B.; NEVES, R. N.; PINHO, R. B.; SILVA, M. T. O.; SAVEGNAGO, et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **Plos One**, v. 13, n.3, p. e0191797, 2018.

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

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

SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos das Cascas de Lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n.1, p. 81-96, 2016.

SILVA, K. B.; RODRIGUES, K. C.; TRINDADE, J. L.F. Própolis, sua composição e benefícios. In: **Resumos da VI Semana de Tecnologia em Alimentos**, 2008, Paraná.

SILVA, R. P. D. Caracterização Biológica de Extratos de Própolis Vermelha, Verde e Marrom do Brasil Obtidos por Extração Supercrítica e Extração Convencional. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 90 p., 2016.

SOARES, R. S. Estudo Fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (FABACEAE). Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 125 p., 2012.

SOUZA, A. P. B.; PASSOS, J. P. G.; PADILHA, A. F. F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Efetividade da *Delphinium staphysagria* 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. **Brazilian Homeopathic**

Journal, v. 11, n.1, p. 13-14 2009.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A Z.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, 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**, v. 2013, n.1, p. 1-13, 2013.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n.2, p. 249-254, 2006.

VIGGI, P. C. Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 220 p., 2013.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n.3, p. 354-361, 2006.

WANG, X.; WU, Y.; CHEN, G.; YUE, W.; LIANG, Q.; WU, Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from Sparganii rhizoma with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, n.3, p. 846-854, 2013.

YEO K. L.; LEO, C. P.; CHAN, D. J. C. Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. **Journal of Process Engineering**, v. 38, n.6, p. 562-570, 2015.

ZHAO, Y.; HOU, Y.; TANG, G.; CAI, E.; LIU, S.; YANG, H.; et al. Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Compounds from Epimedium brevicornum Maxim Using Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activities in vitro. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, n.1, p. 1-7, 2014.

CAPÍTULO II

Artigo I: Aplicabilidade da Própolis em Cosméticos: Um Estudo Prospectivo em Documentos de Patentes

Aplicabilidade da Própolis em Cosméticos: Um Estudo Prospectivo em Documentos de Patentes

Gabriele de A. Barreto,^a Rejane P. D Silva,^{a,b} Janice Izabel Druzian,^b Marcelo A. Umsza-Guez,^a Bruna A. S. Machado^{b*}

^a Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Campus Universitário de Ondina, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

^b Centro Universitário SENAI CIMATEC (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial), Avenida Orlando Gomes, 1845, Piatã, CEP 41650-010, Salvador-BA, Brasil.

*brunamachado17@hotmail.com

Abstract

Propolis and its extracts have versatile applicability in various sectors of industry, which allows the inventors of new technologies and products to protect their designs through patent documents. The objective of the study was to carry out a technological prospection on the use of extracts of propolis in products directed to the cosmetics sector. The search was performed on the Espacenet online database. The results showed the interest of the Asian countries (China, Japan and South Korea) for the biological properties of the extracts of propolis, thus contributing to the market expansion of cosmetics containing propolis worldwide.

Keywords: process and product; technological prospecting; brazilian propolis.

Resumo

A própolis e seus extratos possuem aplicabilidade versátil em diversos setores da indústria, o que permite que os inventores de novas tecnologias e produtos protejam seus projetos através dos documentos de patentes. O objetivo do estudo foi realizar uma prospecção tecnológica sobre a utilização de extratos de própolis em produtos voltados ao setor de cosméticos. A busca foi realizada na base *online* do *Espacenet*. Os resultados demonstraram o grande interesse dos países asiáticos (China, Japão e Coreia do Sul) pelas propriedades biológicas dos extratos de própolis, contribuindo assim, na expansão mercadológica de cosméticos contendo própolis a nível mundial.

Palavras-chave: processo e produto; prospecção tecnológica; própolis brasileira.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas e constituída principalmente de resina, cera e óleos essenciais (VIUDA-MARTOS et al., 2008). As abelhas a utilizam para selar cavidades existentes nas colmeias, manter a temperatura, embalsamar insetos, e como um agente antisséptico eficaz (MACHADO et al., 2016). A composição química da própolis varia de acordo com fatores como a origem botânica, clima, fatores biológicos das abelhas e período de coleta (MACHADO et al., 2016; CASTRO et al., 2007). Sua coloração transcende do amarelo claro ao marrom escuro, perpassando pela coloração de tom avermelhado.

A própolis é utilizada em segmentos diversos, como na medicina, área de alimentos, cosméticos, entre outros, devido à sua alta atividade biológica. Relatos na literatura confirmam seu alto teor em ácidos fenólicos, flavonoides e aminoácidos, ação antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana antilipidêmica, anti-hiperglicêmica, citotóxica e anticancerígena (RIGHI et al., 2011; FROZZA et al., 2013; DIMKIĆ et al., 2016; CABRAL, et al., 2009).

Um dos principais produtores mundiais de própolis é o Brasil; sua produção é estimada em torno de 50 a 150 toneladas por ano, e 75 % desse total é exportado, especialmente para o Japão (92 % das exportações), o que significa 80% da demanda japonesa (PEREIRA et al., 2002; SEBRAE, 2014; SILVA et al., 2016). Segundo Silva et al. (2016), esta importância mercadológica da própolis se deve as suas características e sua gama de aplicabilidade. A própolis atualmente é utilizada em aplicações industriais de fácil acesso à população (xaropes, enxaguantes bucais, fitoterápicos, balas, etc.).

O setor de cosméticos vem explorando cada vez mais as propriedades da própolis. A capacidade de neutralizar radicais livres, sugere que o extrato de própolis tem potencial anti-envelhecimento e esta propriedade pode ser associada à genes da longevidade (EBADI & FAZELI, 2017). Outro fator é o apelo midiático ao consumo de produtos à base de fontes naturais (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2006).

O primeiro trabalho científico data o ano de 1908 e abrange as propriedades químicas e “composição” da própolis (HELFENBERG, 1908). Em 1968 surgiu o resumo da primeira patente, da Romênia, publicada no Chemical

Abstracts, utilizando a própolis para a produção de loções para banho (RO 48101) (PEREIRA et al., 2002). Porém, algumas inconveniências são relatadas pela utilização da própolis em cosméticos, principalmente ao odor e a coloração fortes, que influencia na caracterização do produto como um medicamento (SANTOS et al, 2015; MORI, 1997).

Devido ao interesse internacional pela própolis, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo prospectivo tecnológico em documentos de patentes para avaliar o cenário internacional da proteção de processos e produtos cosméticos associados a própolis.

2. METODOLOGIA

2.1. Busca de Patentes

A busca foi realizada na base de dados de acesso livre online do escritório Europeu de Patentes (*Espacenet*) que em sua plataforma disponibiliza aproximadamente 100 milhões de patentes depositadas em mais de 90 países (ESPACENET, 2018).

A metodologia adotada para a busca de anterioridade foi à combinação de palavras-chave, contidas no título ou resumo do documento, com Códigos de Classificação Internacional para identificação da matriz estudada. Através do editor CSVed (*Comma Separated Value*), os dados obtidos no Espacenet foram extraídos e exportados para uma planilha *Excel* (*Microsoft Office* 2016). Após o tratamento dos dados, os documentos protegidos foram analisados com base nos códigos de classificação presentes no documento, área de aplicação, ano de depósito, país depositante, instituição depositante no mundo.

2.2. Escopo

Para a busca dos documentos de patentes, foram utilizadas as palavras-chave *Propolis and extract** combinada com Códigos de Classificação Internacional (International Patent Classification – IPC) que especifica a categoria que o assunto de interesse está classificado. Os IPCs aplicados foram limitados aos códigos de interesse para o segmento cosmético: A61K, A61P e A61Q. A palavra-chave principal também foi combinada com o termo *Cosmetic**

(Tabela 1).

Tabela 1. Panorama mundial: resultado da pesquisa na base de patentes
Espacenet no período 1982 a 2017

<i>Propolis and extract*</i>	A61K	A61P	A61Q	<i>Cosmetic*</i>	Nº patentes localizadas	Nº patentes disponíveis
X					>1000	500
X	X				>1000	500
X		X			805	500
X			X		668	500
X				X	139	137

A61K: Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

A61P: Ciência médica ou veterinária e higiene.

A61Q: Uso específico de cosméticos ou preparações simples de higiene.

Ao combinar a palavra-chave “*Propolis and extract**” com os demais termos, foi expressiva a redução dos documentos encontrados. No total, foram localizados 5.407 documentos, entretanto, apenas um volume de 2.137 patentes estava disponível para consulta no *Espacenet*, isso devido ao período de sigilo que a maioria dos documentos se encontram e a limitação presente na plataforma, sendo possível consultar apenas 500 patentes por combinação de busca.

A Análise dos dados foi realizada a partir dos documentos de patente resultantes da combinação entre *Propolis and extract** e *cosmetic**. Desta forma o presente estudo realizou o tratamento e análise de 137 documentos de patentes disponíveis para consulta na base de dados do *Espacenet*.

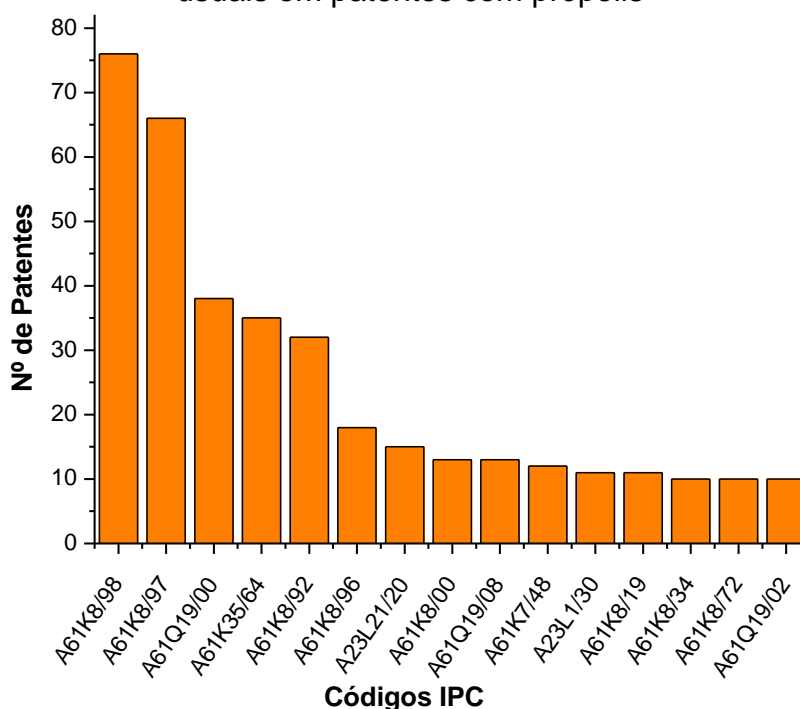
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Classificação Internacional de Patentes foi estabelecida pelo Acordo de Estrasburgo em 1971 e prevê um sistema hierárquico de símbolos para a classificação de Patentes de Invenção (PI) e de Modelo de Utilidade (MU), de acordo com as diferentes áreas tecnológicas a que pertencem (MACHADO et al., 2012).

Os códigos de classificação mais recorrentes nos documentos de patentes encontrados (Figura 1) foram da classe A61K (Preparações para

finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas), A61P (Ciência médica ou veterinária e higiene) e A61Q (Uso específico de cosméticos ou preparações simples de higiene) o que demonstra que a maioria dos documentos vinculados com a Seção A (Necessidades Humanas) da IPC.

Figura 1. Classes dos Códigos de Classificação Internacional (IPC) mais usuais em patentes com própolis



Fonte: Autoria própria (2018)

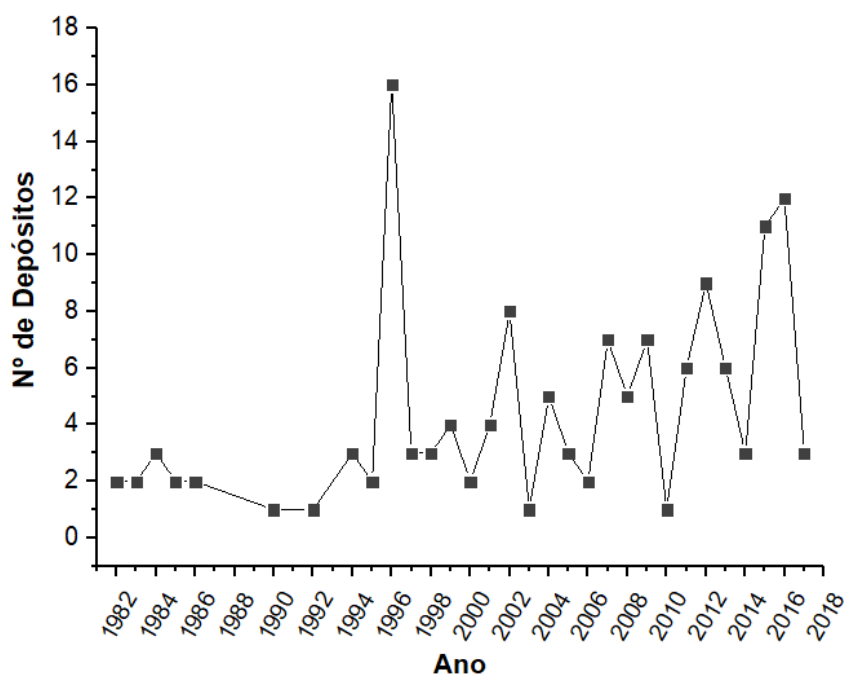
Legenda: A61K8/98: Produtos cosméticos ou de higiene, de origem animal. A61K8/97: Produtos cosméticos ou de higiene de origem de algas, fungos, líquenes ou plantas; dos seus derivados. A61Q19/00: uso específico de cosméticos ou produtos de higiene, preparados para o cuidado da pele; A61K35/64: Preparações medicinais contendo materiais ou produtos de reação com constituição indeterminada (insetos, p.ex. abelhas, vespas ou pulgas); A61K8/92: Cosméticos ou produtos de higiene contendo materiais, ou seus derivados, de constituição indeterminada. A23L21/20: Marmeladas, geleias ou similares; Produtos da apicultura; preparação ou tratamento; produtos de apicultura, p.ex. geleia real ou pólen; substitutos disso; A61K8/00: Cosméticos ou produtos de higiene semelhantes. A61Q19/08: Preparações para o cuidado da pele, anti-envelhecimento. A61K7/48: agentes para cuidados curativos e profiláticos para pele e cabelos. A23L1/30: Alimentos ou produtos alimentares contendo aditivos A61K8/19 Cosméticos ou produtos de higiene semelhantes contendo ingredientes inorgânicos. A61K8/34: Cosméticos ou produtos de higiene semelhantes com Álcool. A61K8/72: Cosméticos ou produtos de higiene semelhantes, contendo compostos macromoleculares orgânicos. A61Q19/02: Uso específico de cosméticos ou produtos de higiene para branqueamento químico ou clareamento da pele.

Os resultados demonstram que a principal utilização da própolis está relacionada a aplicações farmacológicas e/ou terapêuticas, alimentícia e cosmética devido principalmente à sua composição química, correspondendo a 90% dos códigos encontrados. Entretanto, apesar da menor incidência, as seções B (Separação e Mistura) e C (Química e Metalurgia) também foram

encontradas, com respectivamente 2 e 8% de aparição, o que evidencia que a tecnologia protegida está envolvida em diferentes áreas de aplicação.

A evolução dos depósitos de patentes relacionando a aplicação da própolis em produtos cosméticos não seguiu uma tendência linear desde o primeiro depósito até o atual ano. A primeira patente depositada envolvendo a própolis voltada ao setor de cosmético ocorreu em 1982. O depósito foi realizado pela empresa de cosmético japonesa *Shiseido Company Limited*, a patente resguarda os direitos a um produto específico para a pele e para os cabelos contra microrganismos patogênicos que causam a caspa, prurido e acne vulgar do couro cabeludo. Posteriormente, existe a patente depositada pelo canadense Zenon M. Sosnowski no Escritório Europeu. O objetivo protegido é um método de obtenção de própolis em pó e alguns produtos cosméticos, como máscara facial e creme para cutícula, além de preparados farmacêuticos. O número de patentes depositadas entre os anos de 1982 e 2017 em todas as bases consultadas é demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Evolução dos depósitos de patentes relacionadas à própolis desde 1982



Fonte: Autoria própria (2018)

Nas últimas décadas têm-se observado o crescimento da oferta e procura por produtos sob o rótulo de “naturais”, ganhando assim valor estratégico sobre

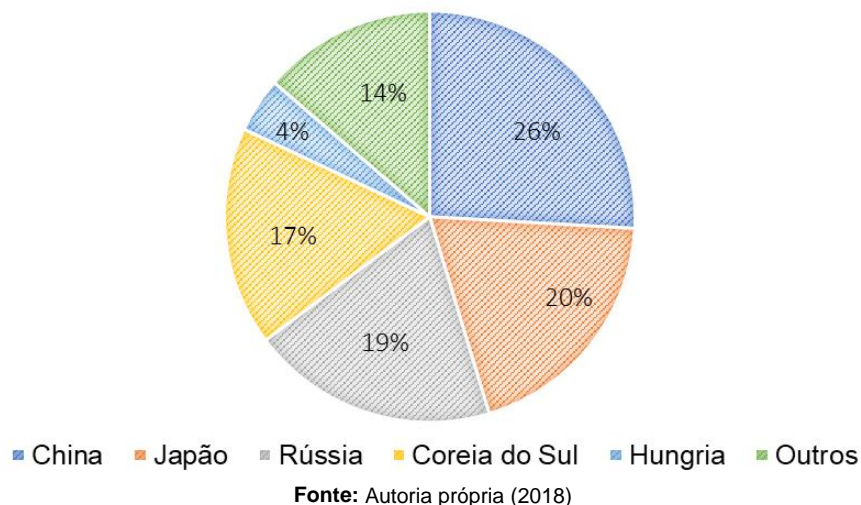
possíveis usos industriais e econômicos em diversos segmentos (MIGUEL, 2011). Como resultado dessas descobertas, no ano de 1996 foram registrados um total de 16 documentos de patentes depositados relacionando a própolis com o bem-estar neste ano. A própolis vem sendo largamente incorporada em cosméticos e dermocosméticos (PEREIRA et al., 2015).

Mesmo com o impacto da crise econômica nos Estados Unidos em 2008, o número de depósito de patentes manteve-se estável com relação ao seu ano anterior. Diferentemente do ano de 2010 que apresentou queda com relação aos três anos anteriores, isto foi devido a Síndrome do Colapso das Abelhas (*Colony Collapse Disorder* ou CCD), caracterizada como o desaparecimento repentino das abelhas ou à redução em curto período (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012). Este problema apícola teve sua constatação inicial em 2006 nos Estados Unidos, com relatos em países da América do Sul e do Norte e Europa (POTTS et al., 2010; OLIVEIRA, 2015).

A partir de 2011 os depósitos voltaram a ascender e os anos com maiores índices, posteriormente a 1996, foram 2015 e 2016 onde foram depositadas 11 e 12 patentes, respectivamente. Vale ressaltar que o perfil do mercado consumidor vem se modificando ao longo dos anos e o consumo de produtos, como cosméticos, derivados de fontes naturais é um novo perfil que os segmentos industriais devem estar atentos (MIGUEL, 2011)

Uma das patentes depositadas em 2017 pertence a Hao Qilin que protegeu seu produto, contendo própolis, na China. A invenção é um produto cosmético com óleo essencial de incenso que tem efeito calmante e embelezante; além de acalmar os nervos, ele remove as sardas. Em seu estudo, Matsuchita & Matsuchita (2014) sugerem o uso de dermocosméticos contendo a própolis como princípio ativo principal, devido às ações anti-inflamatória, antibacteriana, cicatrizante e imunomoduladora, entre outras, na prevenção e no tratamento da acne vulgar.

A China possui o maior percentual de documentos de patentes depositados. Do total de patentes encontradas, 26% são patentes chinesas, seguida do Japão (20%) e Rússia (19%), o que infere que estes países são grandes polos de pesquisas com própolis. Os principais países depositantes estão abaixo apresentados na Figura 3.

Figura 3. Depósito de patentes por país de origem

Resultados semelhantes foram relatados em estudo prospectivo sobre a aplicação de própolis em alimentos elaborado por Silva et al. (2016) que destacam Japão, China, Coreia e Rússia como detentores de patentes envolvendo própolis aplicada em alimentos, reforçando que estes países têm grande interesse na matriz em questão.

O cenário de países com maiores depósitos em seu território praticamente repete a ordem da Figura 3. China, Rússia, Japão e Coreia do Sul figuram como os países com maior número de recebimento de documentos de patentes em seu território por depositantes estrangeiros, pois, países com maiores depósitos de documento de patentes atraem os inventores que tendem a proteger suas invenções em larga extensão.

O Brasil, apesar de ser um grande produtor desta matriz, não é país de interesse para proteção devido ao pequeno número de patentes depositadas em relação aos demais países, como a China (MACHADO et al., 2012). O mesmo possui apenas dois documentos de patentes com proteção Estados Unidos e na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI).

4. CONCLUSÃO

Com base na análise dos documentos de patente encontrados referente à utilização da própolis em produtos de cosméticos, foi possível concluir que a China é o país com maior número de depósitos. O Brasil é incipiente em patente depositada no segmento estudado, ressalta-se que o país é um dos maiores

produtores mundiais de própolis. A prospecção tecnológica realizada possibilitou o conhecimento mais aprofundado do uso da matriz estudada a nível mundial e sua difusão no setor de cosméticos. Dessa forma, a prospecção enfatiza a importância da promoção da proteção dos produtos e processos para aumentar a inovação e a competitividade nas indústrias e centros de pesquisas e refletindo em maior destaque para o país depositante.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa e ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (Departamento Regional da Bahia) pelo apoio aos projetos de inovação.

REFERÊNCIAS

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; SEVERINO, R. M. N. B.; ALENCAR, M. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1523, 2009.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n.7, p. 1512, 2007.

DIMKIĆ, I.; RISTIVOJEVIĆ, P.; JANAKIEV, T.; BERIĆ, T.; TRIFKOVIĆ, J.; MILOJKOVIĆ-et al. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 94, n.1, p. 856, 2016.

EBADI, P.; FAZELI, M. Anti-photoaging potential of propolis extract in UVB-irradiated human dermal fibroblasts through increasing the expression of FOXO3A and NGF genes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, n.1, p. 47, 2017.

ESPECENET – European Patent Office. About ESPECENET. Disponível em <<https://www.epo.org/searching-for-patents/technical/espacenet.html#tab-1>>. Acesso em: 7 janeiro 2018.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n.1, p. 137, 2003.

HELFENBERG, K. D. The analysis of beeswax and propolis. **Chemiker Zeitung**, v. 2, n.1, p. 192-194, 1908.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; FRANCOY, T. M.; Nunes-Silva, P. Resumo da Semana dos Polinizadores III - EMBRAPA Semiárido, Petrolina, Brasil, 2012, 2012.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n.1, p. e0145954, 2016.

MATSUCHITA, H.L.P.; MATSUCHITA, A.S.P. Uso da Própolis na Prevenção e Tratamento da Acne Vulgar. **UNICIÊNCIAS**, v. 18, n.1, p. 19, 2014.

MIGUEL, L. M. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. **Revista Geográfica de América Central**, v. 1, n.1, p. 1-15, 2011.

MORI, A. L. P. M. Própolis – Identificação de flavonoides e ácido aromáticos em tintura. Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, M. O. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **ACTA Apícola Brasilica**, v. 3, n2, p. 1-6, 2015.

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

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, J. B. A.; SILVA, R. A.; et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.11, n.2, p. 1-21, 2015.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M.; JONES, R.; et al. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n.1, p. 15, 2010.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYERD, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n.13, p. 2363, 2011.

SANTOS, E. R.; BURATTI, M. V.; EICH, S. S.; CARSTENSEN, S. Utilização do Extrato de Própolis como Agente Antimicrobiano em Creme Hidratante. **Revista Eletrônica Multidisciplinar FACEAR**, v. 1, n.1, p. 1-14, 2015.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Boletim: O Mercado da Própolis. Disponível em <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf)>. Acesso em: 31 janeiro 2018.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; COSTA, S. S.; BARRETO, G. A.; PADILHA, F. F.; UMSZA-GUEZ, M. A. Aplicação de Extrato de Própolis em Produtos Alimentícios: Uma Prospecção Baseada em Documentos de Patentes. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n.5, p. 1251, 2016.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas Mediciniais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519, 2006.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Á. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n.9, p. 117, 2008.

CAPÍTULO III

Artigo II: Avaliação da Composição Química e Atividade Biológica de Extratos de Própolis Vermelha Brasileira Pré-Tratados com Ultrassom em Diferentes Condições

Avaliação da Composição Química e Atividade Biológica de Extratos de Própolis Vermelha Brasileira Pré-Tratados com Ultrassom em Diferentes Condições

Gabriele de Abreu Barreto^{1,2a}, Jamile Costa Cerqueira^{1b}, João Henrique de Oliveira Reis^{2b}, Letícia Amaral da Gama^{1b}, Jeancarlo Pereira dos Anjos^{1b}, Luciana Nalone Andrade^{3c}, Ricardo Guimarães Amaral^{4c}, Cláudia do Ó. Pessoa^{5c}, Maria Cláudia dos Santos Luciano^{5c}, Ricardo Wagner Dias Portela^{2b}, Josiane Dantas Viana Barbosa^{1b}, Marcelo Andrés Umsza-Guez^{2a}, Bruna Aparecida Souza Machado^{1a*}

¹Centro Universitário SENAI/CIMATEC, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI, Salvador, Bahia, Brazil, ²Universidade Federal do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, ³Instituto de Pesquisa e Tecnologia, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil, ⁴Universidade Federal do Estado de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, ⁵Universidade Federal do Estado do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^aEsses autores contribuíram igualmente para este trabalho.

^bEsses autores também contribuíram igualmente para este trabalho.

^cEsses autores também contribuíram igualmente para este trabalho.

* Autor Correspondente

brunamachado17@hotmail.com

Abstract

The synergy of conventional methods with the new available technologies allows to optimize the extraction of active compounds from natural matrices such as propolis. The objective of this study was to quantify the total phenolic compounds, flavonoids and specific compounds, as well as to evaluate the antioxidant activity in vitro, cytotoxic action against five tumor lines (HCT-116, HL-60, PC3, SF295 and SNB19) and antimicrobial activity of extracts of Brazilian red propolis obtained by pre-treated ethanol extraction with ultrasound technology under different conditions. The total content of phenolic compounds did not show significant differences between the extracts, however, the results of flavonoid analyzes and antioxidant activity showed significant differences. The

chromatographic analysis determined the influence of the ultrasound treatment in obtaining two components of interest, formononetin and kaempferol, evidencing the importance of the application of this technology in obtaining extracts with the highest biotechnological potential. All extracts showed high antibacterial activity against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The cytotoxic activity of eight of the ten extracts was greater than 75% compared to four tumor lines. The E: 50-20 extract presented a high antiproliferative effect against the five tumor lines evaluated, high antioxidant activity and high antibacterial activity, which was associated to the higher concentration of formononetin and kaempferol. Therefore, the influence of the ultrasonic technology associated with different temperatures in the production of ethanolic extracts of red propolis with high biological potential was evidenced.

Keywords: bioactive compounds, cytotoxicity, formononetin, *Dalbergia ecastaphyllum*, kaempferol.

Resumo

A sinergia dos métodos convencionais com novas tecnologias disponíveis possibilita otimizar a extração de compostos ativos a partir de matrizes naturais, como a própolis. Este estudo teve como objetivo quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e compostos específicos, bem como, avaliar a atividade antioxidante in vitro, ação citotóxica contra cinco linhagens de células tumorais (HCT-116, HL-60, PC3, SF295 e SNB19) e atividade antimicrobiana de extratos de própolis vermelha brasileira obtidos por extração etanólica pré-tratadas com a tecnologia de ultrassom em diferentes condições. O conteúdo total de compostos fenólicos não apresentaram diferenças significativas entre os extratos, entretanto, os resultados das análises de flavonoides, atividade antioxidante demonstraram apresentaram diferenças significativas. A análise cromatográfica determinou a influência do tratamento com ultrassom na obtenção de dois componentes de interesse, a formononetina e kaempferol, evidenciando a importância da aplicação dessa tecnologia para obtenção de extratos com o maior potencial biotecnológico. Todos os extratos demonstraram alta atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A atividade citotóxica de oito dos dez extratos foi superior a 75% frente a quatro linhagens tumorais. O extrato E:50-20 apresentou elevado efeito

antiproliferativo frente as cinco linhagens de células tumorais avaliadas, alta atividade antioxidante e elevada atividade antibacteriana, o que foi associado com a maior concentração de formononetina e kaempferol. Dessa forma, comprovou-se a influência da tecnologia de ultrassom associada a diferentes temperaturas na obtenção de extratos etanólicos de própolis vermelha com alto potencial biológico.

Palavras-Chave: compostos bioativos, citotoxicidade, formononetina, *Dalbergia ecastaphyllum*, kaempferol.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um biomaterial produzido por abelhas (*Apis mellífera*) utilizado no isolamento térmico, preenchimento de lacunas e assepsia da colmeia. É normalmente constituído de bálsamo vegetal (50%), cera (30%), óleos essenciais e aromáticos (10%), pólen (5%) e outras substâncias (5%). Entretanto, diversos estudos demonstram que a concentração dessas frações no produto final depende da origem botânica, geográfica e sazonalidade do material recolhido durante a coleta do pólen, bem como, de fatores biológicos das abelhas, já que, durante a elaboração da própolis enzimas contidas na saliva desses insetos são adicionadas ao exsudado vegetal (KALOGEROPOULOS et al., 2009; BANKOVA et al., 2000; RIGHI et al., 2013; ZORDI et al., 2014).

A composição química da própolis brasileira é bastante diferente daquelas obtidas em países europeus, em especial devido à diversidade botânica e de espécies de abelhas, as quais no Brasil são em sua maioria um cruzamento de espécies europeias e africanas (SALATINO et al., 2005). Em território brasileiro, 13 diferentes tipos de própolis já foram classificados baseando-se nas características físico-químicas (PARK et al., 2002; TRUSHEVA et al., 2006; BUENO-SILVA et al., 2008; FRANCHI-JR et al., 2012), e, dentre os tipos, a própolis vermelha foi à última a ser classificada (tipo 13), sendo originária dos manguezais do Norte e Nordeste do Brasil (ALENCAR et al., 2007). O marmelo-do-mangue (*Dalbergia ecastaphyllum*), árvore típica da faixa litorânea do Nordeste, possui um exsudado de tom avermelhando que é responsável pela coloração desta variedade de própolis (FRANCHI-JR et al., 2012; BATISTA et al., 2018, SENA-LOPES et al., 2018). Por outro lado, López et al. (2014)

mostraram que provavelmente uma segunda espécie vegetal participa como uma das principais fontes de resinas para a própolis vermelha no Brasil. A própolis vermelha brasileira produzida no Estado de Alagoas, localizado na região nordeste do país, e utilizada neste estudo, possui a certificação de denominação de origem (indicação geográfica) devido ao reconhecimento científico de sua composição química diferenciada (ALMEIDA et al., 2017; WILKINSON et al., 2017).

A própolis vermelha tem mostrado várias propriedades biológicas, por exemplo, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, imunomoduladora e antiparasitária (FROZZA et al., 2013; CAVENDISH et al., 2015; PIPPI et al., 2015; SANPA et al., 2015; NEVES et al., 2016; BUENO-SILVA et al., 2017; SIHERI et al. 2016; SILVA et al., 2017), relacionadas à sua composição química diferenciada, complexa e variável. Seus principais constituintes são os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, que possuem ampla faixa terapêutica (TELES et al., 2015; RUFATTO et al., 2017). A ação biológica da própolis vermelha é desempenhada principalmente por duas isoflavonas, a formononetina e o kaempferol, que atuam em sinergia com os demais compostos. A formononetina é considerada como um dos biomarcadores de própolis vermelha e diversos estudos confirmaram a sua presença em extratos obtidos dessa matriz (BUENO-SILVA et al., 2008; TRUSHEVA et al., 2006), enquanto que o kaempferol apresenta vasta aplicação em medicina tradicional chinesa devido a suas propriedades como antioxidante e eliminação de radicais livres (MOHAMMADI & MOEENI, 2015).

A própolis bruta não pode ser utilizada como matéria-prima e por isso deve ser purificada. O processo deve remover o material ceroso e preservar a fração de polifenóis, que são considerados os que mais contribuem para os efeitos biológicos quando comparado aos outros constituintes da própolis (ANDRADE et al., 2017). Dessa forma, o método de extração industrial comumente empregado para obtenção de biocompostos provenientes de própolis é a infusão, onde a amostra fica submersa em um solvente extrator pelo período de dias, semanas e ou meses, o que demanda muito tempo em escala industrial e apresenta baixo rendimento. A infusão etanólica de forma isolada não é um método suficiente para a obtenção de extratos com alta concentração de compostos com funções biologicamente ativas (SILVA et al., 2017; GRAIKOU et

al., 2016; DOI et al., 2017). Visando melhor aproveitamento das matrizes ricas em substâncias fitoquímicas, tem-se como alternativa a utilização da tecnologia de ultrassom (também denominada de sonificação) como pré-tratamento ao processo de extração.

Diferentes estudos demonstram que o ultrassom é uma tecnologia-chave para atingir o equilíbrio entre a extração química e aquela dita "verde" ou sustentável (que não produz resíduos poluentes), sendo atualmente aplicada em vários processos na indústria de alimentos (CHEMAT et al., 2017; DING et al., 2018; ZHANG et al., 2014), proporcionando extrações mais completas e com alta reprodutibilidade, caracterizadas por redução do uso de solvente orgânico, processamento simplificado e maior pureza do produto final (METHEREL et al., 2009). É importante destacar que a literatura é escassa em relação à aplicação da tecnologia de ultrassom para a obtenção de extratos de própolis. Taddeo et al. (2016) obtiveram 28% a mais de biocompostos em extratos de própolis italiana quando utilizaram a exposição ultrassônica associada com a extração com solvente convencional. Briones-Labarca et al. (2015) realizaram estudo visando a obtenção de compostos bioativos provenientes de sementes de mamão chileno, e aplicaram a sonificação como pré-tratamento do processo de extração e identificaram aumento variando de 6 a 21%, aproximadamente, na obtenção de compostos de interesse quando comparado com os extratos obtidos pelo método convencional.

Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da tecnologia de ultrassom utilizando diferentes tempos e temperaturas no processo como pré-tratamento para a obtenção de extratos de própolis vermelha do Brasil. Para isso, foram comparados os extratos obtidos nas diferentes condições em relação ao perfil químico, atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material e Reagentes

Foram utilizados metanol, DMSO (Sigma-Aldrich Chemical Co. - St. Louis, MO, EUA), ácido acético (Synth) todos grau HPLC e álcool etílico P.A. (Anidrol). Utilizou-se filtro de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm (SLCR025NS, Millipore Co., Bedford, Massachusetts, EUA). Os padrões rutina hidratada (CAS

number 207671-50-9), kaempferol (CAS number 520-18-3), formononetina (CAS number 485-72-3), ácido gálico (CAS number 149-91-7), quercetina (CAS number 117-39-5), ácido p-cumárico cristalino (CAS number 501-98-4), epicatequina (CAS number 490-46-0), ácido cafeico (CAS number 331-39-5), catequina (CAS number 7295-85-4) e 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (CAS number 1898-66-4) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e ácido trans-ferúlico (CAS number 537-98-4) da Fluka.

2.2. Obtenção e Processamento da Própolis

Aproximadamente 1.000 g de amostra de própolis vermelha foi adquirida de um apiário localizado em Marechal Deodoro, Estado de Alagoas, Brasil. A amostra foi triturada em moinho (Cadence-Brasil) e peneirada, objetivando obter um tamanho de partícula adequado (diâmetro 52-92 μm) para aumentar a área superficial durante o processo de extração e maior homogeneidade do material. A amostra inicial foi fracionada em pequenas porções de 100 gramas e mantidas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tubos Falcon, protegidos com papel laminado e em condições atmosféricas inertes (N_2) a fim de evitar a degradação do material.

2.3. Obtenção dos Extratos de Própolis Vermelha

Tendo como base a metodologia de Chen et al. (2015), 2 g de própolis foram homogeneizadas com etanol a 80% (25 mL) e colocadas em sonicador (50-60 Hz, 135 W RMS – Quimis, Brasil), utilizando diferentes condições de sonicação, conforme apresentado na Tabela 1. Ao final do processo, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz por um período de 7 dias, com agitações periódicas e manuais. Em seguida, os extratos foram centrifugados (Fanem – 206-BL, Brasil) a 5.000 RPM por 11min e o sobrenadante obtido foi filtrado em papel filtro qualitativo (80g) e posteriormente seco a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa com circulação de ar (Quimis, Q314M222, Brasil) até normalização do peso. Uma amostra controle denominada de extrato sem tratamento (E:ST) foi obtida nas mesmas condições, entretanto sem a aplicação do ultrassom, e utilizada como controle nesse estudo.

Tabela 1. Condições empregadas para obtenção dos extratos de própolis vermelha aplicando ultrassom e controle (Frequência de 50-60 Hz).

Código da amostra	Temperatura (°C)	Tempo de sonicação (min)
E:ST (controle)	Ambiente (± 25 °C)	Não aplicado
E:25-10	25	10
E:25-20	25	20
E:25-30	25	30
E:50-10	50	10
E:50-20	50	20
E:50-30	50	30
E:75-10	75	10
E:75-20	75	20
E:75-30	75	30

2.4. Análise Cromatográfica dos Extratos

Para a identificação e quantificação dos compostos ácido gálico, ácido cafeico, ácido trans-ferulico, ácido *p*-coumárico, catequina, epicatequina, formononetina, kaempferol, quercetina, rutina hidratada, nos extratos de própolis, inicialmente foram preparadas soluções de 10 mg.L⁻¹, os quais foram dissolvidos em metanol e colocados em banho ultrassom (TECNAL – São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Soluções metanólicas de extratos de própolis a 1,0 mg.mL⁻¹ obtidas nas diferentes condições de processamento também foram preparadas. As amostras foram filtradas em filtro de membrana de celulose de 0,45 µm (Millipore) para injeção subsequente em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu, LC-20AT, Japão) equipado com injetor automático e detector de arranjo de diodo (DAD) (Shimadzu, SPD-M20, Japão). A separação cromatográfica foi adaptada tendo por base o método proposto por Salgueiro & Castro (2016) e Cabral et al. (2009). A coluna NUCLEODUR® 100-5 C18 ec (150x4 mm ID; tamanho de partícula de 5 µm) foi utilizada em conjunto com uma pré-coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6x12,5 mm (Agilent, USA).

As condições de análise foram realizadas com um gradiente de eluição com uma fase móvel de ácido acético a 5% e metanol em diferentes proporções e com tempo de análise total de 42 minutos (de 0 a 35 min (0-92% B); 35 a 40 min (92-0% B); 40 a 42 min (0% B)). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo de 1 mL.min⁻¹. O equipamento foi operado à temperatura ambiente (25±2 °C). A

leitura do detector de arranjo de diodos foi ajustada na faixa de 190 a 800 nm e a aquisição cromatográfica foi definida a 300 e 320 nm. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do tempo de retenção e do espectro ultravioleta entre as amostras e os padrões (Tabela 2). Com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, foi realizada uma validação de acordo com as metodologias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2011). Esta análise foi realizada de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e limites de quantificação.

Tabela 2. Parâmetros de identificação e quantificação por HPLC-DAD dos compostos ativos dos extratos de própolis vermelha obtidos sob diferentes condições.

Padrões	t _R (min)	λ (nm)	Faixa de trabalho (mg.L ⁻¹)	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Ácido aálico	2,26	280	1,0 – 12,5	0,92	3,05
Ácido Cafeico	8,13	30	1,0 – 15,0	0,82	2,73
Ácido Trans-ferulico	11,38	320	0,5 – 12,5	0,28	0,92
Ácido <i>p</i> -coumárico	10,36	300	1,0 – 15,0	0,82	2,72
Catequina	6,42	280	1,0 – 15,0	0,81	2,68
Epicatequina	8,44	280	0,5 – 15,0	0,28	0,93
Formononetina	19,46	300	0,5 – 12,5	0,31	1,02
Kaempferol	17,53	320	0,5 – 12,5	0,12	0,41
Quercetina	15,30	320	0,5 – 12,5	0,21	0,71
Rutina hidratada	11,00	320	0,5 – 12,5	0,27	0,91

TR=tempo de retenção; λ=comprimento de onda; LD=limite de detecção; LQ=limite de quantificação.

2.5. Compostos Fenólicos Totais dos Extratos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando a metodologia de Singleton & Rossi (1965) e Singleton et al. (1999) baseada na reação com o reagente Folin-Ciocalteu, que está associado ao aparecimento de uma coloração azul devido à oxidação de fenóis em meio básico (PESCHEL

et al., 2006). Inicialmente, a reação foi preparada com uma alíquota de 0,5 mL de extrato de própolis dissolvido em etanol (95%) com concentração final de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, solução aquosa de Folin-Ciocalteu a 10% (2,5 mL) e carbonato de sódio a 7,5% (2,0 mL). Os frascos contendo a mistura produzida foram aquecidos em banho termoregulado a 50 °C por 5min (Marconi, M127, Brasil), e posteriormente, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro (PerkinElmer, LAMBDA 25 UV/Vis Systems, Washington-USA) a 765 nm utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e volume de 3,5 mL. Por fim, a quantidade de fenólicos totais foi expressa como equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mgGAE}\cdot\text{g}^{-1}$) através da determinação de uma curva de calibração ($y=0,0096x-0,0311$, $R^2=0,9994$) utilizando soluções conhecidas de padrão ácido gálico (de 12 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), nas mesmas condições.

2.6. Conteúdo de Flavonoides dos Extratos

O teor total de flavonoides foi determinado de acordo com o método proposto por Meda et al. (2005) com adaptações. Inicialmente, 2,0 mL de cada extrato ($0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram transferidos para o tubo de ensaio e adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2%. As amostras foram homogeneizadas em um vortex (IKA, Lab Dancer, Alemanha) e deixadas sob o abrigo da luz por um período de 30 min. O espectrofotômetro (PerkinElmer, LAMBDA 25 UV/Vis Systems, Washington-USA) foi ajustado no comprimento de onda de 415 nm para leitura da absorvância. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas de quercetina (de 5 a 105 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para elaborar uma curva padrão ($y=0,0271x-0,014$, $R^2=0,9994$). A quantidade de flavonoides totais foi expressa como equivalentes de quercetina por grama de amostra ($\text{mgEQ}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.7. Atividade Antioxidante por DPPH (1,1-diphenil-2-picrilhidrazil) dos Extratos

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando o método do 2,2-difenil-1-picrilidrazil reativo (DPPH) de acordo com Brand-Willian et al. (1995) e Molyneux (2004) com adaptações. Foram preparadas seis diluições dos extratos (10 a 85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cada uma em triplicata. Uma alíquota de 1,0 mL de

cada diluição de extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL da solução etanólica (99%) do radical DPPH• (0,004%). Após 30 min de incubação sob o abrigo de luz (25 °C), a redução do radical livre DPPH foi medida através da leitura de absorbância a 517 nm (curva de calibração $y = 0,897x - 4,5$, $R^2 = 0,9955$) em espectrofotômetro (PerkinElmer, LAMBDA 25 UV/Vis Systems, Washington-USA).

A capacidade para sequestração de radicais livres foi expressa como a percentagem de inibição de oxidação do radical e calculada de acordo com a Equação 1. Procedimento similar foi realizado substituindo a amostra de extrato por etanol, obtendo dessa forma o branco. O valor de CE_{50} (concentração efetiva do extrato para sequestrar 50% de radical DPPH•) foi calculado com base na equação da reta obtida das concentrações de extratos e respectivas percentagens de sequestro do radical DPPH•.

% Sequestro = $100 - [(absorbância\ final\ da\ amostra \times 100) / absorbância\ branco]$
(1)

2.8. Atividade Antimicrobiana dos Extratos

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2000) e Koo et al. (2000) através da determinação da MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) e MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 1775) (gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas de Bactérias do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manguinhos – Rio de Janeiro – Brasil). As amostras bacterianas, obtidas de estoques congelados a -20 °C, foram semeadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, 0316M2, Brasil) a 37 °C por 24h, sendo, em seguida, cultivadas em placas BHI ágar, para preparação do inóculo.

A biomassa foi removida e suspendida em solução de NaCl (0,89%) estéril, homogeneizando as suspensões bacterianas até obter turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em seguida, 30 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 30 mL do meio BHI. Para a determinação do MIC, o inóculo inicial foi de $1-2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, e as concentrações dos extratos variaram de 1600 a 3.125 µg.mL⁻¹. Os resultados

foram observados após a adição de 40 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) e reincubação a 36 °C por 2h. Coloração azul nas microplacas não mostraram crescimento dos microrganismos investigados enquanto que a coloração rosa evidenciava crescimento bacteriano. Por fim, foram semeadas na superfície do ágar BHI as amostras que não indicaram presença de crescimento de bactérias nos poços. Foi definida como MBC a menor concentração que não permitiu nenhum crescimento bacteriano visível em ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração dos extratos testados.

2.9. Citotoxicidade *in vitro* dos Extratos

Para a análise de citotoxicidade *in vitro* dos diferentes extratos foram utilizadas as linhagens tumorais HL-60 (leucêmica), PC3 (carcinoma de próstata), SF295 (glioblastoma), SNB19 (glioblastoma) e HCT-116 (carcinoma de cólon) de origem humana (*Homo sapiens*) (Instituto Nacional do Câncer – Estados Unidos). As linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) completo com 10% de fetal bovine serum (FBS) (Gibco®) e 1% de solução antibiótica de penicilina/estreptomicina e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ (THERMO SCIENTIFIC, 3425, Massachusetts, EUA). Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células reduzissem a aderência as paredes das garrafas.

Para determinação do potencial citotóxico dos extratos frente as linhagens, foi utilizado o método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983; AMARAL et al., 2015) com distribuição em placas de 96 poços (100 µL.poço⁻¹) na concentração de 0,1x10⁶ células.mL⁻¹. Após 24h, os extratos foram dissolvidos em 0,001% de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados nos poços com concentração final de 50 µg.mL⁻¹. O experimento foi realizado em três momentos independentes em triplicata, utilizando a doxorrubicina 0,25 µg.mL⁻¹ e o DMSO 0,001% como controles positivo e negativo, respectivamente (incubação por 72 horas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C). No final da incubação, as placas foram centrifugadas (15g/15min) a 4°C e os sobrenadantes removidos. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 µg.mL⁻¹), e as placas foram incubadas por 3h. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3 g.min⁻¹) a 4 °C, os sobrenadantes descartados e os precipitados ressuspensos

em 150 μL de DMSO estéril puro. Para a quantificação de formazan por células viáveis a absorbância foi lida usando leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Packard, ON, Canadá) a 595 nm. Todos os valores foram apresentados como concentração inibitória capaz de provocar 100% do seu efeito máximo.

2.10. Análise Estatística

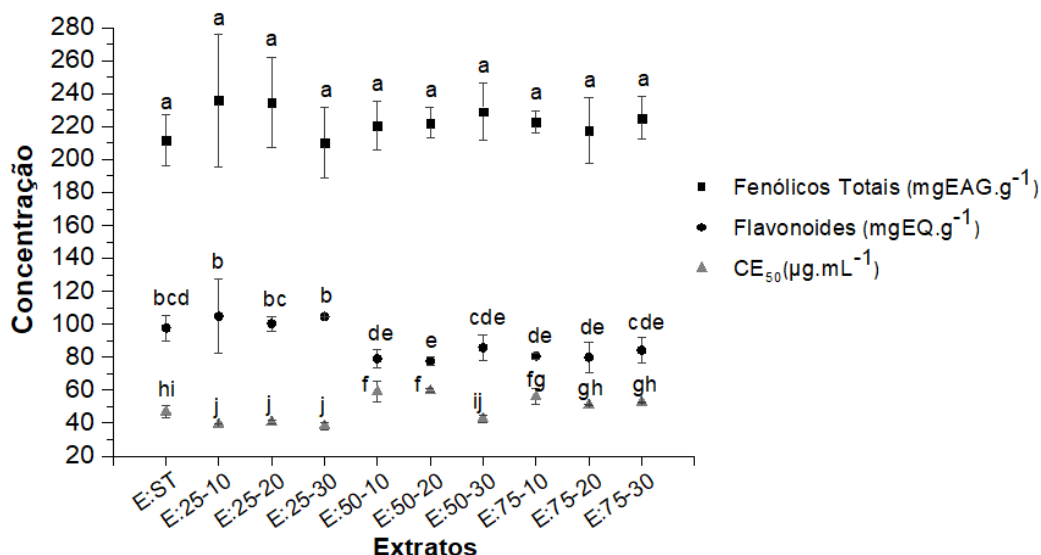
Os resultados deste estudo foram expressos na forma de média \pm desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o programa Statistica® 6.0 da StatSoft (Tulsa, EUA). Foi também realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (95% confidence level) com o objetivo de identificar as diferenças significativas entre as médias obtidas para cada ensaio ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos Fenólicos Totais, Flavonoides e Atividade Antioxidante dos Extratos

A quantificação do teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos de própolis vermelha obtidos nas diferentes condições empregadas (Tabela 1) estão apresentados na Figura 1. O teor de compostos fenólicos variou de $210,22 \pm 21,66$ (E:25-30) a $235,88 \pm 40,07$ mgEAG.g⁻¹ (E:25-10) entre as amostras, sem diferenças significativas ($p > 0,05$). O teor de flavonoides variou de $77,89 \pm 2,53$ mgEQ.g⁻¹ (E:50-20) a $104,79 \pm 22,5$ mgEQ.g⁻¹ (E:25-10), enquanto que a capacidade antioxidante (CE₅₀) variou de $38,28 \pm 2,23$ (E:25-30) a $59,71 \pm 1,21$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E:50-20), com diferenças significativas entre os extratos ($p < 0,05$) tratados e controle.

Figura 1. Quantificação do teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (CE₅₀) dos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições.



Menores valores de CE₅₀ indicam melhor capacidade antioxidante. Valores que apresentam a mesma letra, na mesma análise, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança. Média da análise obtida por triplicada ($n = 3$).

De forma geral, todas as amostras apresentaram valores de compostos fenólicos totais superiores a 200 mgEAG.g⁻¹, sem diferenças significativas ($p > 0,05$). Dessa forma, não foi identificada nenhuma influência no emprego de diferentes condições de temperatura e tempo de exposição do ultrassom em relação a obtenção dos compostos fenólicos totais nos extratos. Da mesma forma, quando comparado o controle com as amostras tratadas por ultrassom (independente do tipo de tratamento empregado), não houve diferença significativa no conteúdo total de fenólicos, demonstrando que a aplicação dessa tecnologia não influencia de forma direta na obtenção do teor desses compostos quando determinado no seu conteúdo total.

Estudos com própolis vermelha do Brasil (origem Sergipe) relatam valores entre 151,55±1,95 a 300±0,01 mgEAG.g⁻¹ em extratos obtidos por diferentes métodos de extração empregando solventes orgânicos e/ou fluidos supercríticos (FROZZA et al., 2013; TIVERON et al., 2016; MACHADO et al., 2016). Própolis vermelha da mesma origem geográfica também foram estudadas por Cabral et al. (2009) e por Machado et al. (2016) que identificaram valores inferiores ao deste estudo para compostos fenólicos nos extratos obtidos por extração convencional (etanólica) e por extração com CO₂ supercrítico, respectivamente. Ressalta-se que, as variações na concentração final de compostos fenólicos podem estar relacionadas às diferenças no processo de extração, bem como, a sazonalidade e origem geográfica das amostras (CABRAL et al., 2009; SIMÕES-

AMBROSIO et al., 2010; TADDEO et al., 2016; ZABAIYOU et al., 2017). Valores semelhantes ao deste estudo foram relatados por Alencar et al. (2007) ($232 \pm 22,3$ mgEAG.g⁻¹) para amostras de própolis vermelha de mesma origem, entretanto, utilizando condições de extração diferentes, como por exemplo, uma proporção de solvente quatro vezes superior em relação a quantidade de amostra empregada neste estudo.

Em relação as diferenças identificadas para flavonoides e atividade antioxidante (DPPH), observou-se um aumento de até 7% na concentração dos flavonoides e redução de 23% no CE₅₀ nos ensaios de atividade antioxidante quando comparado os extratos obtidos com a aplicação do ultrassom e o controle. Dessa forma, a aplicação do pré-tratamento com ultrassom foi eficaz para obtenção de extratos de própolis vermelha com maior capacidade antioxidante tendo em vista os menores valores de CE₅₀ identificados.

Os extratos obtidos nas mesmas condições de temperatura, independentemente do tempo de exposição ao ultrassom, não apresentaram diferenças significativas em relação ao teor de flavonoides, evidenciando que exposições prolongadas não contribuem para aumentar a extração desses compostos. Na temperatura de 25 °C (mesma temperatura usada para obtenção do extrato controle), observou-se que a aplicação do ultrassom não contribuiu de forma significativa para aumentar a obtenção de flavonoides totais nos extratos. Dessa forma, o aumento da extração destes compostos pode estar relacionado com a aplicação de baixas temperaturas associada a uso de solventes adequados tendo em vista a sensibilidade desses compostos a elevadas temperaturas (SASIDHARAN et al., 2011).

A determinação do teor de flavonoides é um dado importante para ser quantificado em extratos de própolis tendo em vista que é um parâmetro de controle de qualidade observado nas legislações de países como o Brasil, Argentina e Suíça (BRASIL, 2001). Valores inferiores ao deste estudo para flavonoides foram determinados por Mendonça et al. (2015) e Andrade et al. (2017) para extratos de própolis vermelha de mesma origem geográfica tratados com ultrassom ($0,31 \pm 0,01$ e $31,48 \pm 0,50$ mgEQ.g⁻¹, respectivamente).

Em relação à atividade antioxidante, todos os extratos obtidos a 25 °C (E:25-10, E:25-20 e E:25-30), independentemente do tempo de pré tratamento ultrassônico, apresentaram os menores valores de CE₅₀, e conseqüentemente,

as melhores capacidades antioxidantes, tendo em vista que quanto menor a concentração efetiva, menor será a quantidade de extrato requerida para oxidar 50% do radical DPPH• disponível na reação (KASIOTIS et al., 2017). Esses resultados indicam que quanto maior o teor de flavonoides nos extratos, maior a capacidade antioxidante da amostra avaliada (representado por menor CE_{50}), confirmando que esses compostos são responsáveis pela atividade antioxidante da própolis (FROZZA et al., 2013; Schmidt et al., 2014; Sulaiman et al., 2011; Atala et al., 2017; MOUHOUBI-TAFININE et al., 2017; ZABAIYOU et al., 2017). Freires et al. (2016) avaliaram extratos etanólicos de própolis vermelha de mesma origem geográfica e relatam valores superiores de CE_{50} (44 a 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

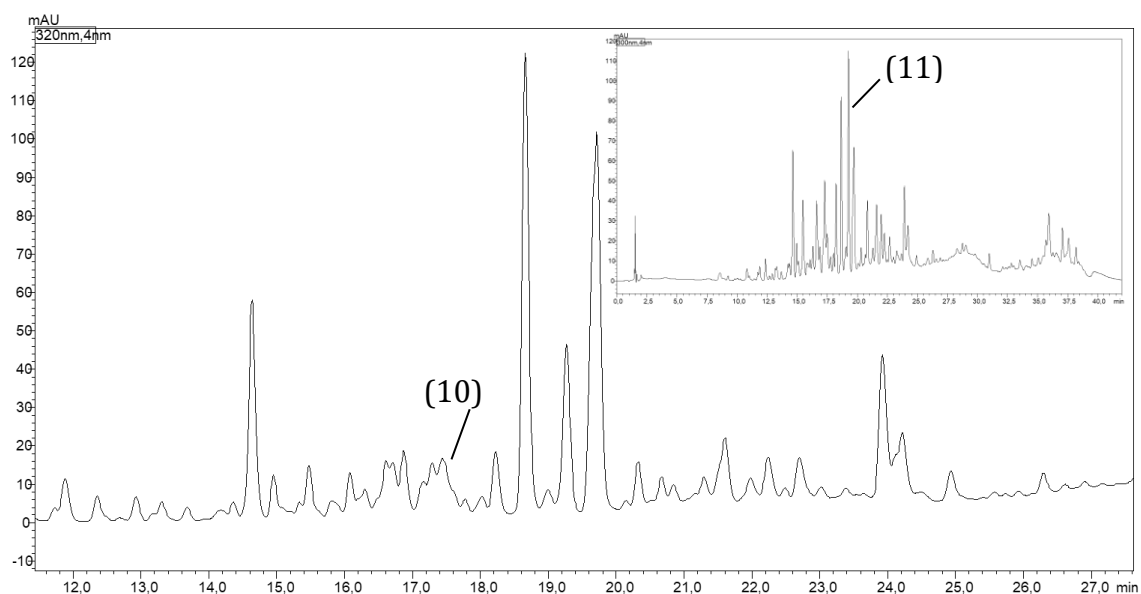
A exposição ultrassônica pode contribuir para melhorar a liberação de compostos intracelulares devido a facilidade no rompimento das células aumentando a disponibilidade quantitativa desses compostos (MARTINEZ-PADILHA et al., 2018). Conforme mencionado, a variação no teor dos compostos antioxidantes totais identificados quando comparado com os resultados obtidos em outros estudos pode estar relacionada a origem geográfica, sazonalidade e método de extração empregado. Entretanto, avaliando estudos com extratos de própolis vermelha obtidos por outros métodos de extração e de mesma origem geográfica (HUANG et al., 2009; ZANG et al., 2011; DE MENDONÇA, 2015; MACHADO et al., 2016), identifica-se que a aplicação do ultrassom pode ser o fator responsável pela obtenção de extratos com maior capacidade antioxidante (Figura 1). De forma geral, os extratos obtidos na menor temperatura (25 °C) apresentaram os maiores teores dos parâmetros investigados, o que justifica que a utilização de elevadas temperaturas contribui para a redução da obtenção desses compostos de interesse.

3.2. Quantificação dos Compostos por HPLC

O método HPLC empregado apresentou muitos picos cromatográficos nos extratos de própolis vermelha, demonstrando a complexidade das análises para essa matéria-prima, mas foi possível obter uma boa resolução entre os picos utilizando o método cromatográfico proposto (Figura 2), com grande possibilidade de identificar novos compostos. Amostras de própolis vermelha do Brasil foram estudadas e várias classes de substâncias foram identificadas em

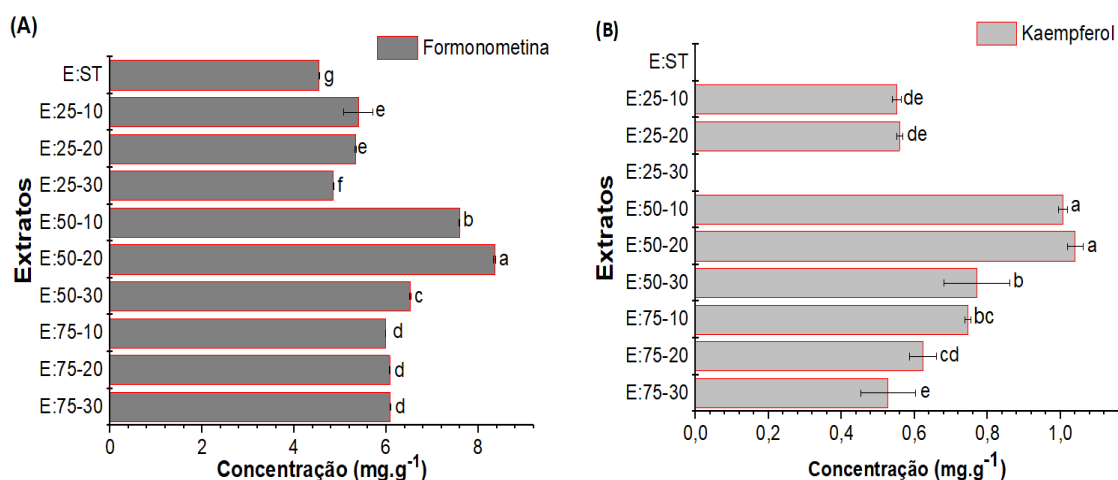
sua composição, tais como, isoflavonoides, flavonoides, benzofenonas preniladas e terpenos (AWALE et al., 2008; BARTH & LUZ, 2009; PICCINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2011). A própolis vermelha do estado de Alagoas, no Brasil, é um caso atípico em relação à presença de isoflavonoides, apresentando dessa forma uma composição variada (ALMEIDA et al., 2017).

Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato de própolis vermelha (amostra E:50-20): kaempferol (10), formonometina (11).



Em relação a identificação e quantificação dos dez compostos de interesse (Tabela 2) nos extratos de própolis vermelha, apenas a formononetina esteve presente em todos os extratos, e, o kaempferol foi identificado e quantificado em oito das dez amostras investigadas. Não possível quantificar o kaempferol na amostra controle (E:ST) e na amostra E:25-30 tendo em vista que esteve composto apresentou-se abaixo do limite de quantificação (resultado confirmado com a repetição da análise em triplicata). Os demais compostos não foram quantificados devido estarem abaixo do limite de quantificação, detecção ou ausência nos extratos. Na Figura 3 é apresentado os valores quantificados nos extratos para a formononetina e kaempferol. Desta forma, a própolis vermelha utilizada neste estudo tem seu perfil químico confirmado por HPLC e a formononetina foi o composto mais abundante (BUENO-SILVA et al., 2016; CAVENDISH et al., 2015).

Figura 3. Quantificação do teor de (A) formononetina e (B) kaempferol por cromatografia líquida de alta eficiência nos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições.



Menores valores de CE50 indicam melhor capacidade antioxidante. Valores que apresentam a mesma letra, na mesma análise, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança. Amostras E:ST e E:25-30 apresentaram valores abaixo do limite de quantificação para o kaempferol. Média da análise obtida por triplicada ($n = 3$).

A concentração de formononetina variou de $4,54 \pm 0,01$ (E:ST) a $8,36 \pm 0,25$ mg.g^{-1} (E:50-20) com diferenças significativas entre os extratos e controle. Conforme esperado, por ser um biomarcador específico de própolis vermelha brasileira (BEZERRA et al., 2017) a formononetina esteve presente em valores significativos em todos os extratos, independente das condições de extração empregadas. A concentração de kaempferol variou de $0,53 \pm 0,07$ (E:75-30) a $1,04 \pm 0,02$ mg.g^{-1} (E:50-20), com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos e controle. Dentre os extratos avaliados, a amostra E:50-20 apresentou as maiores concentrações dos compostos investigados, com diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com o controle, demonstrando assim que a aplicação do pré-tratamento com ultrassom em temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ é eficiente para aumentar a extração em aproximadamente 60% de formononetina e viabilizar a extração significativa de kaempferol. A eficiência do pré tratamento com a tecnologia de ultrassom para uma maior obtenção desses compostos também pode ser confirmada através da análise comparativa entre o controle (E:ST) e os extratos obtidos na mesma temperatura e com diferentes tempos de exposição (E:25-10, E:25-20 e E:25-30), com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos e o controle.

Para os extratos obtidos a 75 °C, independente do tempo de exposição ao ultrassom, não houve diferenças significativas para a obtenção da formononetina. Entretanto, a concentração máxima nesta temperatura para o kaempferol foi obtido com o menor tempo de exposição (E:75-10), o que pode indicar a degradação desse composto a exposição mais prolongada em temperaturas mais elevadas, devido a sua sensibilidade térmica (PANJA, 2017). De forma geral, a exposição prolongada influencia de forma negativa para a obtenção dos compostos investigados (Figura 3).

Almeida et al. (2017) também evidenciaram a complexidade dos cromatogramas obtidos para extratos de própolis vermelha de mesma origem geográfica e confirmaram a presença de isoflavonoides, incluindo a formononetina, e também do flavonol kaempferol. Batista et al. (2018) também identificaram e quantificaram a formononetina em extratos de própolis vermelha brasileira de mesma origem geográfica submetidos à tecnologia de ultrassom em temperatura ambiente (25 °C) com exposição de 1h, e, encontraram valores inferiores para este composto quando comparado com a amostra E:50-20 (25% menor), o que pode indicar que a temperatura de 50 °C seja a melhor temperatura para a extração deste componente. Bueno-Silva et al. (2016) também identificaram a formononetina como o composto mais abundante em extratos de própolis vermelha brasileira de mesma origem geográfica. Neves et al. (2016) determinaram a presença de formononetina (1,71 e 2,86 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) em extratos de duas amostras de própolis vermelha oriundas de Pernambuco (Brasil).

O kaempferol é um composto com alta atividade antioxidante, entretanto, presente em baixas concentrações na própolis vermelha (GREGORIS & STEVANATO, 2010). Barbariá et al. (2011) detectaram a presença de kaempferol em apenas três amostras própolis da Europa, de vinte avaliadas, com faixa de concentração entre 0,0697 a 0,2931 $\text{mg}.\text{g}^{-1}$. López et al. (2014) não identificaram a presença deste composto em extratos etanólicos de 14 amostras de própolis de coloração vermelha de diferentes regiões do Brasil e Cuba, entretanto, identificaram a presença de formononetina em algumas amostras do Brasil.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram identificados por outros autores quando avaliaram comparativamente a obtenção de compostos de

interesse de diferentes matrizes naturais utilizando ultrassom e extração convencional, demonstrando que a extração com o pré-tratamento ultrassônico é mais seletiva, gerando assim produtos de maior valor biológico (SAWAYA et al., 2010; ESCRICHE & JUAN-BORRÁS, 2018; FONSECA et al., 2017; ALBAHARI et al., 2018; YIN et al., 2018). Dessa forma, dentre os parâmetros avaliados neste estudo, a amostra E:50-20, apesar de não apresentar a maior capacidade antioxidante, foi a que proporcionou o maior conteúdo dos compostos de interesse investigados (formononetina e kaempferol), demonstrando assim o maior potencial biológico desse extrato obtido nas condições empregadas. Destaca-se que diferentes estudos apontam que a formononetina apresenta diferentes atividades biológicas importantes, atuando por exemplo de forma positiva contra diferentes linhagens de células tumorais (YE et al., 2012; ZHANG et al., 2014; NOVAK et al., 2014). Estes resultados indicam que a concentração total de compostos fenólicos ou flavonoides não é o único fator responsável por propriedades antioxidantes. A natureza química dos compostos fenólicos e, talvez, a presença de outros compostos contribuem para a capacidade antioxidante total dos extratos (COTTICA et al., 2015).

3.3. Determinação da Atividade Antimicrobiana

A Tabela 3 apresenta os valores de MIC e MBC determinados para os extratos de própolis vermelha brasileira obtidos em diferentes condições. Observou-se que todos os extratos apresentaram atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923) e para a Gram-negativa *E. coli* (ATCC 1775), mas este efeito foi dependente dos parâmetros de extração empregados. O controle utilizado no experimento não afetou o crescimento das bactérias testadas (dados não mostrados). Como a amostra não tratada com o ultrassom (E:ST) apresentou menores valores de MIC e MBC quando comparado a alguns extratos tratados (inclusive nas mesmas condições de temperatura para MBC), não podemos afirmar que o tratamento com ultrassom foi eficiente para aumentar o potencial antimicrobiano dos extratos para as bactérias estudadas quando associado a algumas temperaturas testadas.

Tabela 3. Determinação da MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) e MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos extratos de própolis

vermelha brasileira obtidos em diferentes condições.

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 1775	
	MIC	MBC	MIC	MBC
E:ST	11	750	46	187
E:25-10	6	>1000	46	93
E:25-20	11	>1000	93	187
E:25-30	11	>1000	23	93
E:50-10	23	23	93	750
E:50-20	11	11	46	>1000
E:50-30	23	23	93	>1000
E:75-10	23	23	23	>1000
E:75-20	23	23	93	750
E:75-30	23	>1000	93	187

A MIC para *S. aureus* variou de 6 a 23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para *E. coli*, a variação foi de 23 a 93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3). De modo a ter um perfil de atividade antimicrobiana completo, foram realizados testes para determinar o MBC de todos os extratos estudados. A MBC para *S. aureus* variou de 11 a >1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para *E. coli*, a variação foi de 93 a >1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3). O extrato bruto de qualquer produto natural que apresenta MIC inferior a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pode ser considerado como um produto promissor e merece uma investigação mais aprofundada para elucidar seu mecanismo de ação (DUARTE et al., 2007; TIVERON et al., 2016). Portanto, os baixos valores de MIC registrados para todos os extratos de própolis vermelha, independente dos parâmetros utilizados, demonstram que são produtos antimicrobianos promissores.

De forma geral, quando comparado as condições de extração empregadas, os extratos que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas foram os que exibiram as melhores atividades antioxidantes, com conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides elevados (Figura 1). Os extratos com melhor concentração ativa contra *S. aureus* e *E. coli* foram o E:50-20 e E:25-30, respectivamente, representado pelos menores valores de MIC e MBC. De todas as condições testadas, quatro extratos não demonstraram

ação bactericida ativa contra *S. aureus* e três contra *E. coli* (representado por $MBC > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Conforme identificado em outros estudos e também confirmado neste experimento, os extratos testados apresentaram uma maior atividade contra a cepa Gram-positiva do que contra a cepa Gram-negativa. Estes resultados podem ser justificados pelas diferenças estruturais da parede celular bacteriana, e desta forma, o mecanismo de ação da própolis é facilitado em bactérias Gram-positivas (MOHAMMADZADEH et al., 2007; RISTIVOJEVIĆ, et al., 2016). Resultados semelhantes foram identificados em outros estudos que investigaram extratos de própolis vermelha de outras origens (TRUSHEVA et al., 2006; OLDONI et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2014; GRENHO et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

O mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis é complexo e pode ser atribuído à presença de vários compostos bioativos, particularmente os flavonoides (CABRAL et al., 2009; FREIRES et al., 2016). Danos na membrana citoplásmica (causada pela reduzida fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase), inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH-citocromo c-redutase) e inibição da fixação e formação de biofilme foram reportados para flavonoides e sua relação com a atividade antimicrobiana (XIE et al., 2015; KASOTE et al., 2015). Alguns autores sugerem que a atividade inibitória é devido a um efeito sinérgico entre ácidos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, como por exemplo, vestitol, neovestitol, Isoliquiritigenina e galagina (não avaliados neste estudo) (MIRZOEVA et al., 1997; XU et al., 2001; STEPANOVIC et al., 2003; PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004; MELLIOU et al., 2007; BUENO-SILVA et al., 2013). Entretanto, Neves et al. (2016) identificaram a correlação entre a atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* e o flavonoide formononetina presente em extratos etanólicos de própolis vermelha brasileira do estado de Pernambuco.

Valores de MIC para extratos de própolis vermelha são reportados em diferentes estudos com variações de 3,8 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* (ALENCAR et al., 2007; ALMEIDA et al., 2017; JÚNIOR et al., 2012) e de 6,3 a $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. coli* (MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2017), sendo dessa forma considerado como um forte agente antibacteriano baseado na

classificação realizada por Freires et al. (2015). Em estudos anteriores realizados por este grupo, amostras de própolis coletadas nas mesmas regiões geográficas que as utilizadas neste estudo apresentaram elevado potencial antimicrobiano contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, e o efeito foi dependente do método de extração empregado (SILVA et al., 2017; MACHADO et al., 2016). Entretanto, apesar de coletados na mesma origem geográfica, as variações identificadas para a MIC podem estar relacionadas ao método de extração empregado, bem como, ao período de coleta das amostras. Sforcin et al. (2000) relataram a influência da sazonalidade na atividade antibacteriana de própolis do Brasil. Resultados semelhantes foram encontrados por Righi et al. (2011) e Lopez et al. (2015) quando avaliaram a CIM de própolis vermelha de diferentes regiões do Brasil (Alagoas, Sergipe e Paraíba). Em estudo recente, Neto et al. (2017) investigaram o efeito da sazonalidade sobre a atividade antibacteriana de extratos de própolis vermelha brasileira (de Pernambuco) e relataram valores de CIM variando de 128 a 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra cepas de *E. coli* e de 64 a ≥ 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra cepas de *S. aureus* e confirmaram o efeito da sazonalidade no conteúdo total de compostos bioativos nas amostras.

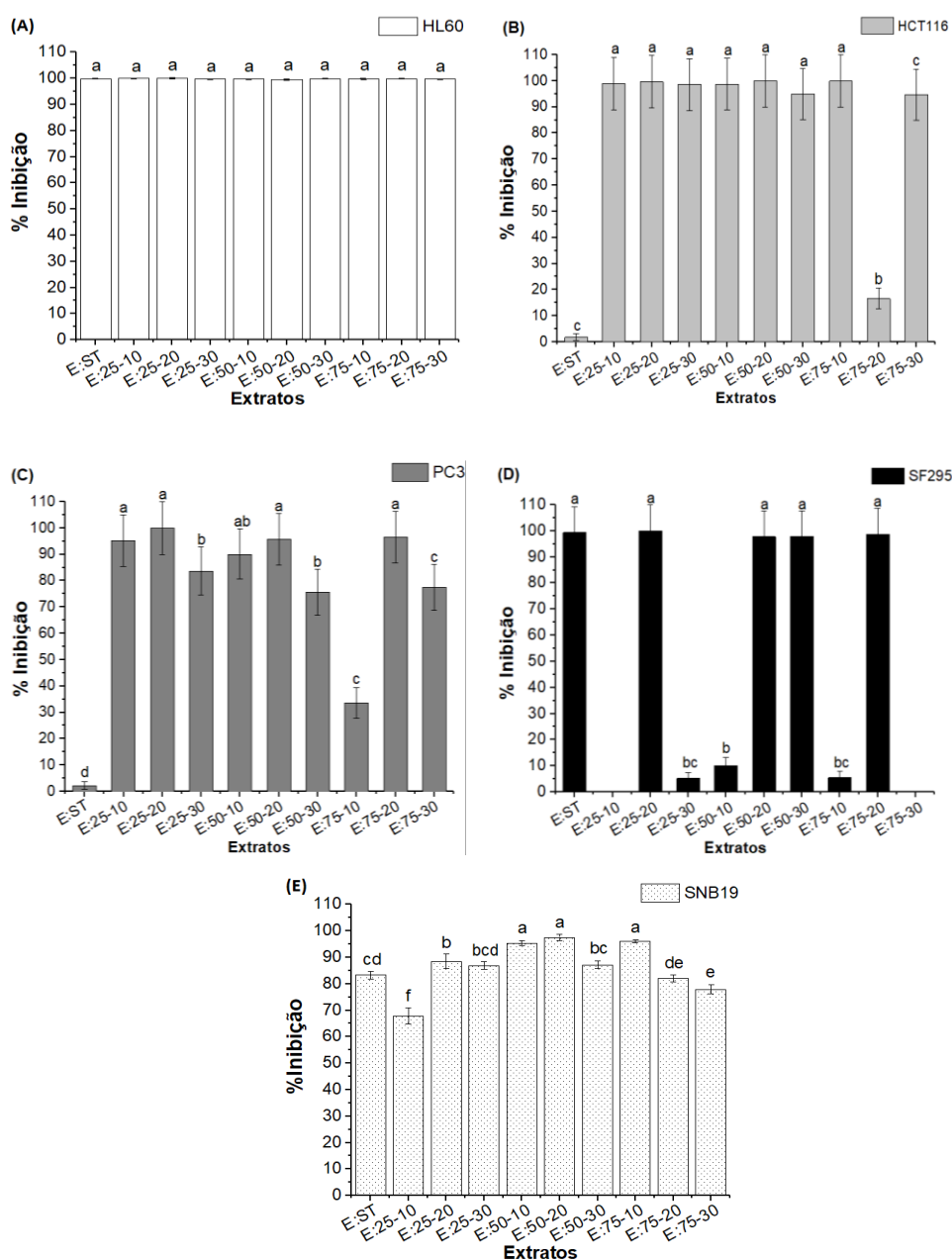
Dessa forma, os resultados antimicrobianos demonstrados pelas amostras de extratos de própolis vermelha analisados, sugerem que estes extratos apresentam alto potencial contra microrganismos relacionados a alimentos, podendo, dessa forma ser um importante aditivo conservante para formulações alimentícias (TOSI et al., 2007; ZHANG et al., 2018; COSTA et al., 2014; ROLLINI et al., 2017). Nedji et al. (2014) relata o potencial efeito da própolis para ser aplicada na indústria de alimentos e farmacêutica devido ao efeito antimicrobiano apresentado por essa matriz contra algumas linhagens de bactérias e fungos de interesse em fármacos e alimentos. Por exemplo, Morsy et al. (2013) demonstraram o efeito positivo do uso da própolis vermelha como aditivo alimentar através da administração oral em ovelhas, o que resultou em uma melhoria dos parâmetros bioquímicos.

3.4. Determinação da Atividade Antitumoral *in vitro*

O teste de viabilidade MTT foi usado para determinar o efeito da citotoxicidade dos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições de processo em diferentes linhagens de células tumorais (HL-60 leucêmica,

HCT-116 carcinoma de cólon, PC3 carcinoma de próstata, SF295 e SNB19 glioblastoma). Os resultados apresentados mostraram que a maioria dos extratos (testados na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alteraram a viabilidade celular ($p < 0,05$) das linhagens testadas (Fig. 4A-4E), havendo dessa forma, uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração celular.

Figura 4. Percentual de inibição de crescimento das linhagens tumorais (A) HL-60 (leucêmica), (B) HCT-116 (carcinoma de cólon), (C) PC3 (carcinoma de próstata), (D) SF295 (glioblastoma) e (E) SNB19 (glioblastoma) pelos extratos de própolis vermelha obtidos em diferentes condições.



Valores que apresentam a mesma letra, na mesma análise, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança. Média da análise obtida em triplicada ($n = 3$).

O percentual de inibição variou entre os extratos de 1,73 (E:ST) a 100,00% (E:50-20) para a linhagem HCT-116, de 2,16 (E:ST) a 100,00% (E:25-20) para a linhagem PC3, de 5,21 (E:25-30) a 100,00% (E:25-20) para a linhagem SF295 e de 67,89 (E:25-10) a 97,52% (E:25-20) para a linhagem SNB19, com diferenças significativas entre as amostras ($p > 0,05$). Para a linhagem HL-60, independente das condições empregadas, todos os extratos apresentaram um percentual de inibição superior a 99%, não apresentando diferenças significativas entre as amostras analisadas ($p < 0,05$) (Fig. 4A-4E).

De forma geral, os extratos que apresentaram as concentrações mais elevadas de formononetina e kaempferol (E:50-10, E:50-20 e E:50-30) foram os que promoveram uma maior inibição do crescimento celular frente as linhagens testadas, evidenciando dessa forma que esses compostos podem estar relacionados com a potente ação citotóxica da própolis vermelha frente as cinco linhagens neoplásicas testadas neste estudo. Dessa forma, identificou-se que os extratos obtidos na temperatura de 50 °C foram os que demonstraram as melhores inibições da proliferação celular, evidenciando assim a importância do emprego da temperatura adequada, juntamente com a aplicação do ultrassom para obtenção de extratos com maior potencial biológico.

Novak et al. (2014) avaliaram extratos de própolis vermelha e suas frações ricas em formononetina na inibição de células de tumores hematológicos e identificaram uma potente atividade antitumoral devido à presença desse flavonoide. Almeida et al. (2017) e Cavendish et al. (2015) associaram os efeitos biológicos dos extratos de própolis vermelha a presença de formononetina, enquanto que, outros estudos demonstraram que a formononetina em sinergia com o xantocimol conferem a essa matriz um potente efeito antitumoral (PICCINELLI et al., 2011; LOPÉZ et al., 2014). Alguns estudos apontam que a atividade antiproliferativa desse tipo de própolis pode estar relacionado com o mecanismo de parada do ciclo celular e apoptose (MATSUMOTO et al., 2003; CHEN & SUN, 2012).

Vuvovik et al. (2018) avaliaram a atividade citotóxica de onze diferentes flavonoides isolados de própolis contra linhagens celulares de câncer de cólon (HCT-116) e de mama (MDA-MB-231) e identificaram que seis flavonoides induziram efeitos citotóxicos nas células testadas. Li et al. (2008) investigaram a

ação citotóxica de várias classes de flavonoides isolados de própolis vermelha (42 compostos), incluindo a formononetina, frente a diferentes linhagens de células tumorais (26-L5, B16-BL6, LLC, A549, HeLa, HT-1080) e identificaram que os compostos (2S)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona e (3S)-mucronulatol foram os que apresentaram as melhores atividades antiproliferativa, sugerindo que estes flavonoides poderiam ser bons candidatos para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos. Frozza et al. (2013) avaliaram a atividade citotóxica do extrato de própolis vermelha frente a células de carcinoma epidermoide da laringe humana (Hep-2) e adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e evidenciaram um IC_{50} de aproximadamente $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando o potencial do extrato estudado.

Franchi-Jr et al. (2012), Machado et al. (2016) e Silva et al. (2017) avaliaram comparativamente extratos de própolis de diferentes tipos e origens geográficas, e identificaram que a atividade citotóxica contra as linhagens tumorais investigadas foi superior para os extratos obtidos das amostras de própolis vermelha, evidenciando dessa forma a composição diferenciada dessa matriz. De Mendonça et al. (2015) analisaram a ação de extratos de própolis vermelha contra HCT-116 e SF-295 e encontraram percentuais de inibição de 98, 12 e 100,00%, respectivamente. Silva et al. (2017) relatam a necessidade de mais estudos para avaliar os possíveis efeitos colaterais da própolis, principalmente em modelos *in vivo*, devido principalmente as diferenças apresentadas em relação a sua composição química relacionada ao tipo e origem geográfica.

Os resultados encontrados evidenciam o elevado potencial biológico da própolis vermelha do Brasil, sendo, portanto, um recurso importante para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos. O estudo de seus compostos isolados para avaliação do potencial terapêutico necessita ser aprofundado, para evidenciar, por exemplo, o mecanismo de ação contra as linhagens avaliadas.

4. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu identificar o potencial antioxidante, antibacteriano e citotóxico da própolis vermelha brasileira certificada. Comprovou-se a influência da tecnologia de ultrassom associada a diferentes temperaturas na obtenção de

extratos etanólicos de própolis vermelha com alto potencial biológico. Os extratos obtidos nas diferentes condições de processo apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação a atividade antioxidante, concentração de formononetina e kaempferol, atividade antimicrobiana e atividade citotóxica. A formononetina foi encontrada em todos os extratos estudados, enquanto que o kaempferol foi detectado acima do limite de quantificação em apenas oito extratos. Todos os extratos demonstraram alta atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. A atividade citotóxica de oito dos dez extratos foi superior a 75% frente a quatro linhagens tumorais. De forma geral, o extrato com maior potencial biológico foi o E:50-20, tendo em vista que apresentou elevado efeito antiproliferativo frente as cinco linhagens de células tumorais avaliadas, alta atividade antioxidante e elevada atividade antibacteriana, o que foi associado a maior concentração de formononetina e kaempferol. Portanto, estudos adicionais sobre fracionamento e isolamento dos compostos bioativos em própolis vermelha são necessários, bem como a realização de ensaios em modelos *in vivo*, o que pode promover e facilitar o desenvolvimento de novos produtos com potencial de uso na indústria farmacêutica e cosmética, e ainda, desenvolvimento de novas formulações alimentícias com propriedades diferenciadas e funcionais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI (BA), ao CNPq e à FAPESB.

REFERENCIAS

ALBAHARI, P.; JUG, M.; RADIĆ, K.; JURMANOVIĆ, S.; BRNČIĆ, M.; RIMACBRNČIĆ, S. R.; et al. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie (LWT)**, v. 92, n.1, p. 22–23, 2018.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of a New Type of Brazilian Propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n.2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, E. T. C.; DA SILVA, M. C. D.; OLIVEIRA, J. M. S.; KAMIYA, R. U.; ARRUDA, R. E. S.; VIEIRA, A. D.; et al. Chemical And Microbiological Characterization of Tinctures and Microcapsules Loaded with Brazilian Red Propolis Extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n.5, p. 280-287, 2017.

AMARAL, R. G.; FONSECA, C. S.; SILVA, T. K.; ANDRADE, L. N.; FRANÇA, M. E.; BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n.8, p. 1100-1106, 2015.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; 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, n.1, p. 129-138, 2017.

ATALA, E.; FUENTES, J.; WEHRHAHN, M. J.; SPEISKY, H. Quercetin and Related Flavonoids Conserve their Antioxidant Properties Despite Undergoing Chemical or Enzymatic Oxidation. **Food Chemistry**, v. 234, n.1, p. 479-485, 2017.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KODOTA, S. Constituents of Brazilian Red Propolis and their Preferential Cytotoxic Activity Against Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Line in Nutrient-Deprived Condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n.1, p. 181-189, 2008.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. **Apidologie**. v. 31, n1, p. 3-15, 2000.

BARBARIĆ, M.; MISKOVIĆ, K.; BIJIĆ, M.; LONCAR, M. C.; SMOLCIĆ-BUBALO, A.; DEBEJAK, Z.; et al. Chemical Composition of the Ethanolic Propolis Extracts and its Effect on HeLa Cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n.3, p. 772-778, 2011.

BARTH, M. O.; LUZ, C. F. P. Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 48, n.3, p. 181–188, 2009.

BATISTA, C. M.; ALVES, A. V. F.; QUEIROZ, L. A.; LIMA, B. S.; FILHO, R. N. P.; ARAÚJO, A. A. S.; et al. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 180, n. 1, p. 198-207, 2018.

BEZERRA, G. B.; DE SOUZA, L. M.; DOS SANTOS, A. S.; DE ALMEIDA, G. K.; SOUZA, M. T.; SANTOS, S.L.; et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 85, n.1, p. 687–696, 2017.

BRAND-WILLIAM, W.; CUVELIER, ME.; BERSET, C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology Science (LWT)**, v. 28 n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 3, 19 de maio, 2001: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Extrato de própolis. Disponível em < <http://www.iberpharm.com.br/arquivos/IN03-19-01-2001.pdf>> Acesso em 15 de set 2017.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Padronização e Qualidade Industrial. Diretrizes para Validação de Métodos Analíticos. 2011. Disponível em < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em 12 de mar 2016.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. 2011. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acesso em 15 de set 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 20 de ago 2017.

BRIONES-LABARCA, V.; PLAZA-MORALES, M.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C.; JAMETT, F. High Hydrostatic Pressure and Ultrasound Extractions of Antioxidante Compounds, Sulforaphane and Fatty Acids from Chilean Papaya (*Vasconcellea Pubescens*) Seeds: Effects Of Extraction Conditions and Methods. **Food Science and Technology Science (LWT)**, v. 60, n.1, p 525–534, 2015.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G. V.; NAPIMOGA, M. H.; et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.19, p. 4546–4550, 2013.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C. F.; DENNY, C.; COLÓN, D. F.; CUNHA, T. M. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, n.13, p. 1583–1590, 2016.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 5, n.3, p. 313–316, 2008.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MAYER, M. P. A. Anti-Inflammatory Mechanisms of Neovestitol from Brazilian Red Propolis in LPS-Activated Macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 36, n.1, 440-447, 2017.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PADRO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira. **Química Nova**, 32, n.6, p. 1523-1527, 2009.

CAVENDISH, R. L.; SANTOS, J. S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A. O.; OLIVEIRA, J. V.; ARAÚJO, E. D.; et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Brazilian Red Própolis Extract and Formononetin in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, n.1, p. 127-133, 2015.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, V. 34, n.1, p. 540–560, 2017.

CHEN, J.; SUN, L. Formononetin-induced apoptosis by activation of Ras/p38 mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n.13, p. 943–948, 2012.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation Of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from *Sugar Beet Molasses*. **Food Chemistry**, v. 172, n.1, p. 543-550, 2015.

COSTA, S. S.; DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A. S.; DE SOUZA, C. O.; GUIMARÃES, A. G. Bi-Functional Biobased Packing of the Cassava Starch, Glycerol, Licuri Nanocellulose and Red Propolis. **PloS One**, v. 9, n.11, p. e112554, 2014.

COTTICA, S. M.; SABIK, H.; ANTOINE, C.; FORTIN, J.; GRAVELINE, N.; VISENTAINER, J. V.; et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie (LWT)**, v. 60, n.1, p. 609–614, 2015.

DE MENDONÇA, I. C. G.; PORTO, I. C. C. M.; NASCIMENTO, T. G.; SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, J. M. S.; ARRUDA, R. E. S.; et al. Brazilian Red Propolis: Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Effect Against Cancer Cells. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 15, n.357, p. 1-12, 2015.

DING, Q.; ZHANG, T.; NIU, S.; CAO, F.; CHEN, R. A. W.; LUO, L.; MA, H. Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 42, n.1, p. 704-713, 2018.

DOI, K.; FUJIOKA, M.; SOKUZA, Y.; OHNISHI, M.; GI, M.; TAKESHITA, M.; et al. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. **In Vivo**, v. 31, n.1, p. 187-198, 2017.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n.2, p. 197–201, 2007.

ESCRICH, E. I.; JUAN-BORRÁS, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v. 106, n.1, p. 834–841, 2018.

FONSECA, S. F.; PADILHA, N. B.; THUROW, S.; ROEHRS, J. A.; SAVEGNAGO, L.; DE SOUZA, M. N.; et al. Ultrasound-promoted copper-catalyzed synthesis of bis-arylselanyl chrysin derivatives with boosted antioxidant and anticancer activities. **Ultrasonics Sonochemistry**. 2017; v. 39, n.1, p. 827–836.

FRANCHI, G. C. JR.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n.1, p. 1-6, 2012.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial activity of essential oils and Their isolated constituents against Cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**. 2015; v. 20, n.4, p. 7329–7358.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; et al. Chemical Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Brazilian Red Própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n.1, p. 137-142, 2013.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINO, I. Characterization and Biological Evaluation of Selected Mediterranean Propolis Samples. Is It a New Type? **Lebenson Wiss Technol**, v. 65, n.1, p. 261-267, 2016.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations Between Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Venetian Propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.1, p. 72-80, 2010.

GRENHO, L.; BARROS, J.; FERREIRA, C.; SANTOS, V. R.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. **Biomedical Materials**, v. 10, n.2. p. 025004, 2015.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from *Folium eucommiae* and Evaluation of Antioxidant Activity in Multi-Test Systems *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 114, n.1, p. 1147-1154, 2009.

JÚNIOR, W, B.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAÚJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. 2012; v. 33, n.1, p. 03–10.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, n.1, p. 452-461, 2009.

KASIOTIS, K. M.; DOU A. P.; PAPADOPOULOS, A.; MACHERA, K. Revisitando a própolis grega: análise cromatográfica e estudo de atividade antioxidante. **Plos One**, v. 12, n.1, p. e0170077, 2017.

KASOTE, D.; AHMAD, A.; CHEN, W.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. **Phytochemistry Letters**. 2015; v. 11, n.1, p. 326–331.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutants Streptococci. **Current Microbiology**, v 41, n.3, p. 192-196, 2000.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n.10, p. 5434–5440, 2008.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical Markers of Different Types of Red Propolis. **Food Chemistry**, v. 146, n.1, p. 174-180, 2014.

LOPEZ, B. G.; DE LOURENÇO, C. C.; ALVES, D. A.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M.; SAWAYA, A. C. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n.3, p. 677–87, 2015.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, H. N.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, v. 11, n.1, p. e0145954, 2016.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O.; OLIVEIRA, F. C. E.; CARDOSO M. V.; FERREIRA, R. G.; et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n.1, p. 1-11, 2016.

MARTÍNEZ-PADILLA, L. P.; FRANKE, L.; XU, X. Q.; JULIANO, P. Improved extraction of avocado oil by application of sono-physical processes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, n.A, p. 720–726, 2018.

MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; KOBAYASHI, E.; ITO, T.; OHGUCHI, K.; TANAKA, T.; et al. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukaemia cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n.4, p. 569–571, 2003.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G.; Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p. 571–577, 2005.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; CHINO, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 103, n.2, p. 375–380, 2007.

MENDONÇA, L. S.; DE MENDONÇA, F. M. R.; DE ARAÚJO, Y. L. F. M.; DE ARAÚJO, E. D.; RAMALHO, A. S.; NARAIN, N.; et al. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n.2, p. 291-298, 2015.

METHEREL, A. H.; TAHA, A. Y.; IZADI, H.; STARK, K. D. The Application of Ultrasound Energy to Increase Lipid Extraction Throughput of Solid Matrix Samples (Flaxseed). **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 81, n.5-6, p. 417-423, 2009.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n.3, p. 239–246, 1997.

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Analysis of Binding Interaction of Genistein And Kaempferol with Bovine α -lactalbumin. **Journal of Functional Foods**, v. 12, n.1, p. 458-467, 2015.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAHI, M.; HAMEDI, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N., OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, v. 103, n.4, p. 1097–1103, 2007.

MOLYNEUX P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n.2, 211-219, 2004.

MORSY, A. S.; ABDALLA, A. L.; SOLTAN, Y. A.; SALLAM, S. M.; EL-AZRAK, K. D.; LOUVANDINI, H.; et al. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n.7, 1609–1618, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMENDJARI, A. Antioxydant Activity of Some Algerian Honey and Propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 88, n.1, p. 85-90, 2017.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M100-S10 (M7)). Approved standard. 5thed. Wayne, PA: **NCCLS**; 2000.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n.6, p. 433–437, 2014.

NEVES, M. V. M.; DA SILVA, T. M. S.; LIMA, E. O.; CUNHA, E. V. L.; OLIVEIRA, E. J. Isoflavone formononetin from Red Propolis Acts as a Fungicide Against *Candida sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n.1, p. 159-166, 2016.

NOVAK, E. M.; SILVA, M. S. C.; MARCUCCI, M. C.; LÓPEZ, B. G. C.; FORTES, M. A. H.; GIORGI, R. R.; et al. Antitumoural Activity of Brazilian Red Propolis Fraction Enriched with Xanthochymol and Formononetin: An *in vitro* and *in vivo* Study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n.1, p. 91-102, 2014.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M, et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n.2, p. 208-13, 2011.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science**, *In Press*, 2017.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.9, p. 2502-2506, 2002.

PEPELJNJAK, S.; KOSALEC, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 240, n.1, p. 111–116, 2004.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; et al. An Industrial Approach in the Search of Natural Antioxidants from Vegetable and Fruit Wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 137-150, 2006.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.12, p. 6484-6491, 2011.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GÜEZ, C. M.; MACHADO, M.; DE OLIVEIRA L. F. S.; et al. In Vitro Evaluation of the Acquisition of Resistance, Antifungal Activity and Synergism of Brazilian Red Propolis with Antifungal Drugs on *Candida spp.* **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n.4, p. 839-850, 2015.

REGUEIRA NETO, M. S.; TINTINO, S. R.; DA SILVA, A. R. P.; COSTA, M. D. S.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F. F.; et al. Seasonal Variation of Brazilian Red Propolis: Antibacterial Activity, Synergistic Effect and Phytochemical Screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, n.B, p. 572-580, 2017.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n.13, p. 2363–2370, 2011.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n.1, p. 1-14, 2013.

RISTIVOJEVIĆ, P.; DIMKIĆ, I.; TRIFKOVIĆ, J.; BERIĆ, T.; VOVK, I.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D.; et al. Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. **Plos One**, v. 11, n.6, p. e0157097, 2016.

ROLLINI, M.; MASCHERONI, E.; CAPRETTI, G.; COMA, V.; MUSATTI, A.; PIERGIOVANNI, L. Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, n.B, p. 75–82, 2017.

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, n.7, p. 591–598, 2017.

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

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação Entre a Composição Química e Capacidade Antioxidante de Diferentes Extratos de Própolis Verde. **Química Nova**, v. 39, n.10, 1192-1199, 2016.

SANPA, S.; POPOVA, M.; TUNKASIRI, T.; EITSSAYEAM, S.; CHANTAWANNAKUL, P. Antibacterial Compounds from Propolis of *Tetragonula laeviceps* and *Tetrigona melanoleuca* (Hymenoptera: Apidae) from Thailand. **Plos One**, v. 10, n.5, p. e0126886, 2015.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, Y. L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 8, n.1, p. 1–10, 2011.

SAWAYA, A. C.; ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, M. N.; KUMAZAWA, S.; AHN, M. R.; BANG, K. S.; et al. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 81, n.1–2, p. 100–108, 2010.

SCHMIDT, E. M.; STOCK, D.; CHADA, F. J. G.; FINGER, D.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; et al. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. **BioMed Research International**, v. 2014, n.1, p. 1-10, 2014.

SENA-LOPES, A.; BEZERRA, F. S. B.; NEVES, R. N.; PINHO, R. B.; SILVA, M. T. O.; SAVEGNAGO, L.; et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **Plos One**, v. 13, n.3, p. e0191797, 2018.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. JR.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI,

S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n.1, p. 243–249, 2000.

SIHERI, W.; ZHANG, T.; EBILOMA, G. U.; BIDDAU, M.; WOODS, N.; HUSSAIN, M. Y.; et al. Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Reg/ions within Libya. **Plos One**, v. 11, n.5, p. e0155355, 2016.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; et al. Antioxidant, Antimicrobial, Antiparasitic, and Cytotoxic Properties of Various Brazilian Propolis Extracts. **Plos One**, v. 12, n.3, p. e0172585, 2017.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; SOUSA, J. P. B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; et al. The Role of Seasonality on the Inhibitory Effect of Brazilian Green Propolis on the Oxidative Metabolism of Neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n.8, p. 1102-1108, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n.1, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n.3, p. 144-158, 1965.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiology Research**, v. 158, n.4, p. 353–357, 2003.

SULAIMAN GM, AL SAMMARRAE KW, AD'HIAH AH, ZUCCHETTI M, FRAPOLLI R, BELLO E, et al. Chemical Characterization of Iraqi Propolis Samples and Assessing their Antioxidant Potentials. **Food and Chemical toxicology**, v. 49, n.9, p. 2415-2421, 2011.

TADDEO, V. A.; EPIFANO, F.; FIORITO, S.; GENOVESE, S. Comparison of Different Extraction Methods and HPLC Quantification of Prenylated And Unprenylated Phenylpropanoids in Raw Italian Propolis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, n.1, p. 219-223, 2016.

TELES, F.; DA SILVA, T. M.; CRUZ JÚNIOR.; F. P.; HONORATO, V. H.; COSTA H. O.; BARBOSA, A. P. F.; et al. Brazilian Red Propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PloS One**, v. 10, n.1, p. e0116535, 2015.

TIVERON AP, ROSALEN PL, FRANCHIN M, LACERDA RCC, BUENO-SILVA B, BENSO B, et al. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **Plos One**, v. 11, n.11, p. e0165588, 2016.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon

Escherichia coli. **Food Chemistry**, v. 104, n.3, p. 1025–1029, 2007.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN P. L.; et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n.2, p. 249-254, 2006.

VASCONCELOS, W. A.; BRAGA, N. M. A.; CHITARRA, V. R.; SANTOS, V. R.; ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Bioactive glass-green and Red Propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Natural Products Chemistry and Research**, v. 2, n.6, p. 1–5, 2014.

VUKOVIC, N. L.; OBRADOVIC, A. D.; VUKIC, M. D.; JOVANOVIC, D.; DJURDJEVIC, P. M. Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. **Food Research International**, v. 106, n.1, p. 71–80, 2018.

WILKINSON J, CERDAN C, DORIGON C. Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil – The Interplay of Institutions and Networks. **World Development**, v. 98, n.1, p. 82-92, 2017.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n.1, p. 132–149, 2015.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, n.1, p. 39–43, 2001.

YE, Y.; HOU, R.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, J.; HUANG, Y. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n.4, p. 263–277, 2012.

YIN, C.; FAN, X.; FAN, Z.; SHI, D.; GAO, H. Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecule**, v. 111, n.1, p. 446–454, 2018.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; et al. Biological Properties of Propolis Extracts: Something New from an Ancient Product. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, n.B, p. 214-222, 2017.

ZANG, G.; HE, L.; HU, M. Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from *Prunella vulgaris L.* and Evaluation of Antioxidant Activities *in vitro*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n.1, p. 18-25, 2011.

ZHANG, H.; FU, Y.; NIU, F.; LI, Z.; BA, C.; JIN, B.; et al. Enhanced antioxidant activity and *in vitro* release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, n.1, p. 104–112, 2018.

ZHANG, T.; OMAR, R.; SIHERI, W.; MUTAIRI, A. S.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; et al. Chromatographic Analysis with Different Detectors in the Chemical Characterisation and Dereplication of African Propolis. **Talanta**, v. 120, n.1, p. 181-190, 2014.

ZORDI, N.; CORTESI, A.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; SOLINAS, D.; INNOCENTI, G.; et al. The Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Propolis: a Central Composite Design Approach. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, n.1, p. 491-498, 2014.

CAPÍTULO IV

Considerações Finais

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados expostos no presente trabalho corroboram para a caracterização química e biológica da própolis vermelha brasileira. A prospecção tecnológica possibilitou compreender a utilização da própolis no setor de cosméticos em nível mundial, sendo observado um desnível entre o depósito de patentes e a demanda de pesquisas envolvendo a própolis em território brasileiro. Os extratos obtidos com e sem pré tratamento por ultrassom apresentaram elevados teor de compostos bioativos que refletiram em uma elevada atividade antioxidante desempenhada pelos extratos. A tecnologia de ultrassom influenciou positivamente na obtenção dos compostos formonometina, biomarcador da matriz, e kaempferol que possuem potencial biológico no combate a doenças que acometem o homem. Nos ensaios de atividade antimicrobiana foi evidenciado que todos extratos possuem expressiva atividade inibitória a *S. aureus* e *E. coli*. Resultado observado também para a atividade citotóxicas dos extratos frente as quatro linhagens de células tumorais, onde desempenharam excelentes percentuais de inibição celular. Entretanto, ainda são necessárias novas investigações para avaliar e definir a implementação segura de extrato de própolis vermelha em fármacos, alimentos e cosméticos. Ressalva-se a importância de proteção dos novos produtos/ métodos envolvendo a própolis por parte dos pesquisadores brasileiros a nível internacional, para que desta forma o Brasil seja reconhecido como não somente produtor da matriz, como também portador de tecnologia de inovação.