

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES
BIOATIVAS DA *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. E DA
PRÓPOLIS VERMELHA**

CÁTIA IONARA SANTOS LUCAS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2018**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES
BIOATIVAS DA *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. E DA
PRÓPOLIS VERMELHA**

Cátia Ionara Santos Lucas

Bióloga

Universidade do Estado da Bahia, 2011

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

L933e

Lucas, Catia Ionara Santos.

Estudo das características e propriedades bioativas da *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e da própolis vermelha / Catia Ionara Santos Lucas._ Cruz das Almas, BA, 2018.
154f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.

Coorientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas.

Própolis – Compostos bioativos. 2.Própolis – Microbiologia. 3.Plantas – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 638.135

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES BIOATIVAS
DA *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. E DA PRÓPOLIS
VERMELHA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
Cátia Ionara Santos Lucas**

Realizada em 19 de julho de 2018

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno (Orientadora)

Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo
Universidade Federal de Sergipe / UFS
Examinador Externo

Profa. Dra. Geni da Silva Sodré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno

Profa. Dra. Manuela Oliveira de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Externo

Profa. Dra. Yzila Liziane Farias Maia de Araújo
Universidade Federal de Sergipe / UFS
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dai-me Senhor, a perseverança das ondas do mar, que fazem de cada recuo, um ponto de partida para um novo avançar”

Cecília Meirelles

Aos meus amores, Laurice Ferreira Santos (mainha), Carla Lucas e Caio Lucas (irmãos), e Adailton Ferreira (esposo), dedico.

AGRADECIMENTOS

“Você pode sonhar..., criar e construir a ideia mais maravilhosa do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer o sonho virar realidade”. (W. Disney)

A Deus, que se faz presente em todos os momentos de minha vida, me manter com o coração forte para seguir, mesmo diante dos obstáculos, e permitindo a conclusão de mais uma etapa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo para o doutorado e doutorado sanduiche (SWE) no âmbito da chamada de projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014 - Pesquisador Visitante Especial (Processo: 88881.062167/2014-01; Proposta: 189737).

Ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Bragança, Portugal, por ter me recebido para o doutorado sanduiche no período de seis meses e me proporcionado essa experiência ímpar do intercambio.

Aos Orientadores, Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho e Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho, muito obrigada pela acolhida calorosa, ensinamentos, direcionamentos, confiança, apoio e carinho! Com vocês construir mais uma etapa da minha trajetória pessoal e profissional.

À Dra. Geni da Silva Sodré por todo carinho, ensinamentos, compreensão desde a minha chegada ao Insecta! A senhora é um exemplo de força, perseverança e amor! Muito obrigada!

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, que contribuíram para a minha formação.

Ao Grupo de Pesquisa INSECTA, pela estrutura física, pelos conhecimentos e amigos. Orgulho de fazer parte dessa colmeia!

Ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas pela concessão do transporte para coleta do material de pesquisa.

À Vandira da Mata por ser uma inspiração e referência da Apicultura no Estado da Bahia, e proporcionar contatos com os Apicultores de Canavieiras - BA.

Ao técnico da Bahiater, Welton Souza Clarindo, por nos intermediar com os apicultores e nos ajudar nas coletas do material de pesquisa.

À Cooperativa de Apicultores de Canavieiras (COAPER), especialmente, aos apicultores Anselmo Matos Nascimento, José Roberto da Silva Barbosa e Clebio Jesus Alves da Silva. Obrigada pela atenção, compressão, carinho, por permitir nossa visita aos apiários, nos conceder e ajudar nas coletas do material de pesquisa.

Ao grupo de pesquisa do Instituto Politécnico de Bragança/PT, os portugueses, Vanessa Branco Paula, Arminda Marcelo, Fátima Cruz, Dra. Ana Paula Pereira, Sá Moraes e Dr. Luís Avelino Guimarães Dias pelos ensinamentos, paciência e carinho! A Georgina Tolentino, de Cabo Verde (África), Patricia Combarros Fuertes, da Espanha, Ananias Pascoal, de Moçambique e Uilson Pereira dos Santos, do Brasil, muito obrigada pela amizade, sorrisos, aprendizado e carinhos, com vocês os dias se tornaram ainda mais divertidos e especiais!

À Georgina Tolentino que com enorme carinho, paciência, dedicação e cumplicidade me acompanhou nas realizações das análises durante o doutorado sanduíche no IPB. O nosso contato se transformou em uma amizade tornando os momentos difíceis mais fáceis, cheios de alegria e suíngue africano. Saudade! Obrigada por tudo! Levo você sempre em meu coração!

À Vanessa Matos por compartilhar momentos de ansiedade, angústicas, dúvidas, conhecimento, soluções, sonhos, alegrias e realizações. A pesquisa nos uniu em uma amizade muito especial!

À Andréia Nascimento e Weliton Andrade pelo carinho, atenção, conhecimentos compartilhados, pelo sorriso, abraço para um “bom dia” e por me ajudarem nas identificações dos tipos polínicos. Tenho um carinho e admiração especial por vocês!

Muito obrigada professores Drs. Yzila Araújo e Edilson Araújo, da Universidade Federal de Sergipe, pelo apoio, carinho, sorrisos e incentivos!

À professora Dra. Lisiane Freitas, Universidade Federal de Sergipe, à professora Dra. Cristina Delerue-Matos e a Pos-Doc. Manuela M. Moreira, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal, pela parceria, auxílio nas realizações das análises cromatográficas e co-autorias na publicação científica.

À Dra. Juliana Cordeiro Cardoso, Instituto de Tecnologia e Pesquisa e professora titular da Universidade Tiradentes-SE, pela receptividade, carinho e ajuda dispensada.

À amiga e afilhada Dra. Lucyana Mendonça-Melo pelo carinho, apoio, atenção e por inúmeros áudios compartilhando conhecimento, muito obrigada pela constante presteza!

À professora Fabiane de Lima pela paciência, ensinamentos e carinho. Obrigada pelas orientações e realização das análises estatística!

Ao Daniel Vieira pela ajuda nas análises cromatográficas por Camada Delgada de Alta Eficiência.

À Deyse de Souza Gonçalves, secretária do programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, pela paciência, atenção, e ajuda dispensada durante todo o período do doutoramento.

Obrigada a todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pelos muitos momentos de aprendizados e sorrisos!

À Maria das Graças, nossa Dona Gau, que todos os dias ao chegar no INSECTA me recebe com tamanho carinho, atenção e incentivo. Sentirei saudades do nosso “cafezinho das 10h”. A senhora é um ser iluminado!

À “Vila do Chaves” representado pelo sr. Paulo, Nadia, Melissa, Theo, Renata, Leonardo, Cristiane, Rober, Lica, Sara, Rafael, Magali, Murilo e Kelly, pelos sorrisos soltos para desopilar dias cansativos.

Aos afilhados Renata Barbosa e Leonardo Barbosa pelos momentos compartilhados! Obrigada pelo carinho!

À amiga-irmã, Dra. Cristiane Duarte, por ser sempre fonte de carinho, força, cumplicidade, oração e perseverança! Você é um presente muito especial que Deus enviou a nossa família!

À amiga, Msc.Silvana Simões, pela calorosa amizade!

Obrigada a todos os amigos pela torcida e incentivo!

Aos meus familiares, avós, tios, tias, primos, sogros e cunhados pelo apoio, torcida e carinho.

Aos meus avôs, em especial ao meu vovô Pídio (Elpídio Ferreira Ramos, *in memória*), por sempre compartilhar com enorme orgulho das minhas conquistas. Ele é aquele que está na arquibancada torcendo, vibrando e no final independente do resultado tinha o colo, um abraço caloroso e um sorriso largo.

Ele dizia: *“essa Caitinha é retada, é corajosa. Vai minha filha não desanima não!”*
Saudades eternas vovô Pídio! Te amo muito!

À minha mainha, Laurice Ferreira Santos, pelos ensinamentos, por ser o meu maior exemplo de amor, perseverança, coragem, força e resiliência. Sou sua fã e tenho uma admiração enorme pela senhora. Obrigada por edificar a nossa “Família Elegância”, da qual tenho muito orgulho! Te amo muito!

Aos meus irmãos, Carla Leomácia (Binha) e Caio Andreson (Binho), que sempre acreditaram em mim e me incentivaram em todas as etapas da minha vida. Obrigada pelas palavras de incentivo e motivação, pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelos abraços apertados e aconchegantes, pelo amor que nos une. Admiro e amo vocês!

Obrigada cunhado Hery, Heriomar Moraes, pelos inúmeros momentos de pirraças e sorrisos, de apoio e carinho!

Aos meus sobrinhos, Mateus Lucas Moraes, Miguel Lucas Moraes e Sofia Lucas Moraes, por contagiarem a vida de “Tia Baba” com tanto amor, tantos sorrisos, tanto aprendizado! Vocês renovam as minhas energias! Reafirmo esse agradecimento à minha irmã e ao meu cunhado, Heriomar Moraes, por me darei esse presente indescritível, ser tia! Amo vocês!

Adradeço imensamente ao meu esposo, amigo, parceiro de trabalho e parceiro da vida, Dr. Adailton Freitas Ferreira (Vida), pela cumplicidade, ensinamentos, amor, carinho, paciência e incentivo. Foram dias de muitas lutas, sorrisos, lágrimas, conquistas, e incansavelmente você esteve ao meu lado partilhando cada sentimento. Obrigada por tudo! Te amo seu moço!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO	01
ARTIGO 1	
PERFIL MICROBIOLÓGICO, QUÍMICO, NUTRICIONAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> (L.) TAUB.....	38
ARTIGO 2	
PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS, POLÍNICO, FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	69
ARTIGO 3	
SIMILARIDADE POLIFENÓLICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA E DA <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> (L.) TAUB.	111
CONSIDERAÇÕES FINAIS	142

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DA *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. E DA PRÓPOLIS VERMELHA

Autora: Cátia Ionara Santos Lucas

Orientadora: Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Resumo: O objetivo desse estudo foi a determinação microbiológica, físico-química, atividade biológica e a similaridade polifenólica da espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. com a própolis vermelha produzida em apiários no Litoral Sul do Estado da Bahia. As amostras coletadas em cinco apiários foram analisadas quanto a microbiologia, físico-químicas, atividades biológicas *in vitro* e análise polínica. Não foram encontradas bactérias patogênicas nas amostras analisadas. A própolis se enquadrou aos padrões exigidos à legislação e foram identificados cinco tipos polínicos (*Cecropia* sp., *Dalbergia ecastaphyllum*, *Protium heptaphyllum*, *Schinus terebinthifolia* e *Spondia* sp.). O ácido linoléico foi mais abundante no caule, enquanto que o linolênico na folha e o oleico na própolis. Trinta e quatro compostos foram identificados na própolis, 35 no caule e 31 na folha. Todos os compostos presentes na própolis também foram encontrados no caule e/ou folha. A própolis vermelha apresentou similaridade polifenólica com *D. ecastaphyllum*. Os resultados desse estudo demonstram que as amostras analisadas são promissoras para uso nas indústrias alimentar, farmacêutica e de cosmético. No entanto, a própolis vermelha apresentou-se com atividade antimicrobiana *in vitro* mais acentuada quando comparada com extratos de *D. ecastaphyllum*.

Palavras chave: produto apícola; produtos naturais; compostos fenólicos; HPLC; ômega.

STUDY OF CHARACTERISTICS AND BIOACTIVE PROPERTIES OF *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. AND RED PROPOLIS

Autora: Cátia Ionara Santos Lucas

Orientadora: Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Abstract: The aim of this study was to determine the microbiological, physical-chemical, biological activity and polyphenolic similarity of the species *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. with the red propolis produced in apiaries in the South Coast of the State of Bahia. The samples collected in five apiaries were analyzed for microbiology, physico-chemical, biological activities in vitro and pollen analysis. No pathogenic bacteria were found in the analyzed samples. Propolis met the standards required by legislation and five pollen types were identified (*Cecropia* sp., *Dalbergia ecastaphyllum*, *Protium heptaphyllum*, *Schinus terebinthifolia* and *Spondia* sp.). Linoleic acid was more abundant in the stem, whereas linolenic acid in leaf and oleic in propolis. Thirty four compounds were identified in propolis, 35 in stem and 31 in leaf. All compounds present in propolis were also found in the stem and/or leaf. Red propolis presented polyphenolic similarity with *D. ecastaphyllum*. The results of this study demonstrate that the analyzed samples are promising for use in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. However, red propolis presented more marked antimicrobial activity in vitro when compared to extracts of *D. ecastaphyllum*.

Keywords: bee product; natural products; phenolic compounds; HPLC; omega.

REFERENCIAL TEÓRICO

Produtos Naturais

Os produtos naturais originam-se de fontes vegetais, microrganismos e animais (KHAZIR et al., 2014). Estes organismos produzem substâncias conhecidas como metabólitos secundários que não comprometem a integridade celular nos processos vitais e proporcionam proteção química a um ser vivo (GURNANI et al., 2014).

As moléculas da natureza apresentam diversidades estruturais imensuráveis quando comparadas às combinações químicas padrões, as quais têm sido fundamentais para descobertas de novos princípios ativos propícios ao desenvolvimento de novos fármacos (CATALANI et al., 2016). O sucesso na identificação, separação e isolamento de moléculas dependem das suas características bioquímicas e da seleção de métodos biotecnológicos eficientes (LUO; COBB; ZHAO, 2014).

Entre os produtos naturais, as plantas têm merecido destaque por serem as principais fontes de compostos químicos que agem como princípios ativos para medicamentos de interesse à saúde humana (SHARMA; JANMEDA, 2014). Pesquisas têm indicado que os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são os principais responsáveis pelas atividades biológicas conferidas pelas plantas (ARAÚJO et al., 2014; CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015; TAUCHEN et al., 2016). As atividades biológicas foram avaliadas nas diferentes partes dos vegetais, o caule (ROY et al., 2011), cerne do caule (LIU et al., 2016), frutos (MARTÍ et al., 2015), folha (GUEDES et al., 2014; ISMAIL et al., 2015), raiz (YOON; CHUNG; THIRUVENGADAM, 2015) e nos produtos derivados de vegetais, a exemplo da própolis (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016) demonstrando que estes apresentam princípios ativos que podem atuar em diversas doenças.

Fonte natural de compostos fenólicos

Gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae, com distribuição pantropical e hábitos de crescimento arbóreo, arbustivo e

trepadeira lenhosa (DI STASI; HRUMA-LIMA, 2002). Este gênero possui 300 espécies, sendo que 39 destas ocorrem no Brasil (LIMA, 2015).

Muitas espécies de *Dalbergia* têm a madeira valorizada por apresentar durabilidade na montagem de móveis e instrumentos musicais, além de serem decorativas e ricas em compostos voláteis aromáticos conferindo perfume à madeira (CARVALHO et al., 1994; LORENZI, 2013). São utilizadas na medicina popular e essa referência de uso tradicional tem sido uma ferramenta importante na investigação científica (SILVA et al., 2007; VASUDEVA et al., 2009; ROY et al., 2011).

Na triagem fitoquímica de extratos de partes dessas espécies foram demonstradas diversas ações biológicas, tais como: antioxidante (WANG; WENG; CHENG, 2000; SILVA et al., 2007; ROY et al., 2011; ZHANG et al., 2011; LIANHE et al., 2012; CHAITRA et al., 2015), anti-inflamatória (GANGA; MADHU; VIJAYA, 2012; ISMAIL et al., 2015), antimicrobiana (EDAYADULLA; RAMESH, 2012; MARTINEZ-SOTRES, 2012; MUTAI et al., 2013; GUEDES et al., 2014), citotoxicidade (SONGSIANG; HAHNVAJANAWONG; YENJAI, 2011; SAHA et al., 2013), analgésica (ISMAIL et al., 2015), antitérmica (ISMAIL et al., 2015), osteogênica (DIXIT et al., 2012); gastroprotetora (KHAN; KHAN, 2013), larvicida (DALARMI et al., 2015), acaricida (SINGH et al., 2016), fotoprotetora (MARTINS et al., 2016). Muitas dessas propriedades biológicas estão ligadas, principalmente, à presença dos isoflavonóides na composição química desses vegetais (ZHANG et al., 2011; DIXIT et al., 2012; MUTAI et al., 2013).

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.**

Dalbergia ecastaphyllum tem vasta distribuição, abrangendo a costa do Continente Americano (desde o sul da Flórida EUA ao sul do Brasil) e a costa oriental do Continente Africano (CARVALHO, 1997; LIMA, 2015). Geralmente sua ocorrência está associada a áreas de leitos de rios, manguezais ou beira-mar com predominância de vegetação de manguezal e restinga. Possui hábito de crescimento arbustivo ou liana, incandescente ou semi-prostrado com emaranhado de ramos e caule que contribuem para melhor fixação (CARVALHO, 1997; LIMA, 2015). As flores são agrupadas em panículas nas axilas das folhas, os frutos alados facilitam a dispersão (FRANCIS, 2004). O

grão de pólen é mônade, médio tricolpado, exina fina e microreticular (SILVA; SANTOS, 2009). A coloração vermelha da resina presente no caule deriva de flavonoides retusapurpurina A e B (PICCINELLI et al., 2011).

Popularmente essa espécie é conhecida como rabo de bugio, bugi, rabo de macaco, marmeleiro-da-praia, marmelo-do-mangue, feijão-de-guaiamum, arco de barril, moeda de videira (DONNELLY; KEENAN; PRENDERGAST, 1973; FRANCIS, 2004; PICCINELLI et al., 2011; GUEDES et al., 2014). O nome *Ecastaphyllum brownei* Pers. é reconhecido pela Flora do Brasil como sinónimo aceito para *D. ecastaphyllum* (LIMA, 2015).

Essa espécie é muito utilizada na recuperação de áreas degradadas em locais alagáveis (BOHRER et al., 2009) e na medicina popular. A folha é indicada como diurética, emética e utilizadas em inalações (FRANCIS, 2004), enquanto que a raiz e o caule são usados no controle de inflamação uterina e anemia (GUEDES et al., 2014). Além disso, nos últimos dez anos a busca pelo conhecimento químico dessa espécie se intensificaram após a descoberta que é a provável origem botânica da própolis vermelha, cujas inúmeras propriedades fitoterápicas são relatadas na literatura (ALDAY et al., 2016; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). Apesar dos esforços científicos para identificar e elucidar as ações biológicas dos constituintes químicos da própolis o conhecimento das fontes primárias, ou seja, da sua origem botânica, ainda são incipientes.

O conhecimento fitoquímico adquirido por métodos cromatográficos identificou os isoflavonoides como os principais constituintes da *D. ecastaphyllum*, dentre eles: liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana (DONNELLY; KEENAN; PRENDERGAST, 1973; MATOS; GOTTLIEB; ANDRADE, 1975; DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011). Dausch et al. (2008) constataram que a formononetina e isoliquiritigenina foram os compostos majoritários, encontrados na resina desta planta, contendo respectivamente, 19,5 mg/g e 12,1 mg/g. Também foram identificados vestitol, neovestitol, 7-O-metilvestitol, homopterocarpana, vesticarpan, 3,8-dihidróxi-9-metóxipterocarpana, guttiferone E/xantocochimol, oblongifolina A, 7,30-dihidróxi-50-metoxi-isoflavone, naringenina, mucronulatol, retusapurpurina A e B (PICCINELLI et al., 2011).

Entre os poucos estudos que elucidam as ações biológicas da *D. ecastaphyllum* encontra-se o de Guedes et al. (2014). Estes autores avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana e moduladora pelo método da microdiluição em microplacas de extrato etanólico e da fração de hexano das folhas da *D. ecastaphyllum* contra estirpes bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e estirpes fúngicas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. A partir dos resultados puderam verificar que este produto natural combate microrganismos resistentes aos antibióticos, podendo ser utilizado como um potencial modulador, uma vez que reduziu a concentração mínima inibitória do antibiótico testado e diminuiu o risco de toxicidade.

Própolis

A palavra própolis vem do grego, o qual “pro” significa “em defesa de” e “polis” é “cidade”, ou seja, “em defesa da colmeia”. As abelhas utilizam a própolis para selar paredes e fissuras, reparar alvéolos, embalsamar insetos mortos que não podem ser retirados da colmeia, proteção química contra infestações, agindo como um antimicrobiano e mantendo um ambiente mais estéril, com temperatura adequada no seu interior e impedindo a entrada de água e vento (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; SALATINO et al., 2005; SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Este produto apícola é utilizada pela humanidade na medicina tradicional como um importante antibiótico natural (TORETI et al., 2013), sendo reafirmada a sua ação terapêutica não somente de modo empírico, como também científico (ALDAY et al., 2016), demonstrando propriedades antioxidantes (BITTENCOURT et al., 2015), antimicrobiana (CASQUETE et al., 2016), anti-inflamatória (CAVENDISH et al., 2015), anti-cárie (BUENO-SILVA et al., 2013a), antiproliferativa (FROZZA et al., 2014), entre outras aplicações.

A própolis é proveniente de substâncias resinosas, viscosas e aromáticas coletadas pelas abelhas, em brotos, botões florais, folhas, fluxos de seivas, tricomas e outras estruturas vegetais (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA, 2005). A estas substâncias são também acrescentadas secreções salivares produzidas pelas abelhas, especialmente, a β -glicosidase que

hidrolisa os flavonoides glicosilados a agliconas, cera e pólen, o que torna o produto mais maleável produzindo um material quimicamente complexo (OLDONI et al., 2011). Este produto da colônia, em média, é composto por 50-60% de resinas e bálsamos vegetais, 30-40% de cera, 5-10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% pólen e 5% de outras substâncias; contendo compostos fenólicos, ácidos graxos, terpenóides, vitaminas, aminoácidos, açúcares e proteínas (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000; TORETI et al., 2013).

Huang et al. (2014) compilou dados das bases BioMed Central, Biosis Citation Index, Medline e PubMed dos anos de 2000 a 2012, reportando 241 compostos químicos isolados pela primeira vez, a partir da própolis de diferentes partes do mundo e desse total, 112 foram classificados como flavonoides.

A composição química da própolis e suas propriedades biológicas, podem variar com a época do ano, fitogeografia, variações sazonais (pluviosidade, variações de temperatura), espécie de abelha, variabilidade genética da abelha rainha e relação intrínseca com a origem botânica, a qual altera as propriedades organolépticas como consistência, aroma e cor (TEIXEIRA et al., 2010; VALENCIA et al., 2012).

Própolis Brasileira

No Brasil foram identificados 13 tipos diferentes de própolis classificadas com base na cor, textura, características físico-química, localização geográfica e quando possível a origem botânica (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000a; DAUGSCH et al., 2008). Para esta classificação foram analisadas 500 amostras de própolis proveniente de diferentes regiões do Brasil, em que cinco grupos distintos pertenciam à região sul e apresentaram colorações que variaram de amarelo à marrom esverdeado, uma verde amarronzada oriunda da região sudeste e seis tipos pertencentes à região nordeste com uma grande variedade de cor (amarela, marrom, castanho, vermelha) (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000a; PARK et al., 2000b). Posteriormente, por meio de observações das visitas das abelhas às plantas, coloração da resina e comparação do perfil químico de 20 amostras de diferentes plantas com a

própolis de coloração vermelha da região nordeste foi determinada o décimo terceiro tipo de própolis brasileira, a própolis vermelha (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Dentre os treze tipos de própolis brasileira, somente quatro destas tem afinidades botânicas definidas. Park et al. (2002) foram os primeiros autores a investigar a origem botânica das própolis pertencentes aos grupos 3, 6 e 12, por meio das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ao comparar os perfis químicos e determinar que as espécies *Hyptis divariata*, *Populus alba* e *Baccharis dracunculifolia* são, respectivamente, às fornecedoras de recursos que dão origem a estas própolis. Silva et al. (2008) realizaram uma análise exploratória de 20 amostras das resinas de plantas tendo como pré-requisito a observação de visitas das abelhas e por técnicas cromatográficas chegaram a conclusão que *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. é a espécie botânica da própolis vermelha brasileira. Dausch et al. (2008) realizaram testes químicos com amostras de própolis vermelha proveniente dos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba, assim como Jain et al. (2014) com análises de DNA da própolis de Sergipe, reafirmaram a origem botânica supracitada.

Própolis Vermelha Brasileira

A própolis de coloração vermelha é encontrada em diferentes países do continente americano, como Venezuela (TRUSHEVA et al. 2004), Brasil (ALENCAR et al., 2007), Cuba (CUESTA-RUBIO et al., 2007) e México (LOTTI et al., 2010). Apesar de terem o mesmo nome, apresentam particularidades na composição química e nas ações biológicas (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016), não sendo possível generalizar a origem botânica para esse tipo de própolis. Neste contexto, Piccinelli et al. (2011) realizaram análise comparativa por HPLC e verificaram que a própolis vermelha brasileira e a cubana apresentaram perfis químicos semelhantes a *D. ecastaphyllum*, enquanto que, Trusheva et al. (2006) indicaram as espécies do gênero *Clusia* como a provável origem botânica da própolis da Venezuela.

No Brasil, a produção desse tipo de própolis ocorre, principalmente, em áreas de manguezais, costa marítima e leitos de rios nos estados de Alagoas,

Bahia, Paraíba, Pernambuco e Sergipe (SILVA et al., 2008). Estudos avaliando compostos químicos em amostras de própolis provenientes de todos os Estados supracitados e *D. ecastaphyllum* contribuíram para o consenso de que essa espécie vegetal é a principal fonte de resina para a produção da própolis vermelha brasileira (PVB) (DAUGSCH et al., 2008). Em contrapartida, López et al. (2014) observaram que as composições químicas de amostras comerciais oriundas de diferentes regiões do país foram contrastantes, sugerindo que há pelo menos duas espécies vegetais como fonte resinífera, demonstrando assim a necessidade de mais estudos sobre a caracterização da própolis vermelha brasileira.

Foram identificados aproximadamente 100 compostos fenólicos em amostras de PVB, sendo que, medicarpina, 3-Hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana, rutina, liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, pinobanksina, quercetina, luteolina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, binobanksin-3-acetato, biochanina A, vestitol, neovestitol, 7-O-metilvestitol, homopterocarpana, vesticarpana, 3,8-dihidróxi-9-metóxipterocarpana, 3,4-dihidróxi-9-metóxipterocarpana, guttiferone E/xanthochymol, oblongifolina A, 7,30-dihidróxi-50-metóxi-isoflavone, naringenina, mucronulatol, retusapurpurina A e B, todos eles foram encontrados tanto nas amostras de própolis, quanto na *D. ecastaphyllum* (AWALE et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2011; HUANG et al., 2014).

Li, Awale e Kadota (2008) conseguiram isolar 42 flavonóides, os quais foram categorizados em flavanonas, flavonol, isoflavonas, isoflavononas, isoflavanos, calconas, auronol, pterocarpans, 2-arilbenzofurano, neoflavonoide e lignanas. Deste, a formononetina, daidizeína e a isoliquiritigenina foram considerados marcadores químicos da própolis vermelha (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008). A presença destes e de outros compostos contribuíram para que a própolis vermelha do estado de Alagoas alcançasse a Certificação Geográfica pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), garantindo a designação de origem desse produto ao Estado de Alagoas (SEBRAE, 2012). Alguns estudos apresentam resultados que contestam essa certificação, pois estes compostos químicos também compõem a própolis vermelha produzida em outros Estados, a exemplo da Paraíba (LI et al., 2008) e de Sergipe (MENDONÇA-MELO et al., 2017). Fica evidente que a própolis

vermelha não é um produto exclusivo do Estado de Alagoas, sendo necessário mais estudo que caracterize esse produto nas diferentes regiões do Brasil.

Potencial de uso da Própolis Vermelha Brasileira (PVB)

A PVB tem atraído notória atenção devido aos princípios ativos até então nunca descrito para esse produto (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; ALDAY et al., 2016). Esses princípios estão relacionados à variedade de compostos químicos que atuam de maneira isolada ou sinérgica nos alvos biológicos (SCHMIDT-DANNERT, 2015).

Estudos têm demonstrado que PVB apresenta amplo espectro antimicrobiano contra bactérias gram-positivas, *Actinomyces naeslundii* (OLDONI et al.; 2011; BUENO-SILVA et al.; 2013b); *Bacillus subtilis* (RIGHI et al., 2011); *Enterococcus faecalis* (ARAÚJO; MARCUCCI, 2011; RIGHI et al. 2011; LÓPEZ et al., 2015); *Staphylococcus aureus* (ALENCAR et al., 2007; OLDONI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012; BUENO-SILVA et al., 2013b; LÓPEZ et al. 2015; NEVES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018); *Staphylococcus epidermidis* (LÓPEZ et al., 2015; NEVES et al., 2016); *Streptococcus mutans* (OLDONI et al.; 2011); *Streptococcus pyogenes* (RIGHI et al. 2011; LÓPEZ et al., 2015); *Streptococcus sobrinus* (BUENO-SILVA et al., 2013b), e bactérias gram-negativas, *Enterobacter aerogenes* (LÓPEZ et al., 2015); *Escherichia coli* (RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012; LÓPEZ et al., 2015); *Haemophilus influenzae* (LÓPEZ et al., 2015), *Klebsiella pneumoniae* (RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012); *Neisseria meningitidis* (LÓPEZ et al., 2015); *Proteus mirabilis* (RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012); *Proteus morgani* (LÓPEZ et al., 2015); *Proteus vulgaris* (BISPO JUNIOR et al., 2012); *Pseudomonas aeruginosa* (RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012; LÓPEZ et al., 2015; NEVES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018); *Salmonella typhimurium* (RIGHI et al., 2011); *Shigella flexneri* (RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012) e fungos, principalmente espécies do gênero *Candida* (LOTTI et al., 2011; RIGHI et al., 2011; BISPO JUNIOR et al., 2012; LÓPEZ et al., 2015; PIPI et al., 2015; NEVES et al., 2016).

Isoflavonóides isolados da PVB, tais como isoliquiritigenina, vestitol e neovestitol, apresentaram maior ação antibacteriana quando comparados a extratos de própolis em diferentes solventes (OLDONI et al., 2011, BUENO-SILVA et al., 2013a), porém as frações clorofórmica e hexânica obtiveram melhores resultados na inibição da oxidação do ácido linoléico que os compostos isolados (OLDONI et al., 2011). O vestitol e neovestitol foram aplicados de maneira subcutânea em ratos com inflamações peritoneais e demonstraram capacidade de inibir a migração de neutrófilos a níveis significativamente semelhante ao do antibiótico comercial dexametasona (BUENO-SILVA et al., 2013b). Os mesmos autores relataram a eficácia desses compostos, assim como do fluoreto, na redução de desenvolvimento de cáries dentárias e funcionaram como um anti-biofilme contra expressão de fatores virulentos por *Streptococcus mutans*. As incorporações da PVB em formulações de liberação prolongada podem atenuar as cáries (VASCONCELOS et al., 2014).

Corrêa et al. (2017) investigando o efeito do extrato de PVB na inflamação e cicatrizações de feridas em ratos e tratando-os oralmente com doses diárias 100 mg/kg por um período de nove dias consecutivos constataram que a PVB reduziu a área lesada, verificaram uma menor quantidade de neutrófilos e macrófagos, sugerindo que o extrato foi eficiente no processo de cicatrização de feridas. Estes autores também analisaram por cromatografia líquida acoplada ao detector de massa (LC / MS) a composição química (ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos) desse extrato, ressaltando que não foi possível determinar qual composto químico estava influenciando à ação anti-inflamatória devido a não quantificação destes.

Neves et al. (2016) identificaram e quantificaram na PVB um ácido fenólico e sete flavonóides, dos quais a formononetina, principal constituinte, foi isolado e determinada sua ação antimicrobiana. Esta isoflavona exibiu propriedades antimicrobianas e antifúngica em seis estirpes de leveduras evidenciando uma concentração mínima inibitória (25 µg/mL) menor que a do antibiótico nistatina. A administração de 10 mg/kg/dia de uma solução contendo formononetina e xantoquimol (isolado da PVB) em ratos com infestações tumorais demonstrou ação antiproliferativa inibindo o crescimento de algumas linhagens de células e em outras promoveu a apoptose (NOVAK et al., 2014).

A própolis vermelha tem demonstrado uma diminuição substancial na percentagem de sobrevivência de células tumorais de: cancro pancreático (AWALE et al., 2008), carcinoma de Lewis do pulmão, adenocarcinoma do pulmão, fibrossarcoma (LI; AWALE; KADOTA, 2008), leucemia, cancro da mama (KAMIYA et al., 2012), células humanas normais de rim epitelial embrionárias, cancro do colo uterino (FROZZA et al., 2013), carcinoma epidermóide da laringe (FROZZA et al., 2014), glioblastoma e carcinoma do cólon (MENDONÇA et al., 2015).

Ensaio antiproliferativos frente a células tumorais (MORAES et al., 2010; MACHADO et al., 2016) e anti-inflamatórios ligados à via cutânea em cicatrização com filmes curativos à base de colágenos (ALMEIDA et al., 2013), mostraram que a própolis vermelha apresentou maior potencial biológico quando comparada com outros tipos de própolis. Extrato etanólico da PVB também provou ter efeito significativo na redução de inflamações renais e da hipertensão *in vivo*, fazendo-se necessário mais esclarecimento sobre o seu mecanismo de ação (TELES et al., 2015).

Regueira-Neto et al. (2018), avaliaram as atividades antiprotozoária e citotóxica de extratos hidroetanólicos de própolis vermelha provenientes de diferentes estados do Brasil (Pernambuco e Alagoas) contra os parasitas *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* e, as comparou com os resultados obtidos para o extrato de resina vegetal da *D. ecastaphyllum*. Todas as amostras expressaram atividades citotóxicas e antiprotozoária contra os parasitas, no entanto, as amostras de própolis demonstraram melhor desempenho inibitório que a resina da *D. ecastaphyllum*. Também foi observado que as concentrações que induziram metade do efeito máximo contra os parasitas não causaram danos celulares elevados aos fibroblastos. Os autores consideram que estes produtos naturais podem ser uma alternativa no tratamento da leishmaniose e doença de Chagas.

Os estudos sobre a atividade antioxidante da própolis vermelha e seus compostos isolados são promissores na eliminação e na inibição de radicais livres (MENDONÇA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2018). A quercetina, daidzeína, genisteína e apigenina foram identificados como os principais compostos responsáveis pela ação antioxidante (FRANCHI JUNIOR et al., 2012; KAMIYA et al., 2012). Onze compostos (ácido vanílico, ácido cafeico,

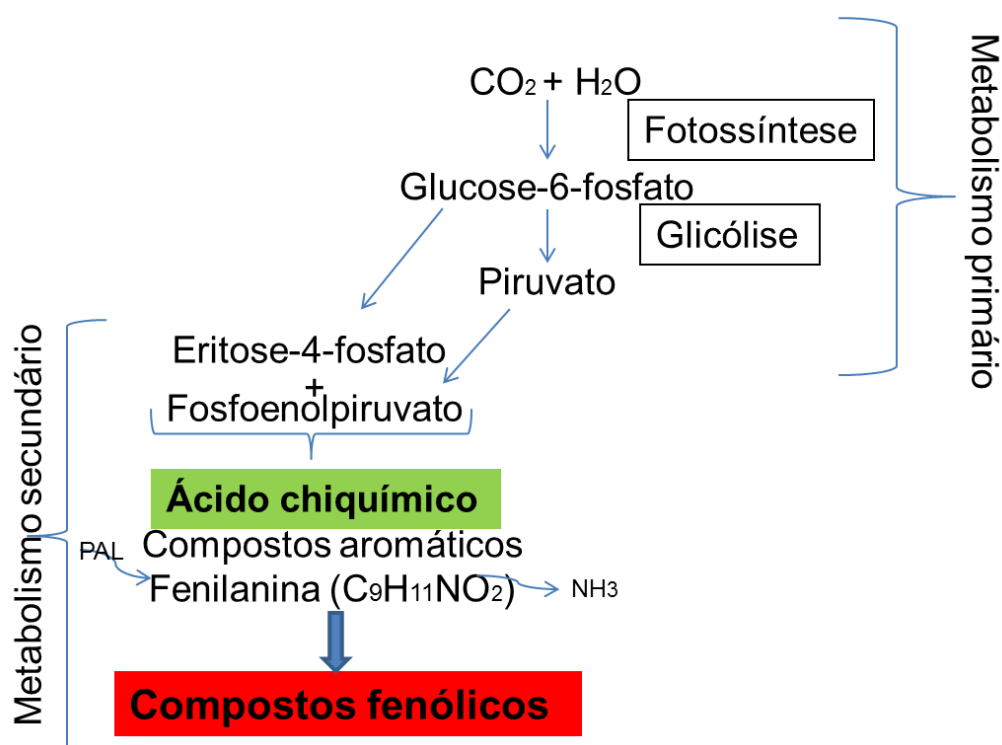
ácido gálico, ácido trans-cinâmico, ácido 2,4-dihidroxicinâmico, ácido p-cumárico, ácido trans-ferúlico, trans-farnesol, ácido sinápico, rutina, quercetina) extraídos da PVB foram avaliados na estabilidade oxidativa de uma emulsão funcional contendo óleo de *Echium* como fonte ômega 3 (u- 3 FA), ácido linolênico, ácido estearidônico e ésteres de esteroide vegetal (ESPINOSA et al., 2015). Os autores observaram com base nas análises de hidroperóxido e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que o ácido sinápico e a rutina mostraram a mesma atividade antioxidante que terc butil-hidroquinona (antioxidante padrão), podendo apresentar uma alternativa de antioxidantes naturais na indústria de alimentos funcionais.

Compostos fenólicos: principais responsáveis pelas atividades biológicas de produtos naturais

Os compostos fenólicos são substâncias químicas que estão associadas às principais ações biológicas dos produtos naturais. Essas substâncias são oriundas de metabólitos secundários distribuídos em tecidos vegetais, principalmente das angiospermas, que dispõe de uma gama diversificada de combinações estruturais e químicas, as quais podem variar desde moléculas simples a polímeros complexos de alto peso molecular (WATERMAN; MOLE, 1994; COHEN; KENNED, 2010; OZCAN et al., 2014).

Esses metabólitos secundários são derivados das vias biossintéticas dos vegetais, a partir de metabolismo da glicose e seguindo a via bioquímica intermediária, onde o ácido chiquímico é o precursor de cumarinas, taninos hidrolisáveis, aminoácidos aromáticos e compostos fenilpropanóides, como via principal de formação dos polímeros naturais (Figura 1) (ESCARPA; GONZALEZ, 2001; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Figura 1. Esquema da via bioquímica intermediária (metabolismo secundário) das plantas na formação dos compostos fenólicos. PAL= fenilalanina amônio liase.



Quimicamente os compostos fenólicos apresentam anel aromático ligado a um ou mais radical hidroxila, incluindo os derivados dos grupos funcionais (HARBORNE, 1989; ESCARPA; GONZALEZ, 2001). Diante da grande variedade de combinações químicas, há várias classificações na literatura para os compostos fenólicos, sendo que essa revisão seguirá a caracterização proposta por Ozcan et al. (2014), os quais estabeleceram quatro grupos: ácidos fenólicos (fenóis), flavonoides, taninos e estilbenos.

Os ácidos fenólicos são subdivididos em duas classes, ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos apresentam estruturas com sete átomos de carbono ($\text{C}_6\text{-C}_1$), tendo como representantes o ácido gálico, protocatecuico, vanílico, entre outros, e os ácidos hidroxicinâmicos com nove átomos de carbono ($\text{C}_6\text{-C}_3$), onde existem seis átomos na estrutura do anel aromático e três formando uma cadeia lateral, como nos ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico (NACZK; SHAHIDI, 2004; COHEN; KENNEDY, 2010).

Os flavonóides apresentam baixo peso molecular com estrutura de dois anéis aromáticos e um anel heterociclo oxigenado totalizando 15 átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$) (WANG; HELLIWELL, 2001). Com base no número de átomos de carbono da cadeia heterocíclica tem-se a diferenciação das classes dos flavanonas, flavonol, isoflavonas, isoflavanonas, antocianinas, também quando há substituição nos anéis aromáticos formam-se novos compostos inclusos nas classes dos flavonoides. Estes são os metabólitos secundários mais abundantes no reino vegetal (COSTA et al., 2015).

Os taninos são compostos responsáveis pela adstringência dos frutos e produtos naturais, solúveis em água, de peso molecular alto e podem ser encontrados associados a proteínas e polissacarídeos (ANGELO; JORGE, 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Pela sua estrutura química pode ser classificado em taninos condensáveis e taninos hidrolisáveis. Os taninos condensáveis formam-se a partir da condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), que devido à pigmentação avermelhada das antocianidinas também podem ser chamados de proantocianidinas. A esterificação da flavan-3-ol com o ácido gálico ou ácido elágico formam os taninos hidrolisáveis (HASLAM, 2007).

Os estilbenos são hidrocarbonetos caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos ligados a pontes de etano (C_2H_6) (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000), sendo o resveratrol o composto mais conhecido tendo como fontes mais notáveis as uvas e vinhos (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; GAENSLY et al., 2015).

Os compostos fenólicos são fontes que auxiliam a reprodução e o crescimento das plantas (SHAHIDI; NACZK, 1995), sendo responsáveis pela cor, sabor (LAGO et al., 2014) e aroma (compostos voláteis) (COSTA et al., 2015), que mediam às interações plantas-polinizadores (CHEYNIER, 2012). Sua qualidade e quantidade podem ser influenciadas pela genética da planta, composição do solo, métodos de coleta e armazenamento do produto (CARDOZO-JÚNIOR et al., 2007). Participam da estratégia de defesa em condições de estresse, tais como, injúrias, infecções, variação da luminosidade, incidência da radiação ultravioleta, salinidade, uso de contaminantes e déficit hídrico (MUCHUWETI et al., 2007; BETTINE et al., 2014). Dentre as características de maior relevância dos compostos fenólicos

nas condições de estresse supracitados encontra-se a elevada capacidade antioxidante que promove a defesa química dos vegetais (TAKSHAK; AGRAWAL, 2015).

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir e combater os danos oxidativos causados pelos radicais livres, os quais são átomos ou moléculas que atuam na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas fundamentais para a manutenção celular (ALVES et al., 2010). O excesso desses radicais pode provocar danos deletérios à mitocôndria (MAILLOUX; JIN; WILLMORE, 2014), lipídios da membrana plasmática, (NETO; CORDEIRO, 2016), proteínas, ácido desoxirribonucleico-DNA (CITRON et al., 2016), desencadeando perda da homeostase celular e diversas patologias (ALVES et al., 2010).

Recentemente, investigações têm indicado que os radicais livres são os responsáveis pelo envelhecimento (MARTINS et al., 2016), doenças cardiovasculares (CARRIZZO et al., 2013), inflamatórias (GANGA et al., 2012) e degenerativas como o câncer (CHAN; CHAN, 2015; CITRON et al., 2016). Com isso, a busca por produtos naturais com matriz química que apresentem mecanismo de ação associados a propriedades biológicas tem se tornado uma alternativa importante para obtenção de novos fármacos (CAVENDISH et al., 2015; ATANOSOV et al., 2015). Dentre eles, as plantas são as principais fontes de compostos secundários com princípios ativos para medicamentos (GURNANI et., 2014). Além das plantas, a própolis, produto natural elaborado por abelhas a partir de resinas vegetais, tem sido amplamente estudada devido as atividades biológicas (ALDAY et al., 2016; RUFATTO et al., 2017). Além do interesse farmacológico, também é utilizado como alimento funcional podendo ser considerado como produto nutracêutico (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

Métodos para determinação de compostos fenólicos

Métodos espectrofotométricos

Muitos são os esforços de pesquisadores para desenvolver métodos espectrofotométricos eficazes para determinação de compostos fenólicos.

Porém há muitos entraves no desenvolvimento de métodos devido a grande polaridade das substâncias, tornando-as muito reativas e susceptíveis a ação de enzimas; solubilidade dos compostos, que pode variar conforme o solvente; método de extração, condições e tempo de estocagem; além da escolha da substância padrão (ANGELO; JORDE, 2007). Metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio são os principais solventes utilizados para a extração dos compostos fenólicos (LIANHE et al., 2012; AL-JADIDI; HOSSAIN, 2016).

Os métodos espectrofotométricos mais utilizados para quantificar fenóis totais (ácidos fenólicos) e flavonóides totais em produtos naturais são, respectivamente, o Folin-Ciocalteu e o cloreto de alumínio (SINGLETON; ROSSI, 1965; SINGLETON; ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTOS, 1999; ALENCAR et al., 2007; HOSSAIN et al., 2013).

O método do Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas dos fenóis. As reações de coloração dos compostos redutores como os fenóis na presença do reagente vão formar áreas azuis permitindo a leitura em espectrofotômetro com absorvância entre 620 a 765 nm. Essa metodologia consiste em misturar extrato dos referidos produtos a serem analisados com carbonato de sódio (4%) e reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e após incubação, realiza-se a leitura em espectrofotômetro e expressam o resultado em mg equivalentes ao composto padrão por grama de amostra (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Diversos pesquisadores utilizam como padrão para a calibração espectrofotométrica o ácido gálico (LIANHE et al., 2012; AHMAD et al., 2015; MACHADO et al., 2016). O ácido gálico, apesar de pertencer ao grupo dos ácidos fenólicos, se diferencia quanto ao arranjo químico estrutural, o que influencia na quantificação dos fenóis totais (ANGELO; JORDE, 2007).

O mesmo princípio é válido para a determinação dos flavonóides totais, no qual a coloração da reação é amarela, tendo como o reagente principal o cloreto de alumínio. Como padrão, utiliza-se a quercetina e a leitura espectrofotométrica é feita a um comprimento de onda entre 415 a 425 nm (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012; HOSSAIN et al., 2014; AHMAD et al., 2015).

Os métodos espectrofotométricos são generalistas, independente do tipo de reagente utilizado, detectando grupos de compostos fenólicos. Contudo, podem reduzir substâncias como ácido ascórbico e sofrer interferência das proteínas, cera, gorduras, terpenos, entre outros. No entanto, são frequentemente utilizados como indicativos dos compostos fenólicos em amostras de produtos naturais para avaliações das propriedades biológicas (SHAHIDI; NACZK, 1995; ANGELO; JORDE, 2007).

Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico que visa à separação de moléculas em uma mistura por meio de um sistema composto por uma fase estacionária e uma fase móvel (KUPIEC, 2004). Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os compostos presentes na amostra com afinidade e interação com a fase estacionária, são separados por migrações diferentes na coluna e, ao chegar a um detector adequado, são identificados e/ou quantificados (COLLINS, 2006).

Este método consiste em uma ferramenta extremamente importante na avaliação da complexidade e variabilidade de componentes químicos que desempenham papel fundamental como princípio ativo de novos fármacos, nutracêuticos, alimentos funcionais e aditivos alimentares (DONNO et al., 2016). Diferentes técnicas cromatográficas tais como, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), podem ser aplicadas, permitindo determinar compostos fenólicos (COLLINS, 2006), voláteis (MARÓSTICA-JÚNIOR et al., 2008), lipídios (PURCARO et al., 2016), glicosídeos (SOUZA et al., 2015), entre outros.

Aliados as técnicas cromatográficas, a incorporação da espectrometria de massa tornou as análises mais eficientes na identificação, a partir da massa molecular dos compostos (BECERRA-HERRERA et al., 2014). No entanto, para a quantificação desses compostos se faz necessário dispor de um grande acervo de substâncias padrões para comparar com os resultados expressos pelas análises cromatográficas (MEDIC-SARIC et al., 2004).

Os ensaios envolvendo a técnica de HPLC vêm sendo aprimorados e substituídos pela Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) (KIM et

al., 2013). A UHPLC fornece um incremento significativo na redução do tempo, solvente, volume de amostra injetada, alta sensibilidade e boa resolução (MARTINEZ-HUÉLAMO et al., 2015).

Apicultura x área de estudo

Diante do exposto nessa revisão fica evidente que a Própolis Vermelha Brasileira é um produto natural promissor, tanto para fins fitoterápicos, como nutracêuticos. Apesar das inúmeras investigações com esse produto ainda pouco se sabe da composição química e origem botânica da própolis vermelha produzida, especificamente, na região sul do estado da Bahia, Brasil. A apicultura nessa região destaca-se como a principal produtora de pólen desidratado. Nos últimos anos, após a divulgação da qualidade química da própolis vermelha da Bahia e do interesse de empresas japonesa nesse produto natural, os apicultores do litoral sul da Bahia passaram a se dedicarem também na produção e beneficiamento da própolis vermelha (CONCEIÇÃO, 2010), a qual acredita-se que é proveniente da resina da *D. ecastaphyllum* (DAUGSCH et al., 2008) que se encontra distribuída por toda a costa litorânea brasileira (CARVALHO, 1997). Neste contexto, este estudo teve por objetivo a determinação microbiológica, físico-química, atividade biológica e a similaridade da composição fenólica da *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e da própolis vermelha produzida em apiários no Litoral Sul do estado da Bahia, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.2, p.101-107, 2015.

ALDAY, E.; NAVARRO-NAVARRO, M.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; ROBLES-ZEPEDA, R.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Advances in Pharmacological

Activities and Chemical Composition of Propolis Produced in Americas. In CHAMBÓ, E. D. **Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2016. 250p.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.278-83, 2007.

AL-JADIDI, H.S.K.; HOSSAIN, M.A. Determination of the total phenols, flavonoids and antimicrobial activity of the crude extracts from locally grown neem stems. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.6, n.5, p.376-379, 2016.

ALMEIDA, E.B.; CARDOSO, J.C.; LIMA, A.K.; OLIVEIRA, N.L.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA, S.O.; SOUZA, I.C.L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.147, n.2, p.419–425, 2013.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ARAÚJO, K.C.D.S.; MARCUCCI, M.C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v.3, n.1, p.9-14, 2011.

ARAÚJO, K.M.; LIMA A.; SILVA, J.N.; RODRIGUES, L.L.; AMORIM, A.G.N.; QUELEMES P.V.; SANTOS, R.C.; ROCHA, J.A.; ANDRADES, É.O.; LEITE, J.R.S.A.; MANCINI-FILHO, J.; TRINDADE, R.A. Identification of Phenolic

Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. **Antioxidants**, v.3, n.1, p.159-175, 2014.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.

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

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.29-32, 2005.

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

BECERRA-HERRERA, M.; SÁNCHEZ-ASTUDILLO, M.; BELTRÁN, R.; SAYAGO, A. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid–liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography–triple–quadrupole mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v.57, n.1, p.49–57, 2014.

BETTINI, M.O.; COSCOLIN, R.B.S.; BRESSAN, D.F.; GOMES, E.R.; BROETTO, F. **Enzimas antioxidativas em tecidos vegetais**. In BROETTO, F. Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas, Cultura Acadêmica, Editora UNESP, Botucatu: IBB, 2014.

BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E.O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n.1, p.03-10, 2012.

BITTENCOURT, M.L.F.; RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v.76, n.3, p.449-457, 2015.

BOHRER, C.B.A.; DANTAS, H.G.R.; GRONEMBERGER, F.M.; VINCENS, R.S.; ANDRADE, S.F. Mapeamento de vegetação e do uso do solo no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.1, p.1-23, 2009.

BUENO-SILVA, B.; KOOB, H.; FALSETTA, M.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n.10, p.1233-1242, 2013a.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G.V.J.; NAPIMOGA, M.H., ROSALEN, P.L. 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, 2013b.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p. 347-363, 1998.

CARDOZO-JÚNIOR, E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.7, p.553–558, 2007.

CARRIZZO, A.; FORTE, M.; DAMATO, A.; TRIMARCO, V.; SALZANO, F.; BARTOLO, M.; MACIAG, A.; PUCA, A.A.; VECCHIONE, C. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. **Food and Chemical Toxicology**, v.61, p.215-226, 2013.

CARVALHO, A.M. A Synopsis of the Genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v.49, n.1, p.87-109, 1997.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: CNPF-EMBRAPA, 1994. 640p.

CASQUETE, R.; CASTRO, S.M.; JÁCOME, S.; TEIXEIRA, P. Antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis in “Alheira”, a fermented meat sausage. **Cogent Food e Agriculture**, v.2, n.1125774, p.1-7, 2016.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Isoflavone, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v.80, p.1044-1062, 2000.

CATALANI, E.; SERAFINI, F.P.; ZECCHINI, S.; PICCHIETTI, S.; FAUSTO, A.M.; MARCANTONI, E.; BUONANNO, F.; ORTENZI, C.; PERROTTA, C.; CERVIA, D. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for câncer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. **Pharmacological Research**, v.113, p.409-420, 2016.

CAVENDISH, R.L.; SANTOS, J. DE S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAUJO, E.; SILVA, A.A. B., THOMAZZI, S.M., CARDOSO, J.C., GOMES, M.Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology Journal of Ethnopharmacology**, v.173, n.15, p.127-133, 2015.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M.C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Bioscience**, v.11, n.1, p.8-16, 2015.

CHAITRA, S.; KUMAR, N.N.; SHALINI, P.; RAJ, K.M.S. In vitro antioxidant activity of methanolic extracts of *Dalbergia paniculata* Roxb. **International Journal of Pharma Sciences**, v.5, n.2, p.938-944, 2015.

CHAN, J.Y.H.; CHAN, S.H.H. Activation of endogenous antioxidants as a common therapeutic strategy against cancer, neurodegeneration and cardiovascular diseases: A lesson learnt from DJ-1. **Pharmacology e Therapeutics**, v.156, p.69-74, 2015.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v.11, n.2, p.153-177, 2012.

CITRON, B.A.; AMEENUDDIN, S.; UCHIDA, K.; SUO, W.Z.; SANTACRUZ, K.; FESTOFF, B.W. Membrane lipid peroxidation in neurodegeneration: Role of thrombin and proteinase-activated receptor-1. **Brain Research**, v.15, n.1643, p.10-17, 2016.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant Metabolism and the Environment: Implications for Managing Phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.50, n.7, p.620-643, 2010.

COLLINS, C.H. Princípios Básicos de cromatografia. In COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos da cromatografia**, Editora Unicamp, 2006, p.453.

CONCEIÇÃO, L. **Qualidade da própolis vermelha atrai japoneses para Canavieiras**. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura, 2010. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2010/11/18/qualidade-da-pr%C3%B3polis-vermelha-atrai-japoneses-para-canavieiras>, acesso em: janeiro de 2017.

CORRÊA, F.R.S.; SCHANUEL, F.S.; MOURA-NUNES, N.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; DALEPRANE, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v.86, p.162-171, 2017.

COSTA, D.C.; COSTA, H.S.; ALBUQUERQUE, T.G.; RAMOS, F.; CASTILHO, M.C.; SANCHES-SILVA, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science e Technology**, v.45, n.2, p. 336-354, 2015.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.18, p.7502-7509, 2007.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; OCAMPOS, F.M.M.; BURCI, L.M.; NASCIMENTO, K.F.; JESUS, C.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.9, n.35, p.881-885, 2015.

DAUGSCH, A.; MORAIS, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red própolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DI STASI, L.G.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Antlântica. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18, p.1041-2014, 2002.

DIXIT, P.; CHILLARA, R.; KHEDGIKAR, V.; GAUTAM, J.; KUSHWAHA, P.; KUMAR, A.; SINGH, D.; TRIVEDI, R.; MAURYA, R. Constituents of *Dalbergia sissoo* Roxb. leaves with osteogenic activity. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.22, n.2, p.890–897, 2012.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.12, n.5, p.1157-1161, 1973.

DONNO, D.; MELLANO, M.G.; CERUTTI, A.K.; BECCARO, G.L. Biomolecules and Natural Medicine Preparations: Analysis of New Sources of Bioactive Compounds from *Ribes* and *Rubus* spp. Buds. **Pharmaceuticals**, v.9, n.7, p. 1-12, 2016.

EDAYADULLA, N.; RAMESH, P. Antibacterial activity of various stem extracts of *Dalbergia Coromandeliana*, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.3, p.1388-1391, 2012.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n.2, p.57-139, 2001.

ESPINOSA, R.R.; INCHINGOLO, R.; ALENCAR, S.M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; CASTRO, I.A. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chemistry**, v.182, n.1, p.95-104, 2015.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v.130, n.4, p.797-813, 2012.

FRANCHI JR., G.C.; MORAES, C.S.; TORETI, V.C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A.E.; PARK YK. 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, p.1-6, 2012.

FRANCIS, J.K. **Wildland Shrubs of the United States and Its Territories: Thamnic Descriptions**. United States Department of Agriculture Forest Service

International Institute of Tropical Forestry and Forest Service, Rocky Mountain, 830 p., 2004.

FREIRES, R.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.110 p.267-279, 2016.

FROZZA, C.O.D.S., GARCIA, C.S.C., GAMBATO, G., DE SOUZA, M.D.O., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F.F., SEIXAS, F.K.; COLLARESE, T.; BORSUKE, S.; DELLAGOSTINE, O.A.; HENRIQUESA, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidante and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p.137–142 52, 2013.

FROZZA, C.O.S.; RIBEIRO, T.S.; GAMBATO, G.; MENTI, C.; MOURA, S.; PINTO, P.M.; STAATS, C.C.; PADILHA, F.F.; BEGNINI, K.R.; LEON, P.M.M.; BORSUK, S.; SAVEGNAGO, L.; DELLAGOSTIN, O.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red própolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.63, p.195-204, 2014.

GAENSLY, F.; AGUSTINI, B.C.; SILVA, G.A.; PICHETH, G.; BONFIM, T.M.B. Autochthonous yeasts with β -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. **Journal of Functional Foods**, v.19, p. 288-295, 2015.

GANGA, R.B.; MADHU, K.P.; VIJAYA, R.A.D. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.5, n.6, p.455-458, 2012.

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

GUEDES, G.M.M.; ALBUQUERQUE, R.S.; SOARES-MACIEL, R.S.; FREITAS, M.A.; SILVA, V.A.; LIMA, E.O.; LIMA, M.A.; CUNHA, E.V.L.; COUTINHO,

H.D.M. Isolation of phytosterols of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae) and modulation of antibiotic resistance by a possible membrane effect. **Arabian Journal of Chemistry**, v.16, p.1-5, 2014.

GURNANI, N.; MEHTA, D.; GUPTA, M.; MEHTA, B.K. Natural Products: Source of Potential Drugs. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v.6, n.6, p.171-186, 2014.

HARBORNE, J.B. General Procedures and Measurements of Total Phenolics. In: **Methods in Plant Biochemistry**, pp. 1–28. Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.) Academic Press, San Diego, CA., 1989.

HASLAM, E. Vegetable tannins-lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v.68, n.22-24, p.2713-2721, 2007.

HOSSAIN, M.A.; AL-RAQMI, K.A.; AL-MIJIZY, Z.H.; WELI, A.M.; AL-RIYAMI, Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.9, p.705-710, 2013.

HOSSAIN, M.A.; KALBANI, M.S.A.A.; FARSI, S.A.J.A.; WELI, A.M.; ALRIYAMI, Q. Comparative study of total phenolics, flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of different polarities fruits crude extracts of *Datura metel* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, n.5, p. 378-383, 2014.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.L.; HU, F. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, n.12, p.19610-19632, 2014.

ISMAIL, H.F.; ZEZI, A.U.; HAMZA, Y.A.; HABIB, D.U. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the methanol leaf extract of *Dalbergia saxatilis* Hook F. in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.166, p. 74–78, 2015.

JAIN, S.; MARCHIORO, G.; MENDONÇA, L.; BATISTA, M.; ARAÚJO, E. Botanical origin of the Brazilian red própolis: new approach using DNA analysis. **Journal of Apicultural Science**, v.58, n.2, p.79-85, 2014.

KAMIYA, T., NISHIHARA, H., HARA, H. AND ADACHI, T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.44, p.11065–11070, 2012.

KHAN, M.I.; KHAN, M.R. Gastroprotective Potential of *Dalbergia sissoo* Roxb. Stem Bark against Diclofenac-Induced Gastric Damage in Rats. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v.4, n.5, p.271-277, 2013.

KHAZIR, J.; RILEY, D.L.; PILCHER, L.A.; DE-MAAYER, P.; MIR, B.A. Anticancer agents from diverse natural sources. **Natural Product Communications**, v.9, n.11, p.1655–1669, 2014.

KIM, J.H.; SIM, H.; LEE, K.R.; HONG, J. UHPLC Separation of Structurally Diverse Markers in Fangchi Species. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.34, n.3, p.975-978, 2013.

KUPIEC, T. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.8, n.3, p.223-227, 2004.

LAGO, C.; ASSANI, E.C.; ZANZI, C.; LANDONI, M.; TROVATO, R.; PILU, R. Development and study of a maize cultivar rich in anthocyanins: coloured polenta, a new functional food. **Plant Breeding**, v.133, n.2, p.210-217, 2014.

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

LIANHE, Z.; XING, H.; LI, W.; ZHENGXING, C. Physicochemical Properties, Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Dalbergia odorifera* T. Chen Seed Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.5, p.883-890, 2012.

LIMA, H.C. de 2015. *Dalbergia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22908>>.

Acesso em: novembro 2015.

LIU, R.; WEN, X.; SHAO, F.; ZHANG, P.; HUANG, H.; ZHANG, S. Flavonoids from Heartwood of *Dalbergia cochinchinensis*. **Chinese Herbal Medicines**, v.8, n.1, p.89-93, 2016.

LÓPEZ, B.G.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F.

Phytochemical markers of different types of red própolis. **Food Chemistry**, v.146, n.1, p.174–180, 2014.

LOPEZ, B.G.C.; LOURENÇO, C.C.; ALVES, D.A.; MACHADO, D.;

LANCELLOTTI, M.; SAWAYA, A.C.H.F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: na alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.3, p.677-687, 2015.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Nova Odessa: Editora Plantarum, vol. 2, 2013. 352p.

LOTTI, C.; CAMPO FERNANDEZ, M.; PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; MARQUEZ HERNANDEZ, I.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican própolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, n.4, p.2209-2213, 2010.

LOTTI, C.; CASTRO, G.M.M.; SA, L.F.R.; SILVA, B.A.F.S.; TESSIS, A.C.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELLI, L.; FERREIRA-PEREIRA, A. Inhibition of

Saccharomyces cerevisiae Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.5, p.901-907, 2011.

LUO, Y.; COBB, R.E.; ZHAO, H. Recent advances in natural product Discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v.30, p.230-237, 2014.

MACHADO, B.A.S.; SILVA, R.P.D.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; ROCHA, J.L.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, v.8, p.1-26, 2016.

MAILLOUX, R.J.; JIN, X.; WILLMORE, W.G. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. **Redox Biology**, v.19, n.2, p.123–139, 2014.

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

MARTÍ, R.; VALCÁRCEL, M.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; ROSELLÓ, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. **Food Chemistry**, v.169, p.169–179, 2015.

MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; TULIPANI, S.; JÁUREGUI, O.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; ESTRUCH, R.; TORRADO, X.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Sensitive and Rapid UHPLC-MS/MS for the Analysis of Tomato Phenolics in Human Biological Samples. **Molecules**, v.20, n.11, p.20409-20425, 2015.

MARTÍNEZ-SOTRES, C.; LÓPEZ-ALBARRÁN, P.; CRUZ-DE-LEÓN, J.; GARCÍA-MORENO, T.; RUTIAGA-QUIÑONES, J.G.; VÁZQUEZ-MARRUFO, G.; TAMARIZ-MASCARÚA, J.; HERRERA-BUCIO, R. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.69, p.38-40, 2012.

MARTINS, F.J.; CANESCHI, C.A., VIEIRA, J.L.F., BARBOSA, W., RAPOSO, N.R.B. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry e Photobiology, B: Biology**, v.161, p.34-39, 2016.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochrommtry**, v. 14, p.825-826, 1975.

MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MORNAR, A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. **Croatica Chemica Acta**, v.77, n.1–2, p. 361-366, 2004.

MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.540-548, 2012.

MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.357, p.1-12, 2015.

MENDONÇA-MELO, L.; MOTA, E.; LOPEZ, B.; SAWAYA, A.; FREITAS, L.; JAIN, S.; BATISTA, M.; ARAÚJO, E. Chemical and genetic similarity between

Dalbergia ecastaphyllum and red propolis from the Northeastern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.56, n.1, p.1-8, 2017.

MORAES, C.S.; DAUGSCH, A.; LI, H.; RHIM, J.S.; PARK, Y.K. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.539-543, 2010.

MUCHUWETI, M.; KATIVU, E.; MUPURE, C.H.; CHIDEWE, C.; NDHLALA, A.R.; BENHURA, M.A.N. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, v.2, n.5, p.414-420, 2007.

MUTAI, P.; HEYDENREICH, M.; THOITHI, G.; MUGUMBATE, G.; CHIBALE, K.; YENESEW, A. 3-Hydroxyisoflavanones from the stem bark of *Dalbergia melanoxylon*: Isolation, antimycobacterial evaluation and molecular docking studies. **Phytochemistry Letters**, v.6, n.4, p.671-675, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NASCIMENTO, T.G.; SILVA, A.S.; CONSTANT, P.B.L.; SILVA, S.A.S.; MOURA, M.A.B.F.; ALMEIDA, C.P.; SILVA, V.C.; WANDERLEY, A.B.; BASÍLIO JÚNIOR, I.D.; ESCODRO, P.B. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v.57, n.2, p.1-9, 2018.

NETO, A.J.P.; CORDEIRO, R.M. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1858, n.9, p.2191-2198, 2016.

NEVES, M.V.M.; 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.; SAWAYA, A.C.H.F.; LÓPEZ, B.G.; FORTES, M.A.H.Z.; GIORGI, R.R.; MARUMO, K.T.; RODRIGUES, R.F.; MARIA, D.A. 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, p.91-102, 2014.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; ROSALEN, P.L. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v.77, n.2, p.208-213, 2011.

OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; YILMAZ-ERSAN, L.; DELIKANLI, B. Phenolics in Human Health. International. **Journal of Chemical Engineering and Applications**, v.5, n.5, p. 393-396, 2014.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. **Mensagem Doce**, v.58, p.2-7, 2000a.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p.85-90, 2000b.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

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.484-6491, 2011.

PIPPI, B.; LANA, A.J.D.; MORAES, R.C.; GUEZ, C.M.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L.F.S.; POSER, G.L.V.; FUENTEFRIA, A.M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red própolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, n.4, p.839-850, 2015.

PURCARO, G.; BARP, L.; BECCARIA, M.; CONTE, L.S. Characterisation of minor components in vegetable oil by comprehensive gas chromatography with dual detection. **Food Chemistry**, v.1, n.212, p.730–738, 2016.

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

REGUEIRA-NETO, M.S.; SAULO RELISON TINTINO, S.R.; ROLÓN, M.; CORONAL, C.; VEGA, M.C.; BALBINO, V.Q.; COUTINHO, H.D.M. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food and Chemical Toxicology**, v.1, p.1-7, 2018.

ROY, N.; LASKAR, R.A., SK, I.; KUMARI, D.; GHOSH, T.; BEGUM, N.A. A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of *Dalbergia sissoo* Roxb., an Indian medicinal plant. **Food Chemistry**, v.126, n.3, p.1115-1121, 2011.

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.

SAHA, S.; ANISUZZMAN, M.; ISLAM, M.K.; MONDAL, H.; TALUKDER, C. Antibacterial and cytotoxic potential of *Dalbergia spinosa* roxb. Leaves, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.4, n.1, p.512-515, 2013.

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

SCHMIDT-DANNERT, C. NextGen microbial natural products Discovery. **Microbial Biotechnology**, v.8, n.1, p.26-28, 2015.

SEBRAE. **Origem garantida**, Empreender, Globo Rural. v.323, p.1-3, 2012.

SHAHIDI F, NACZK M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic; 1995.

SHARMA, V.; JANMEDA, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia nerifolia* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-6, 2014.

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

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v.101, n.3, p.1012-1018, 2007.

SILVA, F.H.M.; SANTOS, F.A.R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of Northeastern Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v.17, n.5, p.423-443, 2009.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v.41, n.3, p.295-311, 2010.

SINGH, N.K.; JYOTI, VEMU, B.; PRERNA, M.; SINGH, H.; DUMKA, V.K.; SHARMA, S.K. Acaricidal activity of leaf extracts of *Dalbergia sissoo* Roxb. (Fabaceae) against synthetic pyrethroid resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Research in Veterinary Science**, v.106, n.1–6, p.1-6, 2016.

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, 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.

SONGSIANG, U.; HAHNVAJANAWONG, C.; YENJAI, C. Cytotoxicity of chemical constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v.82, n.8, p.1169-1174, 2011.

SOUZA, A.H.P., CORRÊA, R.C.G., BARROS, L., CALHELHA, R.C., SANTOS-BUELGA, C., PERALTA, R.M., BRACHT, A., MATSUSHITA, M.; FERREIRA, I.C.F.R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ile paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v.78, p.286-294, 2015.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S.B. Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.97, p.124-138, 2015.

TAUCHEN, J.; BORTL, L.; HUML, L.; MIKSATKOVA, P.; DOSKOCIL, I.; MARIK, P.; VILLEGAS, P.P.P.; FLORES, Y.B.; DAMME, P.V.; LOJKA, B.;

HAVLIK, J.; LAPCIK, O.; KOKOSKA, L. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n.6, p.728-737, 2016.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P.C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian Propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p.307-315, 2010.

TELES, F.; SILVA, T.M.; CRUZ JÚNIOR, F.P.; HONORATO, V.H.; COSTA, H.O.; BARBOSA, A.P.F.; OLIVEIRA, S.G.; PORFÍRIO, Z.; LIBORIO, A.B.; BORGES, R.L.; FANELLI, C. Brazilian Red Propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **Plos One**, v.10, n.1, p.1-15, 2015.

TORETI, V.C.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J.G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan própolis. **Fitoterapia**, v.75, n.7-8, p.683-689, 2004.

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

VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GALVEZ-RUIZ, J.C.; SALAS- REYES, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VELAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v.131, n.2, p.645–651, 2012.

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 e Research**. v.2, n.6, p.1-5, 2014.

VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Reviews**, v.3, n.6, p.307-319, 2009.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea infusions by high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v.34, p.223-227, 2001.

WANG, W.; WENG, X.; CHENG, D. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Food Chemistry**, v.89, n.5, p.45-49, 2000.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.

YOON, J.Y.; CHUNG, I.M.; THIRUVENGADAM, M. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities from transgenic hairy root cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **South African Journal of Botany**, v.100, p.80–86, 2015.

ZHANG, D.; ZU, Y.; FU, Y.; LUO, M.; GU, C.; WANG, W.; YAO, X. Negative pressure cavitation extraction and antioxidant activity of biochanin A and genistein from the leaves of *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Separation and Purification Technology**, v.83, p.91–99, 2011.

ARTIGO 1**PERFIL MICROBIOLÓGICO, QUÍMICO, NUTRICIONAL E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Dalbergia ecastaphyllum* (L.)
TAUB.**

¹Artigo será ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Food Science and Technology*, em versão na língua inglesa.

Perfil microbiológico, químico, nutricional e atividade antioxidante de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Resumo: Estudos do perfil químico da *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. têm indicado que esta é a provável origem botânica da própolis vermelha brasileira, produto apícola com elevado valor comercial devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas comprovadas. Apesar disso, poucas pesquisas são dedicadas às suas características fitoquímicas e biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a qualidade microbiológica, composição química e atividade antioxidante de amostras de caule e folha de *D. ecastaphyllum*. As amostras foram coletadas em fevereiro de 2015, na região do Sul do Estado da Bahia, Brasil. Foram efetuadas análises microbiológicas, determinação do perfil dos ácidos graxos, conteúdo total de fenóis e flavonoides e atividade antioxidante. Quanto à qualidade microbiológica, os microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais foram superiores nas amostras de caule quando comparados com as amostras das folhas. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e esporos de clostrídios sulfito redutores estavam ausentes em todas as amostras analisadas. Foram identificados 21 ácidos graxos ressaltando a presença dos ácidos da família ω 3 nos caules e ω 6 nas folhas. As folhas apresentaram melhor qualidade nutricional na fração lipídica na propensão dietética para humanos e, teor de compostos fenólicos e atividades antioxidantes mais elevados. Os resultados indicam que o caule e a folha da *D. ecastaphyllum* tem propriedades biológicas, particularmente as amostras das folhas são melhores para utilização na formulação de alimento funcional, na indústria farmacêutica e cosmética e como antioxidante natural.

Palavras-chave: Ácidos graxos; ômega-6; LC-MS; polifenóis; DPPH.

Microbiological, chemical, nutritional and antioxidant profile of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Abstract: Studies of the chemical profile of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. have indicated that this is the probable botanical origin of Brazilian red propolis, a bee product with high commercial value due to its innumerable proven therapeutic properties. Despite this, few researches are devoted to their phytochemical and biological characteristics. The aim of this study was to evaluate and compare the microbiological quality, chemical composition and antioxidant activity of stem and leaf samples of *D. ecastaphyllum*. The samples were collected in February 2015, in the southern region of the State of Bahia, Brazil. Microbiological analyzes, determination of fatty acid profile, total phenol and flavonoid content and antioxidant activity were performed. Regarding the microbiological quality, the aerobic mesophilic microorganisms, molds and yeasts, total coliforms were superior in the stem samples when compared to the leaf samples. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and sulphite reducing clostridial spores were absent in all samples analyzed. Twenty one fatty acids were identified, emphasizing the presence of ω 3 family acids in the stems and ω 6 in the leaves. The leaves presented better nutritional quality in the lipid fraction in the dietary propensity for humans, and phenolic compounds contents and higher antioxidant activities. The results indicate that the stem and leaf of *D. ecastaphyllum* have biological properties, particularly leaf samples are best for use in functional food formulation, pharmaceutical and cosmetic industry and as a natural antioxidant.

Key words: Fatty acids; omega-6; LC-MS; polyphenols; DPPH.

1. Introdução

Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. pertence à família Fabaceae e é amplamente distribuída ao longo da costa do continente americano (do sul da Flórida ao sul do Brasil), bem como na costa leste do continente africano. A ocorrência desta espécie normalmente está associada a áreas de leitos de rios, manguezais e vegetação de restinga (Carvalho 1997). Possui hábito de crescimento arbustivo ou liana, incandescente ou semi-prostrado e apresenta um emaranhado de ramos e caule que contribuem para melhor fixação (Lima 2015).

Essa espécie é muito utilizada na recuperação de áreas degradadas em locais alagáveis (Bohrer et al. 2009) e na medicina tradicional é usada como um remédio diurético, emético, bem como em inalações, controle da inflamação uterina e anemia (Guedes et al. 2014). Na triagem fitoquímica de extratos de várias partes de plantas deste gênero, foram identificados metabólitos com amplo desempenho biológico, como antioxidantes (Lianhe et al. 2012; Chaitra et al. 2015), antiinflamatórios (Ganga et al. 2012), antimicrobianos (Mutai et al. 2013; Guedes et al. 2014), citotoxicidade (Saha et al. 2013), fotoprotetor (Martins et al. 2016), entre outros. Souza et al. (2015), demonstraram que as partes da planta podem apresentar diferentes composições químicas e conseqüentemente diferentes atividades biológicas.

Por métodos cromatográficos identificou-se que os isoflavonoides como os principais metabólitos constituintes da *D. ecastaphyllum*, dentre eles: liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana (Donnelly et al. 1973; Matos et al. 1975; Dausch et al., 2008; Piccinelli et al. 2011). Alguns destes compostos também foram identificados em amostras de própolis vermelha cuja, o perfil químico *D. ecastaphyllum* é indicado como possivelmente a origem botânica desse produto apícola (Mendonça-Melo et a. 2017).

Muitos estudos têm identificado e elucidado inúmeras ações biológicas da própolis vermelha (Ruffato et al. 2017), no entanto, poucos estudos são destinados à sua fonte primária. Embora alguns trabalhos tenham investigado *D. ecastaphyllum*, a identificação de compostos bioativos, a qualidade microbiológica e a atividade antioxidante ainda não são bem conhecidas. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a qualidade

microbiológica, composição química e atividade antioxidante de amostras de caule e folha da *D. ecastaphyllum*.

2. Material e métodos

2.1 Coleta das Amostras

As amostras de caule e folha da *D. ecastaphyllum* (Figura 1) foram coletadas em fevereiro de 2015, em quatro áreas no município de Canavieiras (S 15° 40' 30" e W 38° 56' 50") e em uma área no município de Ilhéus (S 14° 47' 20" e W 39° 02' 58") no Estado da Bahia, Brasil, localizadas na região com fitofisionomia de Mata Atlântica, vegetação de mangue (IBGE, 2016). As áreas de coletas estavam vinculadas ao entorno de apiários produtores de própolis de coloração vermelha. Para cada área, foi selecionada de forma aleatória, uma planta para aquisição das amostras de caule com 10 cm de comprimento X 3 cm de diâmetros e folhas adultas. Essas amostras foram submetidas à secagem em estufas de circulação de ar (40 ° C) por 72 horas, em seguida trituradas em moinho de facas.

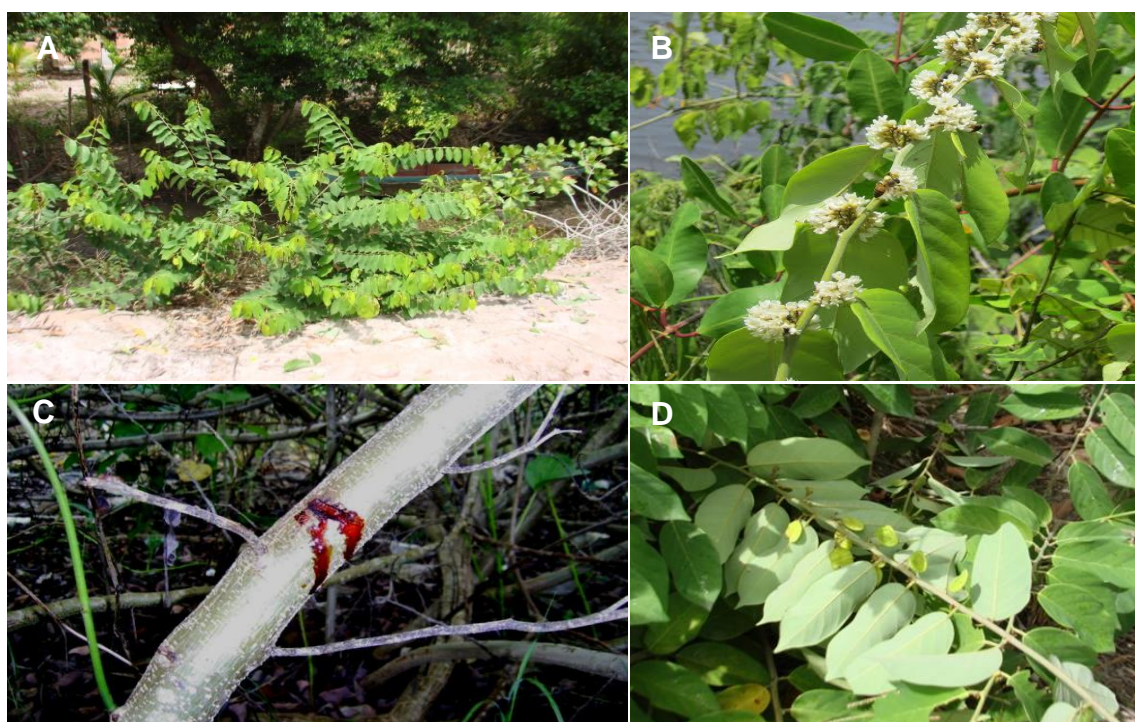


Figura 1. *Dalbergia ecastaphyllum*. A. Hábito de crescimento arbustivo; B. Flores agrupadas em panículas nas axilas das folhas; C. Caule com resina avermelhada; D. Folhas com frutos alados. Fotos: Acervo Insecta, 2015.

2.2 Análises microbiológicas do material *in natura*

Foram pesadas 10 g do material *in natura* acrescida 90 mL de solução salina peptonada estéril e homogeneizada durante 2 minutos em Stomacher Lab-Blender (Seward tipo 400, Londres, Reino Unido). Para a quantificação das unidades formadoras de colônias de microrganismos aeróbios mesófilos, sendo utilizada a metodologia preconizada por Silva et al. (2010) e para os bolores e leveduras o descrito na ISO 21527-2 (2008). A quantificação dos *Staphylococcus* coagulase positiva e dos esporos de clostrídios sulfito redutor foi efetuada de acordo o referido por Bennett e Lancette (2001) e pela ISO 15213 (2003). A contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi efetuada pelo método SimPlate (BioControl) e a detecção de *Salmonella* spp. pela técnica de Imunodifusão 1-2 Teste (AOAC, 2005).

2.3 Composição química

2.3.1 Obtenção de extrato seco

Na extração, utilizou-se 1g das amostras secas e trituradas em 12,5 mL de etanol a 70% com agitação constante à temperatura ambiente por 14 dias. Posteriormente, as amostras foram colocadas no banho de ultrassom (1h) e centrifugadas a 3000 rpm/10min, filtradas e evaporadas sob baixa pressão. Após a evaporação do solvente e estabilidade do peso das amostras, o extrato seco foi acondicionado em freezer (- 20 °C). Os extratos utilizados nas análises foram solubilizados em metanol à concentração de 4 mg/mL (Park et al. 1998).

2.3.2 Determinação dos ácidos graxos

O perfil dos ácidos graxos presentes nas amostras foi determinado por cromatografia gás-líquido com detecção por ionização de chama (GC-FID a 260°C) conforme Barros et al. (2010). Utilizou-se coluna capilar no equipamento modelo DANI GC 1000 (Izasa, Barcelona, Spain), instrumento equipado com um injetor split / splitless, com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey-Nagel (25 X 0,32 mm ID X 0,25 µm df). O método envolveu o processo de transesterificação, que consiste na solubilização das amostras em metanol, seguida do acréscimo de ácido sulfúrico e tolueno (na proporção 2:1:1 (v/v/v)) por, pelo menos, 12 h em banho maria a 50 °C e 160 rpm. A essa mistura foi adicionado 3 mL de água deionizada e 3 mL de éter dietílico para que

ocorra a separação de fases. Após a separação foi extraído a fase lipídica, filtrada em coluna contendo sulfato de sódio e acondicionado em recipiente âmbar.

O programa de temperatura de forno variou entre 3°C até atingir o limite de 220°C, totalizando 35.16 minutos por análise. O gás (hidrogênio) foi mantido a uma taxa de fluxo de 4,0 mL / min (0,61 bar), medido a 50 ° C. Para cada análise foi injetada no GC um volume de 1 µL de amostra transesterificada. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção relativos aos picos de amostras padrões de FAMES. Os resultados foram gravados e processados usando software CSW 1.7 (DataApex 1.7, Prague, The Czech Republic) e expressos em percentagem relativa de cada um dos ácidos graxos calculados pela normalização interna da área do pico cromatográfico.

2.4.1.1 Índice de qualidade nutricional da fração lipídica

Para avaliar a qualidade nutricional dos lipídios foram determinados o Índice de Aterogenicidade (IA), Índice de Trombogenicidade (IT) (Ulbricht e Southgate, 1991) e a relação entre Hipocolesterolêmico/Hipercolesterolêmico (H/H) (Santos-Silva et al. 2002).

2.4.2 Conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais

O conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais do extrato metanólico dos caules e folhas foram determinados pelo método colorimétrico, de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1999) e do Cloreto de Alumínio (Alencar et al. 2007 com modificações), respectivamente. Os extratos (0,5 mL) foram misturados a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de Na₂CO₃ (carbonato de sódio a 4%). Após incubação por 2h, à temperatura ambiente, determinou-se a absorbância a 760 nm. Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g) a partir da curva de calibração ($y = 0,0093x + 0,0287$; $R^2 = 0,9998$). Para obter o teor de flavonoides totais foram misturados 2 mL dos extratos à 2 mL de AlCl₃ (cloreto de alumínio a 2%). A absorbância foi medida a 420 nm após 1h de incubação à temperatura ambiente e o resultado expresso como miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ / g) a partir da curva de calibração ($y = 0,0353x + 0,0073$; $R^2 = 0,9995$).

Identificação dos compostos químicos por LC/MS

A identificação dos compostos químicos presentes em amostras de caule e folha da *D. ecastaphyllum* foram realizadas utilizando a Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL TM (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), controlada pelo LTQ Tune Plus 2.5.5, para o controle e aquisição dos dados o sistema Xcalibur 2.1.0. A fase móvel constituiu-se em um gradiente sistema: 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (A) e metanol grau HPLC (B). A separação foi realizada usando a coluna de fase reversa Gemini C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) da Phenomenex em modo negativo, temperatura mantida 25°C, os dados cromatográficos adquiridos por três canais de leituras a 280nm, 320nm e 360nm e as frações recolhidas de acordo com a visualização do perfil de UV (Falcão et al. 2013).

2.5 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método físico, conhecido como atividade sequestradora de radicais (DPPH), e o método químico, baseado na transferência de átomos de hidrogênio (sistema β-caroteno/ácido linoleico) (Alves et al. 2010). O butil-hidroxianisol (BHA) e o ácido ascórbico, respectivamente antioxidante sintético e antioxidante natural, foram utilizados como substâncias de referência para os dois métodos.

2.5.1 Atividade sequestradora de radicais livres – DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

A medida da atividade sequestradora do radical DPPH dos extratos metanólicos em diferentes concentrações foram realizadas de acordo com metodologia estabelecida por Barros et al. (2013). Neste método físico, a mistura da reação foi constituída por 0,3 mL da amostra em diferentes concentrações (0,004 a 0,4 mg / mL) e 2,7 mL da solução a 0,5 mM do radical DPPH em metanol. Após a incubação por 1h a temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada a 517 nm. A atividade antioxidante foi expressa pelo EC₅₀, ou seja, a concentração que induz a metade do efeito máximo.

2.6.2 Ensaio de branqueamento do β -caroteno

A oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico foi realizada de acordo a Barros et al. (2013). Neste método químico, foram pesadas 5 mg do β -caroteno, os quais foram diluídos em 25 mL de clorofórmio. Desta solução retirou-se uma alíquota de 4 mL, adicionou 80 μ L de ácido linoléico e 800 μ L de Tween 20. A mistura reativa foi submetida à completa evaporação do clorofórmio com auxílio de um rotaevaporador, o resíduo obtido foi redissolvido em 200 mL de água deionizada, previamente saturada com oxigênio por 30 minutos. Alíquotas de 4,5 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoleico foram misturadas a 0,2 mL dos extratos metanólicos na concentração de 0,1 mg/mL. A oxidação da emulsão foi monitorada espectrometricamente (UV-visível - Unicam Hekios Alpha), a absorbância mediu-se a 470 nm, no tempo inicial ($t=0$) e após 2h de incubação à 50°C. A atividade antioxidante (AA) foi expressa pela porcentagem de inibição em relação ao controle (emulsão + metanol) após o período de 2h de incubação de acordo a equação:

$AA = (RDC_{controle} - RDA_{mostra}) / RDC_{controle} * 100$, sendo:

$RDC_{controle} [= \ln(a / b) / 120]$ a porcentagem de branqueamento do β -caroteno sem a presença do antioxidante, onde: \ln é o logarítmo natural; a = absorbância no tempo 0; b = absorbância depois de 2h.

$DRA_{mostra} [= \ln(a / b) / 120]$ a porcentagem de branqueamento do β -caroteno com a presença do antioxidante, onde: \ln é o logarítmo natural; a = absorbância no tempo 0; b = absorbância depois de 2h.

2.7 Análise estatística

As avaliações foram realizadas em triplicada e os resultados experimentais foram apresentados como médias \pm desvio padrão. Para análise inferencial foram verificados a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilks e a homogeneidade de variância pelos testes de Levene's e Bartlett. Para comparar as diferenças entre as médias dos grupos de tratamentos (caule e folha) utilizou-se o teste t de *Student* não pareado, quando os valores se enquadram na distribuição normal (ácidos graxos, conteúdo de fenóis, DPPH e sistema β -caroteno / ácido linoléico) ou o teste não paramétrico Mann-Whitney, quando não se encaixavam na distribuição normal (conteúdo de flavonoides e contagem

de microrganismos). A análise multivariada de correlação canônica foi realizada para estabelecer correlação entre dois grupos de variáveis, sendo o grupo formado pelo conteúdo de fenóis e flavonoides, com o segundo grupo formado pelos diferentes métodos antioxidantes nos caules e folhas (β -caroteno/ácido linoleico e DPPH). O primeiro grupo representa as variáveis dependentes (Y), enquanto que o segundo grupo representa as variáveis independentes (X). O teste multivariado de Hotelling (aproximação da distribuição F) foi usado para verificar a significância dos pares das variáveis canônicas (Johnson e Wichern 1992). A porcentagem da variância explicada pela variável canônica foi determinada quadrado da correlação canônica. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R (versão 3.3.0) e adotado 5% ($p < 0,05$) como nível de significância.

3. Resultados e discussão

3.1 Avaliação da qualidade microbiológica

Como se pode observar na Figura 2, a contagem total das unidades formadoras de colônia para os microrganismos aeróbios mesófilos (variação de 9×10^3 a 2×10^5 cfu/g), bolores e leveduras (variação de 2×10^2 a 3×10^4 cfu/g), bem como para coliformes totais (variação de 1×10^2 a 4×10^3 cfu/g; Teste U Mann-Whitney, $p < 0,00001$) foram significativamente maiores nos caules que nas folhas de *D. ecastaphyllum*. Os vegetais, normalmente, apresentam uma carga microbiana proveniente do solo, da água e do ar (Gindri et al. 2012). No entanto, o caule por estar localizado em área mais sombreada e úmida da planta dispõe de condições mais favoráveis para a proliferação de microrganismos (Huang et al. 2012).

A determinação de fungos em vegetais e alimentos processados tornou-se de grande importância devido ao risco à saúde humana e animal, pois alguns fungos produzem metabólitos secundários tóxicos (Wambacq et al. 2016). Por outro lado, fungos como os endofíticos, associados a tecidos de plantas medicinais, podem conter compostos químicos bioativos economicamente úteis à saúde humana (Toghueo et al. 2017).

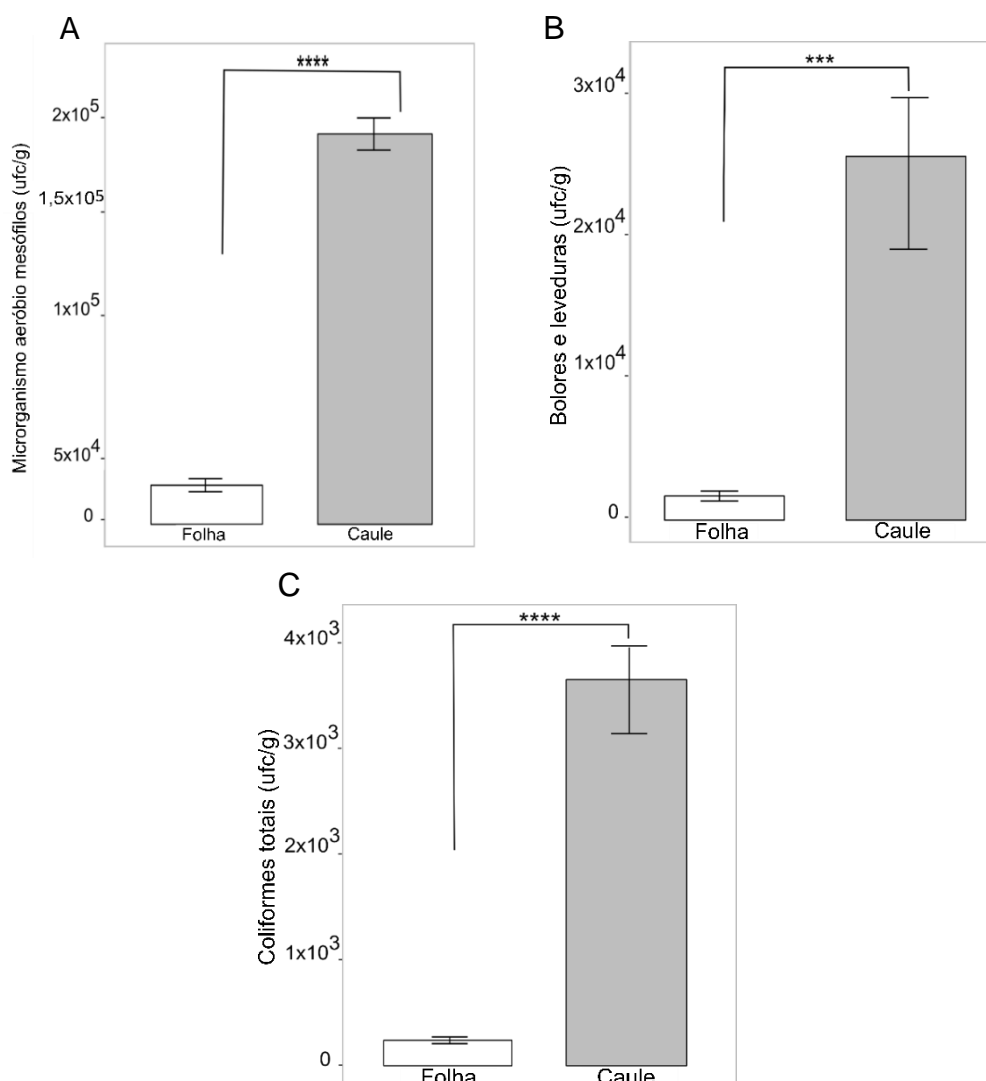


Figura 2. Nível de contaminação de microrganismos aeróbios mesófilos (A), bolores e leveduras (B), coliformes totais (C) em folhas e caule de amostras de *Dalbergia ecastaphyllum*. A significância estatística foi determinada pelo teste U de Mann-Whitney (***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$).

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, e de bolores e leveduras é comumente utilizada como indicador geral de qualidades dos produtos. Os coliformes totais são também indicadores de contaminação durante as etapas de produção, colheita e processamento, sendo os melhores indicadores da presença de microrganismos patogênicos de origem entérica, como *Escherichia coli* (Brasil, 2010). Não foram encontrados *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., esporos de clostrídio sulfito redutor e *Salmonella* spp. no

conjunto amostral. A ausência desses microrganismos indica que os tecidos vegetais da *D. ecastaphyllum* são seguros do ponto de vista microbiológico. Este é um resultado importante, pois esses microrganismos são potencialmente patogênicos e de interesse para a saúde pública (De-Melo et al. 2015).

3.2. Determinação dos ácidos graxos

Na composição lipídica dos caules e folhas da *D. ecastaphyllum* foram identificados 21 tipos de ácido éster de metil, com maiores percentuais para os ácidos saturados (SFA), seguidos de polinsaturados (PUFA) e dos monoinsaturados (MUFA). A quantidade de SFA em caules ($58,81 \pm 7,65\%$) foi maior ($p < 0,05$) do que nas folhas, PUFA foram maiores ($p < 0,05$) nas folhas ($46,06 \pm 4,43\%$) que nos caules e para MUFA não houve diferença estatística entre as amostras. Dentre os SFA, o ácido palmítico (C16:0) apresentou maiores níveis, e não diferiu estatisticamente entre as amostras. Para os PUFA, o ácido linoleico (C18:2n6c) esteve mais presente ($p < 0,05$) no caule ($24,50 \pm 5,16\%$), enquanto que nas folhas o mais abundante foi o ácido linolênico (C18:3n3 = $41,54 \pm 4,06\%$). Estes PUFA contribuíram com a maior percentagem de ômega-6 ($\omega 6$) para os caules e de ômega-3 ($\omega 3$) para as folhas (Tabela 1).

Em estudo comparativo das folhas, caules e da planta inteira de *Ilex paraguariensis*, o C18:3n3 se destacou nas folhas ($60,3 \pm 0,3\%$) e o C16:0 foi maior no caule ($25,2 \pm 1,8\%$) (Souza et al. 2015), demonstrando que há diferença na proporção dos ácidos graxos nas diferentes partes da planta. No presente estudo, também se observou a diferença na quantidade de C18:3n3 entre caule e folha, sendo a maior concentração encontrado nas folhas. No entanto, não foi encontrada diferença no teor C16:0 entre caule e folha.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos em amostras de caule e folha de *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub.

Ácido Graxos ⁽¹⁾	Caule	Folha
	Média (%) ± DP ^a	Média (%) ± DP ^a
Ácido caprílico (C8:0)	4,21 ± 1,20 *	2,57 ± 0,70
Ácido laurico (C12:0)	0,69 ± 0,40 *	0,25 ± 0,07
Ácido mirístico (C14:0)	1,10 ± 0,23	1,00 ± 0,11
Ácido pentadecanóico (C15:0)	0,65 ± 0,10 *	0,20 ± 0,04
Ácido cis-10-pentadecenoico (C15:1 CIS-10)	0,34 ± 0,11	NF ^b
Ácido palmítico (C16:0)	38,19 ± 4,47	37,68 ± 2,72
Ácido heptadecanóico (C17:0)	2,75 ± 0,57 *	1,05 ± 0,24
Cis-10-ácido heptadecanóico(C17:1 CIS-10)	NF	0,06 ± 0,03
Ácido esteárico (C18:0)	6,92 ± 1,35 *	5,27 ± 0,96
Ácido oleico (C18:1n9)	2,50 ± 1,51	3,08 ± 0,65
Ácido linoleáidico (C18:2n6t)	0,90 ± 0,35	NF
Ácido linoleico (C18:2n6c)	24,50 ± 5,16 *	6,00 ± 1,41
Ácido linolênico (C18:3n3)	11,02 ± 2,29	41,54 ± 4,06 *
Ácido araquínico (C20:0)	1,59 ± 0,65 *	0,30 ± 0,10
Ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2 CIS)	0,51 ± 0,14	NF
Cis-8,11,14-ácido eicosatrienoico (C20:3n6)	0,38 ± 0,23	NF
Ácido eicosatrienoico (C20:3n3)	NF	0,32 ± 0,20
Ácido beénico (C22:0)	0,97 ± 0,53*	0,18 ± 0,06
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,60 ± 0,32 *	0,20 ± 0,07
Ácido lignocerico (C24:0)	1,14 ± 0,82 *	0,30 ± 0,13
Ácido nervônico (C24:1)	1,04 ± 0,51	NF
Soma e proporções dos ácidos graxos		
SAT ^c	58,81 ± 7,65 *	50,82 ± 4,28
MUFA ^d	3,87 ± 1,75	3,11 ± 0,64
PUFA ^e	37,32 ± 6,49	46,07 ± 4,43 *
Total	100	100
n-6 ^f	25,78 ± 5,16 *	4,22 ± 1,41
n-3 ^g	11,02 ± 2,29	41,84 ± 4,06 *
PUFA:SAT ^h	0,65 ± 0,21	0,92 ± 0,15*
n-6:n-3 ⁱ	2,23 ± 0,40 *	0,10 ± 0,03
Índices de qualidade nutricional da fração lipídica		
IA ^j	1,15 ± 0,30 *	0,86 ± 0,08
IT ^k	1,02 ± 0,30*	0,32 ± 0,03
HH ^l	1,00 ± 0,32	1,27 ± 0,14*

⁽¹⁾ Os resultados dos ácidos graxos foram expressos em porcentagem relative. As médias seguidas por um asterisco (*) diferem estatisticamente pelo teste t de Student (p <0,05); ^a desvio padrão; ^b não encontrado; ^c total de ácidos graxos saturados; ^d total de ácidos graxos monoinsaturados; ^e total de ácidos graxos polinsaturados; ^f total de ácidos graxos ômega-6; ^g total de ácidos graxos ômega-3; ^h proporção de ácidos graxos polinsaturados e saturados; ⁱ proporção de ácidos ômega-6 e ômega-3; ^j Índice de Atenogenicidade; ^k Índice de Trombogenicidade; ^l Relação de Hipocolesterolemia / Hipercolesterolemia

Em óleos da semente de *D. odorifera* T. Chen, o C18:2n6c foi predominante quando comparado ao C18:3n3 (Lianhe et al. 2012). Esse

resultado foi semelhante ao encontrado nesse estudo para as amostras de caule de *D. ecastaphyllum*, enquanto que uma relação inversa na quantidade desses ácidos foi observada nas folhas. Essas diferenças podem estar relacionadas às características de cada espécie, bem como, as condições edafoclimáticas em que as amostras foram coletadas.

Os ácidos graxos são fontes energéticas e desempenham importantes funções metabólicas na constituição da bicamada fosfolipídica da membrana celular, regula as vias de sinalização intracelular, fator de transcrição e expressão gênica, assim como na produção de mediadores lipídicos bioativos (Calder 2015). Entre os ácidos graxos, o palmítico, é o mais abundante e encontrado no corpo humano desempenhando a função de garantir as propriedades física da membrana celular (Carta et al. 2017). Também foi relatado como precursor do ácido sapiênico (C16:1n10), o qual está presente nas glândulas sebáceas na pele (Ge et al. 2003). Fatores como dieta excessiva de carboidratos e bebidas alcoólicas associadas à estilo de vida sedentário pode desencadear um desequilíbrio dietético da proporção do C16:0 com os ácidos polinsaturados gerando efeitos negativos à saúde humana (Carta et al. 2017).

Caules e folhas da *D. ecastaphyllum* avaliadas neste estudo apresentaram valores que podem melhorar propensões dietéticas, embora as folhas tenham sido nutricionalmente melhores ($p < 0,05$), com valor mais elevado da relação PUFA:SAT ($0,92 \pm 0,15$) e inferior da relação n-6:n-3 ($0,10 \pm 0,03$). Segundo Departamento de Saúde e Segurança Social de Londres (1994) e Santos-Silva et al. (2002), alimentos com valores inferiores a 0,45 de PUFA:SAT favorecem ao aumento do colesterol no sangue e valores superior a 4,0 da relação n-6:n-3 riscos de doenças cardiovasculares. A presença dos ácidos polinsaturados ômega 6 e ômega 3, respectivamente em caule e folha, contribuíram para a qualidade nutricional das amostras, visto que dietas ricas nesses ácidos tem ação preventiva a doenças, a exemplo das cardiovasculares (Zhuang et al. 2018).

Os índices IA (Índice de Aterogenicidade) e IT (Índice de Trombogenicidade) nas folhas de *D. ecastaphyllum* foram menores ($p < 0,05$) do que nos caules e uma relação inversa foi encontrada para o índice HH (Hipocolesterolêmico / Hipercolesterolêmico) (Tabela A.1). Os índices indicam que dietas com baixos valores de IA e IT podem diminuir o risco de doenças

cardíacas coronarianas associadas de maneira isolada ou sinérgica, respectivamente, a aterosclerose e a trombose (Ulbricht e Southgate, 1991; Souza et al., 2015). O HH relaciona-se diretamente ao metabolismo do colesterol que em estudos com folhas de vegetais tem demonstrado sua eficácia na redução do estado hipercolesterolêmico em modelos experimentais (Cheurfa e Allem 2015). Vale salientar que para estes índices ainda não foram estabelecidos valores de referência.

3.3 Fenóis e flavonoides totais

As folhas apresentaram maiores conteúdos de fenóis ($698,52 \pm 9,64\%$; teste *t* de Student, $p = 0,00001$; Figura 3.A) e flavonóides ($47,51 \pm 2,21\%$; Teste Mann-Whitney, $p = 0,00001$; Figura 3.B) do que os caules. Chaitra et al. (2015), analisando os teores de compostos fenólicos por método espectrofotométrico com padrões semelhantes ao desse estudo, encontraram valores maiores de fenóis em caules ($9,32$ mg EAG/g) que em folhas ($8,54$ EAG/g) da *D. paniculata* Rouxb. Resultado semelhante foi relatado para flavonoides em caule ($13,22$ EQ/g) de *Grewia carpinifolia* (Adebiyia et al. 2017). Liu et al. (2017) observaram que a temperatura ambiental pode ser um fator relevante na quantificação dos teores de fenóis e flavonóides nas diferentes partes das plantas, não obtendo, exclusivamente, um valor preponderante para caules ou folhas da espécie *Lycium chinense* Miller.

Comparando o teor de compostos fenólicos encontrados em extratos metanólicos dos caules e folhas da *D. ecastaphyllum* com o extrato etanólico da própolis vermelha do estado de Sergipe ($300,36 \pm 0,01$ mg EAG/g e $57,6 \pm 0,01$ mg EQ/g) e o estado de Alagoas ($197,77 \pm 0,01$ mg EAG/g e $58,19 \pm 0,01$ mg EQ/g) (Machado et al. 2016) verificou-se a existência de uma alta concentração desses compostos nas partes vegetativas, principalmente nas folhas em relação ao extrato de própolis. Os dados supracitados corroboram com os obtidos neste estudo, o qual indica as folhas como fonte importante de compostos fenólicos.

Os teores de fenóis totais e flavonóides totais observados neste trabalho foram superiores aos reportados por Lianhe et al. (2012) e Chaitra et al. (2015) para outras espécies do gênero *Dalbergia* e na própolis vermelha. Este fato pode estar associado a diversos fatores, tais como: procedimento de extração e

preparação da amostra, variações sazonais, armazenamento e qualidade da matéria-prima (Rasheed et al. 2012).

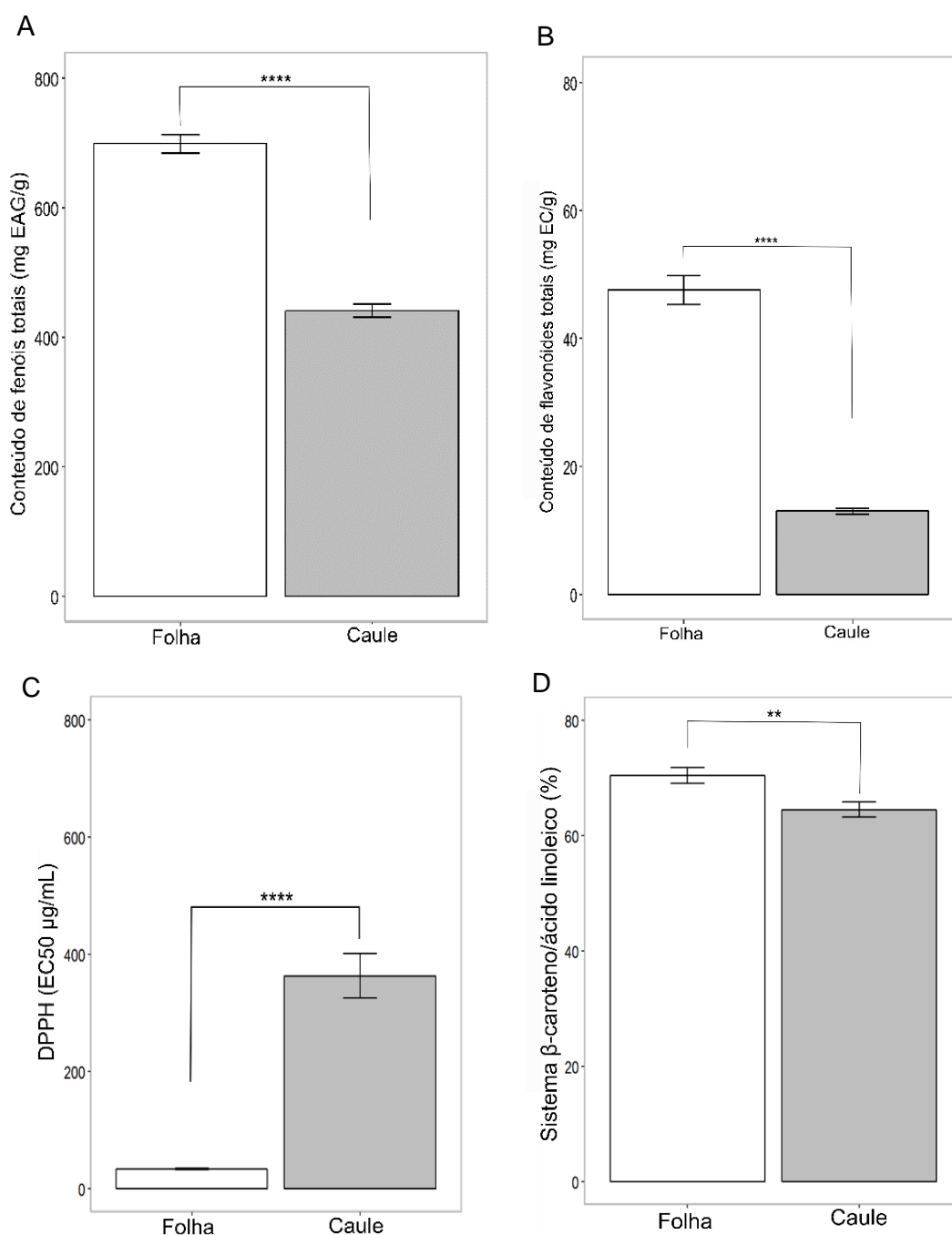


Figura 2. Teor de fenóis totais (A), teor de flavonóides totais (B), ensaios da atividade antioxidante dos extratos metanólicos do caule e folha de *Dalbergia ecastaphyllum* por DPPH (C) e banqueamento do β -caroteno / ácido linoleico (D). A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student para as variáveis fenólicas totais (***, $p < 0,0001$) e β -caroteno / ácido linoleico (**, $p = 0,01$) e o teste U de Mann-Whitney para as variáveis dos flavonóides totais (****, $p < 0,0001$) e DPPH (****, $p < 0,0001$). EAG = equivalente de ácido gálico; EQ = equivalente de quercetina; DPPH = 1,1-difenil-2-picrilhidrazila, EC50 = concentração que induz metade do efeito máximo.

Identificação dos compostos químicos por LC/MS

O perfil cromatográfico dos extratos do caule e folha da *D. ecastaphyllum* registrados a 280 nm estão apresentados e a identificação baseada na pesquisa da molécula desprotonada, suas fragmentações (MS) e por comparação com massas moleculares descritas na literatura, estão sumariados na Tabela 2.

O método LC-MS permitiu identificar 49 compostos químicos, sendo 38% compostos exclusivos encontrados no caule, 30% na folha e 32% comuns às amostras. Estes compostos estão distribuídos em trinta e oito flavonoides, nove ácidos fenólicos, e também foram detectados um ácido orgânico (ácido málico) na folha e um aldeído (4-hidroxibenzaldeído) no caule. Dentre os flavonóides, o maior número de compostos se enquadram na classe dos flavonols (n=18), seguido dos isoflavonoides (n=9), flavanones (n=5), flavanol (n=3), flavones (n=2) e com menor representação a dihidrochalcones (n=1). Somente nas folhas foi assimilado os flavones (derivados do luteolin). Os isoflavonoides, formononetina e medicarpina, estiveram presente tanto no caule como nas folhas.

Donnelly et al. (1973) e Matos et al. (1975) analisando o conteúdo de flavonóides em extrato de madeira da espécie *D. ecastaphyllum* registraram os compostos formononetina (C₁₆H₁₂O₄), isoliquiritigenina (C₁₅H₁₂O₄), daidzeína (C₁₅H₁₀O₄), vestitol (C₁₆H₁₆O₄), os quais também foram encontrados no neste estudo. Poucas investigações são realizadas exclusivamente com essa espécie, em sua maioria, estando vinculadas de maneira comparativa a sua resina com a composição química da própolis vermelha. Em vários estudos de composições químicas ficou evidente, principalmente, devido à presença de compostos como formononetina (m/z 267), biochanina A (m/z 283), pinocembrina (m/z 255), daidzeína (m/z 253), medicarpina (m/z 269), isoliquiritigenina (m/z 255), que a resina da *D. ecastaphyllum* é a principal matéria-prima para elaboração da própolis vermelha brasileira (Daugusch et al. 2008; Piccinelli et al. 2011; López et al. 2014; Mendonça-Melo et al. 2017).

Em outras espécies do gênero *Dalbergia* também verificaram o isoflavonoide formononetina na casca de *D. melanoxyton* (Mutai et al., 2013), pinocembrina, liquiritigenina, galangina, narigenina, isoquiritigenina em extratos etanólico do cerne da *D. conchichinensis* (Liu et al., 2016). A biochanina A e genisteína foram os principais compostos presentes nas folhas da *D. odorifera*

(Zhang et al. 2011), no entanto nesta investigação a biochanina A foi registrada somente no caule. Catequina, epicatequina, luteolin, naringenina, quercetina, daidzeína, ácido cafeico, são compostos considerados antioxidantes (Cömert e Gökmen 2018).

Nas amostras de caule e folha de *D. ecastaphyllum* foram identificados compostos promissores na promoção à saúde humana tais como: formononetina que tem demonstrado efeito potencial na atenuação de dermatites (Li et al. 2018a), inibição da proliferação e metástase de células do câncer (Zhang et al. 2018), neuroprotetor (Li et al. 2018b) e antibactericida (Mutai et al. 2015). A pinocembrina suprimiu a autofagia em células de melanoma (Zheng et al. 2018), demonstrou efeito protetor em lesão cerebral induzida pela isquemia (Tao et al. 2018) e em área neurovascular com déficits relacionados ao Alzheimer (Liu et al. 2014). A medicarpina pode ser utilizado como agente quimiopreventivo ou potencializador da citotoxicidade dos quimioterápicos em células cancerígenas resistentes (Gatouillat et al. 2015). A rutina reduziu os níveis de glicose plasmáticas e sérica associado ao diabetes, preveniu alterações degenerativas no coração, apresentou efeito anti-inflamatório frente a doenças intestinais, antialérgico contra a rinite e dermatites, anti-tumoral e antimicrobial, sendo essas atividades vinculadas principalmente, à elevada propriedade antioxidante desse composto (Gullón et al. 2017).

Tabela 2. Identificação de compostos químicos em amostras de caules e folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* usando LC / MS.

RT	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula	Tentativa de Identificação	Classe dos compostos	Amostras
2.41	289	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina	Flavanol	C
2.43	289	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatequina	Flavanol	C
2.87	387	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	Pentametoxi hidroxil flavonol	Flavanol	C
2.88	461	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Luteolin-O-glucuronide	Flavonas	F
2.89	179	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico	C
3.33	165	C ₉ H ₁₀ O ₃	Ácido ethoxy benzóico	Ácido hidroxibenzóico	F
3.33	133	C ₄ H ₆ O ₅	Ácido málico	Ácido orgânico	F
4.24	147	C ₉ H ₈ O ₂	Ácido cinâmico	Ácido hidroxicinâmico	F
4.42	207	C ₁₀ H ₈ O ₅	7,8- Dihidroxi-6-metoxicumarina	Ácido hidroxicinâmico	C; F
6.55	169	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	Ácido hidroxibenzóico	C; F
8.4	343	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	Homovanílico ácido-O-hexoside	Hydroxyphenylacetic acids	C
9.82	137	C ₇ H ₆ O ₃	Ácido salicilico	Ácido hidroxibenzóico	F

11.63	153	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido protocatecuico	Ácido hidroxibenzóico	C; F
14.96	609	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Kaempferol-diglucoside	Flavonol	F
15.12	609	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina	Flavonol	C; F
16.43	255	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocebrina	Flavanones	C
17.89	593	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	Tiliroside	Flavonol	F
19	447	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempferol-3-O-glucoside	Flavonol	C
19.46	121	C ₇ H ₆ O ₂	4-hidroxibenzaldeído	Hydroxibenzaldeído	C
20.13	593	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3-O-rutinoside	Flavonol	C; F
24.82	435	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	Florizina	Dihydrochalconas	F
26.12	579	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	Naringina	Flavanones	C
26.65	447	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Kaempferol 7- O-glucoside	Flavonol	F
26.96	447	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempferol-3-O-glucoside	Flavonol	F
27.03	593	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	Tiliroside	Flavonol	C
29.9	289	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina	Flavanol	F
29.9	289	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatequina	Flavanol	F
32.39	271	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Naringenina	Flavanones	C
34	625	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetina 3-sophoroside	Flavonol	F
35.8	223	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Ácido sinápico	Ácido hidroxicinâmico	C; F
39.14	595	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	Naringenina-O-dihexoside	Flavanones	F
43.79	463	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3-O-glucoside	Flavonol	F
45.35	817	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Kaempferol 3-diglucoside-7-glucoside	Flavonol	C; F
48.7	255	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Isoliquiritigenina	Isoflavonoides	C
50.05	253	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Daidzeína	Isoflavonoides	C
51.2	479	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Miricetina-3-O-glucoside	Flavonol	C
51.48	283	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Bichanin A	Isoflavonoides	C
53	285	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Flavonol	C
53.25	285	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Vestitone	Isoflavonoides	C
53.38	329	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Quercetina-dimetil-éter	Flavonol	F
55.64	269	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Medicarpina	Isoflavonoides	C; F
56.38	285	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Flavonol	F
56.64	301	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	Flavonol	C; F
58.8	271	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	Neovestitol	Isoflavonoides	F
58.91	271	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Naringenina	Flavanones	F
60	255	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocebrina	Flavanones	C; F
60.2	267	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetina	Isoflavonoides	C; F
61.07	271	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	Vestitol	Isoflavonoides	C
63.09	315	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₀	Quercetina-7-metil-éter	Flavonol	C
63.11	313	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Luteolin 3'-metil éter	Flavones	F
66.37	283	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Galangin-5-metil éter	Flavonol	F
69.87	285	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	(3S) -7-O-metilvestitol	Isoflavonoids	C
71.76	369	C ₂₁ H ₂₁ O ₆	Pinobanksin-3-O-hexanonate	Flavonol	C
73.94	353	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogêncio	Ácido hidroxicinâmico	C
76.57	435	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	Floridzin	Dihydrochalcones	C

F = folha; C = caule

3.4 Atividades Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir e combater os danos oxidativos causados pelos radicais livres (Alves et al. 2010). O excesso desses radicais pode provocar danos deletérios à mitocôndria (Mailloux et al. 2014), membrana plasmática (Neto e Cordeiro 2016), e ácido desoxirribonucleico-DNA (Citron et al., 2016), desencadeando perda da homeostase celular e diversas doenças patogênicas (Alves et al. 2010).

Uma das principais fontes de princípios ativos com potencial de bloqueio de radicais livres são os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, de interesse na produção de fármacos, nutracêuticos, alimentos funcionais e aditivos alimentares (Gil-Chávez et al. 2013; Atanasov et al. 2015).

O extrato metanólico das folhas analisadas revelou maior poder de redução do radical DPPH ($33,53 \pm 2,14 \mu\text{g/mL}$; teste Mann-Whitney, $p = 0,00001$) (Figura 3.C) e melhores resultados para o ensaio de branqueamento do β -caroteno ($70,37 \pm 1,36\%$; teste t de Student, $p = 0,0034$) (Figura 3.D), comparativamente com o caule. As substâncias de referência, ácido butil-hidroxianisol (BHA) ($11 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$) e ácido ascórbico ($22 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$), apresentaram maiores eficácia na redução ($p < 0,05$) do DPPH.

No que diz respeito ao ensaio de branqueamento do β -caroteno a atividade antioxidante do BHA ($95,62 \pm 1,15\%$) foi superior à dos nossos extratos enquanto que, a do ácido ascórbico foi menos expressivo ($43,63 \pm 0,95\%$).

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da casca *D. monetaria* em concentração de $5,46 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, apresentou melhor eficácia sequestradora de DPPH que as obtidas neste estudo (Martins et al. 2016). Ganga et al. (2012) observaram que a atividade sequestradora de radicais livres do extrato metanólico da folha de *D. paniculata* está relacionada com a ação anti-inflamatória testada em edema de ratos. Para o efeito antirradicalar (DPPH), o valor de EC_{50} ($70,6 \mu\text{g/mL}$) encontrado por esses autores precisou de uma concentração maior de extrato metanólico das folhas da *D. paniculata* que o extrato metanólico das folhas de *D. ecastaphyllum* ($33 \mu\text{g/mL}$).

O β -caroteno é um carotenoide que auxilia na inibição da auto-oxidação lipídica celular, porém em quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio ele pode sofrer oxidação. O sistema β -caroteno/ácido linoleico permite avaliar capacidade de um antioxidante na proteção do β -caroteno durante a

peroxidação do ácido linoleico (Alves et al. 2010). Souza et al. (2015) também observou que os extratos das folhas de *I. paraguariensis* preveniam melhor a degradação do β -caroteno do que os extratos do caule.

Com relação aos resultados da análise multivariada de correlação canônica, o primeiro par canônico foi significativo ($p < 0,01$) e com alto valor de correlação, o qual foi utilizado para a interpretação dos dados (Tabela 3). Os resultados revelam que 89% da variância entre os grupos de características são explicados pela função canônica 1. Logo, o conteúdo de fenóis e flavonóides apresentou correlação positiva ($r=0,89$) com o método β -caroteno/ácido linoleico e uma alta correlação negativa com o DPPH. Estes resultados indicam, respectivamente, que quanto maior os teores de compostos fenólicos, maior a inibição da peroxidação lipídica e menor concentração do antioxidante no sequestro dos radicais livres DPPH.

A análise de correlação canônica corrobora as observações de que a folha apresentou atividade antioxidante superior, independentemente do método testado, em comparação com o caule, o que pode ser explicado pelo elevado teor em compostos fenólicos (Figura 3.A; Figura 3.B). Estes são os principais compostos secundários das plantas e controlam ou atrasam os danos causados pelos radicais livres ao material genético ou à peroxidação lipídica (Farzaneh e Oliveira 2015).

Tabela 3. Correlação canônica e pares canônicos entre as variáveis (fenóis, flavonóides, β -caroteno / ácido linoleico e DPPH) dos grupos, caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum*.

Variáveis	Pares Canônicos	
	1ª Dimensão	2ª Dimensão
Fenóis	0,98	0,21
Flavonoides	0,96	-0,27
β -caroteno/ácido linoleico	0,53	0,12
DPPH ^a	-0,88	-0,02
r^b	0,89	0,15
F ^c	15,74**	0,577 ^{ns}
α^d	0,00	0,45

^a 1,1- Difenil-2- picrilhidrazilo; ** $p < 0,001$; ^{ns} – não significativo ($p < 0,05$); ^b Correlação canônica

^c Valor aproximado da estatística F; ^d Nível de significância

4. Conclusão

O caule e folha da *D. ecastaphyllum* apresentaram elevados teores de compostos fenólicos e conteúdos lipídicos com ácidos valiosos, como ácido linoléico e ácido linolênico (família do ômega) respectivamente. A presença dos flavonóides formononetina, pinocembrina, kaempferol, rutina, naringenina, medicarpina dentre outros, o que caracterizam composições químicas que merecem atenção devido a versatilidade de propriedades farmacológicas relatada pela literatura e atividade antioxidante apontada por este estudo. No entanto, as amostras de folhas obtiveram resultados significativamente superiores para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante quando comparados com às amostras de caules. A ausência de bactérias patogênicas nas amostras também é um resultado positivo.

Os resultados desse estudo apontam a *Dalbergia ecastaphyllum* como um promissor antioxidante natural à ser investigado para fins fitoterápicos.

Referência

Adebiyia, O.E., Olayemi, F.O., Ning-Hua, T., e Guang-Zhi, Z. (2017). *In vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 6(1), 10-14.

Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., e Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. Journal of Ethnopharmacology, 113, 278-283.

Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., e Aguiar, R.M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Química Nova, 33 (10), 2202-2210.

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., e Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances* 33, 1582-1614.

Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., e Ferreira, I.C.F.R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 544–550.

Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., e Ferreira, I.C.F.R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732-1740.

Bennett, R.W., e Lancette, G.A. (2001). *Staphylococcus aureus*, Chapter 12, rev. Jan. 2001. In *FDA Bacteriological analytical manual*, 8th ed., Rev.A. AOAC international, Gaithersburg, MD.

Bohrer, C.B.A., Dantas, H.G.R., Gronemberger, F.M., Vincens, R.S. e Andrade, S.F. (2009). Mapeamento de vegetação e do uso do solo no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 60(1), 1-23.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010). Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispões sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF.

Calder, P.C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1-15.

Carta, G., Murru, E., Banni, S. e Manca, C. (2017). Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiology*, 8, 1-14.

Carvalho, A.M. (1997). A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. *Brittonia*, 49 (1), 87-100.

Chaitra, S., Kumar, N.N., Shalini, P. e Sharu Raj, K.M. (2015). *In vitro* antioxidant activity of methanolic extracts of *Dalbergia paniculata* Roxb., *International Journal of Pharma Sciences*, 5(2), 938-944.

Cheurfa, M., e Allem, R. (2015). Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts *in vivo*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 142-144.

Citron, B.A., Ameenuddin, S., Uchida, K., Suo, W.Z., Santacruz, K., e Festoff, B.W. (2016). Membrane lipid peroxidation in neurodegeneration: Role of thrombin and proteinase-activated receptor-1. *Brain Research*, 15(1643), 10-17.

Cömert, E.D., Gökmen, V. (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105, 76-93.

Daugusch, A., Morais, C.S., Fort, P., e Park, Y.K. (2008). Brazilian red própolis - chemical composition and botanical origin *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 435-441.

Department of Health and Social Security. (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report on health and social subjects no 46. HMSO (Her Majesty's Stationer Office, London), p.178.

De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., e Almeida-Muradian, L. B. (2015). A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil. *Letters in applied microbiology*, 61(5), 477-483.

Donnelly, D.M.X., Keenan, P.J. e Prendergast, J.P. (1973). Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochemistry*, 12(5), 1157-1161.

Falcão, S.I., Tomás A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., e Vilas-Boas M (2013) Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Ind Crops Prod.*, 49, 805– 812.

Farzaneh, V., e Oliveira, I.S. (2015). A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of action, *Industrial Crops and Products*, 65, 247–258.

Ganga, R.B., Madhu, K.P., e Vijaya, R.A.D. (2012). Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 455-458.

Gatouillat, G., Magid, Bertin, A.A.E., H.O., Taouri, Morjani, H., Lavaud, C. e Madoulet, C. (2015). Medicarpin e millepurpan, dois flavonóides isolados de *Medicago sativa*, induzem a apoptose e superam a resistência a múltiplos fármacos nas células leucêmicas P388. *Phytomedicine*, 22(13), 1186-1194.

Ge, L., Gordon, J.S., Hsuan, C., Stenn, K., e Prouty, S.M. (2003). Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *Journal of Investigative Dermatology*, 120, 707-714.

Gil-Chávez, G. J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Heredia, J. B., Sepulveda, D., Yahia, E. M., e González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 5-23.

Gindri, A. L.; Laporta, L. V., e Santos, M. R. (2012). Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 14(3), 563-570.

Gullón, B.; Lú-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Lema, J.M.; Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities

and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science e Technology*, 67, 220-235

Guedes, G. M.M., Albuquerque, R.S., Soares-Maciel, R.S., Freitas, M.A., Silva, V.A., Lima, E.O., Lima, M.A. Cunha, E.V.L., e Coutinho, H.D.M. (2014). Isolation of phytosterols of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae) and modulation of antibiotic resistance by a possible membrane effect. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-5.

Huang, L., Gao, X., Liu, M., Du, G., Guo, J., e Ntakirutimana, T. (2012). Correlation among soil microorganisms, soil enzyme activities, and removal rates of pollutants in three constructed wetlands purifying micro-polluted river water. *Ecological Engineering*, 46, 98– 106.

ISO 15213. (2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. International Standards Organization, Switzerland.

ISO 21527-2. (2008). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds – Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95. International Standards Organization, Switzerland.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>, Acesso em: agosto de 2016.

Johnson, R.A.; Wichern, D.W. (1992). Applied multivariate statistical analysis. 3rd ed. New Jersey: Prentice-Hall, 642 p.

Khan, M.I. e Khan, M.R. (2013). Gastroprotective Potential of *Dalbergia sissoo* Roxb. Stem Bark against Diclofenac-Induced Gastric Damage in Rats. *Osong Public Health Res Perspect*, 4(5), 271-277.

Li, L., Wang, Y., Wang, X., Tao, Y., Bao, K., Hua, Y., Jiang, G. e Hong, M. (2018). Formononetin attenuated allergic diseases through inhibition of epithelial-derived cytokines by regulating E-cadherin. *Clinical Immunology*, 195, 67-76a.

Lianhe, Z., Xing, H., Li, W., e Zhengxing, C. (2012). Physicochemical Properties, Chemical composition and antioxidant activity of *Dalbergia odorifera* T. Chen seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 883–890.

Lima, H.C. (2015). *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22908>>. Acesso em: maio 2018.

Liu, S., Lin, J., Hu, C., Shen, B., Chen, T., Chang, Y., Shih, C., e Yang, D. (2017). Phenolic compositions and antioxidant attributes of leaves and stems from three inbred varieties of *Lycium chinense* Miller harvested at various times. *Food Chemistry*, 215, 284-291.

Liu, R., Li, J.Z., Song, J.K., Zhou, D., Huang, C., Bai, X.Y., Xie, T., Zhang, X., Li Y.J., Wu, C.X., Zhang, L., Li, L., Zhang, T.T. e Du, G.H. (2014). Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiology of Aging*, 35(6), 1275-1285.

Liu, R., Wen, X., Shao, F., Zhang, P., Huang, H. e Zhang, S. (2016). Flavonoids from Heartwood of *Dalbergia cochinchinensis*. *Chinese Herbal Medicines*, 8(1), 89-93.

López, B.G.C., Schmidt, E.M., Eberlin, M.N. e Sawaya, A.C.H.F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, 146, 174–180.

Machado, B.A.S., Silva, R.P.D., Barreto, G.A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandão, H.N., Rocha, J.L.C., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A.P., Umsza-Guez, M.A., e Padilha, F.F. (2016). 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*, 8, 1-26.

Mailloux, R.J., Jin, X., e Willmore, W.G. (2014). Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biology*, 19 (2),123–139.

Martins, F.J., Caneschi, C.A., Vieira, J.L.F., Barbosa, W., e Raposo, N.R.B. (2016). Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. *Journal of Photochemistry e Photobiology, B: Biology* 161, 34–39.

Matos, F.J.A., Gottlieb, O.R. e Andrade, C.H.S. (1975) Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochem*, 14, 825-826.

Mendonça-Melo, L., Mota, E., Lopez, B., Sawaya, A., Freitas, L., Jain, S., Batista, M. e Araújo, E. (2017) Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastophyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 1-8.

Mutai, P., Heydenreich, M., Thoithi, G., Mugumbate, G.; Chibale, K., e Yenesew, A. (2013). 3-Hydroxyisoflavanones from the stem bark of *Dalbergia melanoxylon*: Isolation, antimycobacterial evaluation and molecular docking studies. *Phytochemistry Letters* 6, 671-675.

Mutai, P., Pavadai, E., Wiid, I., Ngwane, A., Baker, B. e Chibale K. (2015). Synthesis, antimycobacterial evaluation and pharmacophore modeling of analogues of the natural product formononetin. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, 25(12), 2510-2513.

Neto, A.J.P., e Cordeiro, R.M. (2016). Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858 (9), 2191-2198.

Park, Y.K., Ikegari, M., Abreu, J.A.S., e Alcici, N.M.F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), 313-318.

Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M.C. e Rastrelli, L. (2011). 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*, 59, 6484-6491.

Rasheed, N.M.A., Nagaiah, K., Goud, P.R., e Sharma, V.U.M. (2012). Chemical marker compounds and their essential role in quality control of herbal medicines. *Annals of Phytomedicine*, 1(1), 1-8.

Rufatto, L.C., Santos, D.A., Marinho, F., Henriques, J.A.P., Ely, M.R. e Moura, S. (2017). Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591–598.

Saha, S., Anisuzzman, M., Islam, M.K., Mondal, H., e Talukder, C. (2013). Antibacterial and cytotoxic potential of *Dalbergia spinosa* roxb. Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 4, 1, 512-515.

Santos-Silva J., Bessa, R.J.B., e Santos-Silva, F. (2002) Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77, 187–194.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., e Gomes, R.A.R. (2010). *Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos e Água*. Varela, 4^o edição, São Paulo.

Singleton, V. L., Orthofer, R., e Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.

Souza, A.H.P., Corrêa, R.C.G., Barros, L., Calhelha, R.C., Santos-Buelga, C., Peralta, R.M., Bracht, A., Matsushita, M., e Ferreira, I.C.F.R. (2015). Phytochemicals and biactive properties of *Ile paraguariensis*: na *in-vitro* comparatives study between the whole plant, leaves and stems. *Food Research International* 78, 286-294.

Tao, J., Shen, C., Yanchun, S., Chen, W. e Gangfeng, Y. (2018). Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy. *Biomedicina e Farmacoterapia*, 106, 1003-1010.

Toghueo, R.M.K., Zabalgozcoa, I., Vázquez de Aldana B.R., e Boyom, F.F. (2017). Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African Journal of Botany*, 109, 146–153.

Ulbricht, T.L.V., e Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 19, (338), 985-992.

Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., Gelder, L.D., e Haesaert, G. (2016). Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 2284–2302.

Zhang, D.Y., Zu, Y.J., Fu, Y.J., Luo, M., Gu, C.B., Wang, W. e Yao, X.H. (2011). Negative pressure cavitation extraction and antioxidant activity of biochanin A and genistein from the leaves of *Dalbergia odorifera* T. *Separation and Purification Technology*, 83, 91–99.

Zhang, J., Liu, L., Wang, J., Ren, B., Zhang, L. e Li, W. (2018). Formononetin, an isoflavone from *Astragalus membranaceus* inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 221(15), 91-99.

Zheng, Y., Wang, K., Wu, Y., Chen, Y., Chen, X., Hu, C.W. e Hu, F. (2018). Pinocembrina induz apoptose mediada por estresse de ER e suprime a autofagia em células de melanoma. *Cartas de câncer*, 431(1), 31-42.

Zhuang, P., Wang W., Wang, J., Zhang, Y. e Jiao, J. (2018). Polyunsaturated fatty acids intake, omega-6/omega-3 ratio and mortality: Findings from two independent nationwide cohorts. **Clinical Nutrition**, n.18, p.30082-30087, 2018.

ARTIGO 2**PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: ESTUDO
MICROBIOLÓGICO, POLÍNICO, FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS²**

²Artigo será ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*, em versão na língua inglesa.

Própolis vermelha brasileira: estudo microbiológico, polínico, físico-químico e atividades biológicas *in vitro*

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros de identidade, segurança e qualidade, bem como, as propriedades biológicas de amostras de própolis vermelha produzida na região Nordeste, Estado da Bahia, Brasil. Foram efetuadas análises microbiológicas, polínicas e físico-químicas, determinado o perfil dos ácidos graxos e as atividades antioxidante e antimicrobiana. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por LC-MS. Entre os parâmetros microbiológicos investigados verificou-se baixa contaminação por bactérias aeróbios mesófilas. Dos 29 tipos polínicos identificados, cinco tipos (*Cecropia* sp., *Dalbergia ecastaphyllum*, *Protium heptaphyllum*, *Schinus terebinthifolia* e *Spondia* sp.) foram provenientes de plantas resiníferas. Em relação as características físico-química, todas as amostras estavam de acordo ao recomendado pela Legislação Brasileira. O ácido oleico (MUFA, C18: 1n9) e o ácido palmítico (SAT, C16: 0), foram os ácidos graxos em maiores quantidades. Foram identificados 34 compostos químicos, dentre eles a formononetina, vestitol, neovestitol, isoliriquitigenina, biochanina A, daidzeína e medicarpina, os quais são marcadores químicos da própolis vermelha. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana, no entanto, a amostra P5 foi a mais eficaz nos ensaios biológicos *in vitro*. Os elevados teores de fenóis, particularmente das amostras P3 ($384,61 \pm 1,78$) e P5 ($372,96 \pm 3,70$) e de flavonoides na amostra P4 ($141,58 \pm 6,02$), e a presença do ácido oleico podem ter sido os principais responsáveis pela significativa atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. Estes resultados indicam a própolis vermelha produzida no Sul do Estado da Bahia tem composição química da própolis vermelha brasileira. Assim, esse estudo sugere que a designação de origem conferida à própolis alagoana seja reconsiderada, ampliando a área de produção desse tipo de própolis, incluindo o Estado da Bahia.

Palavras-chave: Ácidos graxos; LC-MS; compostos bioativos; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

Brazilian red propolis: microbiological, pollinic, physico-chemical and biological activities *in vitro*

Abstract: The aim of this study was to evaluate parameters of identity, safety and quality, as well as the biological properties of samples of the red propolis produced in the Northeastern region, State of Bahia, Brazil. Microbiological, pollen and physicochemical analyzes were performed, determining the profile of fatty acids and antioxidant and antimicrobial activities. The identification of the phenolic compounds was performed by LC-MS. Among the microbiological parameters investigated was low contamination by aerobic mesophilic bacteria. Of the 29 pollen types identified, five types (*Cecropia* sp., *Dalbergia ecastaphyllum*, *Protium heptaphyllum*, *Schinus terebinthifolia* e *Spondia* sp.) were obtained from resinous plants. Regarding the physical-chemical characteristics, all the samples were in accordance with the recommended by the Brazilian Legislation. Oleic acid (MUFA, C18: 1n9) and palmitic acid (SAT, C16: 0) were the higher fatty acids. A total of 34 chemical compounds were identified, including formononetin, vestitol, neovestitol, isoliquiritigenin, biochanin A, daidzein and medicarpin, which are chemical markers of red propolis. All samples showed antioxidant and antimicrobial activity, however, the P5 sample was the most effective in biological assays *in vitro*. The high contents of phenols, particularly the P3 (384.61 ± 1.78) and P5 (372.96 ± 3.70) and flavonoid samples in the P4 sample (141.58 ± 6.02), and the presence of oleic acid may have been responsible for significant antioxidant and antimicrobial activity *in vitro*. These results indicate that the red propolis produced in the South of the State of Bahia has chemical composition of Brazilian red propolis. Thus, this study suggests that the designation of origin conferred to the Alagoan propolis is reconsidered, expanding the area of production of this type of propolis, including the State of Bahia.

Key words: Fatty acids; LC-MS; bioactive compounds; antioxidant activity; antimicrobial activity.

Introdução

A própolis é uma mistura resinosa, viscosa, aromática, quimicamente complexa coletada por abelhas *Apis mellifera* L. e por algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) em botões florais, brotos de folhas e exsudatos de variadas fontes vegetais (Bankova, 2005). A esta mistura, também são adicionadas secreções salivares produzidas pelas abelhas, cera e pólen (Oldoni, Cabral, D'Arce, Rosalen, Ikegaki, Nascimento, e Alencar, 2011).

Na colmeia, a própolis é utilizada como termorregulador, atuando também na proteção física e química contra agentes bióticos e abióticos (Simone-Finstrom e Spivak, 2010). É citada na etnofarmacologia como antibiótico natural amplamente utilizado na medicina tradicional e investigado como fármaco por possuir várias substâncias cujos princípios ativos são utilizados no combate de doenças que acometem o homem. Da sua composição também fazem parte nutrientes funcionais o que a define como produto nutracêutico (Rufatto, Marinho, Henriques, Ely, e Moura, 2017).

No Brasil, com base, principalmente, nas características físico-químicas foram classificados 13 tipos diferentes de própolis. Uma dessas é a própolis conhecida pela coloração avermelhada que por similaridade do perfil químico e da análise do material genético das exsudações poderá ter origem botânica em *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Daugusch, Moraes, Fort, e Park, 2008; Silva et al., 2008; Mendonça-Melo et al., 2017).

A própolis vermelha brasileira, em vários ensaios, tem apresentado inúmeras propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante (Mendonça et al., 2015; Machado et al., 2016), anti-inflamatória (Bueno-Silva et al., 2013), regenerativa (Barbosa et al., 2015), antiproliferativa (Frezza et al., 2016), antifúngica (Neves, Silva, Lima, Cunha, e Oliveira, 2016) e antibacteriana (Almeida et al., 2017). Essas propriedades são atribuídas aos compostos químicos que agem de forma isolada e/ou sinérgica.

A composição química da própolis tem relação estreita com a disponibilidade de recursos florais, fitogeografia, variações sazonais, variabilidade genética da abelha rainha. Estes fatores podem alterar as características organolépticas (cor, sabor, aroma, consistência) interferindo na qualidade do produto e, conseqüentemente nas suas propriedades biológicas (Valencia et al., 2012). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar

parâmetros de identidade, segurança e qualidade, bem como as atividades antioxidantes e antimicrobianas de amostras da própolis vermelha produzida na região Nordeste, Estado da Bahia, Brasil.

Material e métodos

Produtos químicos e reagentes

O metanol e o etanol foram fornecidos pela Pronolab (Lisboa, Portugal). Folin-Ciocalteu, clorofórmio (CHCl_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido gálico, catequina, 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH), β -caroteno, butil-hidroxianisol (BHA), ácido ascórbico bem como os outros reagentes químicos, foram fornecidos pelo Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes apresentavam grau de pureza analítico. Os meios de cultura foram adquiridos à Himedia (Índia). A água de elevada pureza (18 MX cm) foi obtido a partir de um sistema de purificação de Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA)

Origem geográfica das amostras de própolis

As amostras (n=5; 300g cada) foram coletadas em fevereiro de 2015 em apiários produtores de própolis vermelha localizados nos municípios de Canavieiras (S 15° 40' 30" e W 38° 56' 50") (n=4) e de Ilhéus (S 14° 47' 20" e W 39° 02' 58") (n=1), Estado da Bahia, Brasil. Estes municípios localizam-se no litoral sul do Estado da Bahia, Brasil e apresentam fitofisionomia de Mata Atlântica e vegetação de mangue (IBGE, 2016).

As amostras foram coletadas em colônias de *Apis mellifera* instaladas em colmeias Langstroth adaptadas com coletores de própolis. As amostras identificadas com os códigos: P1, P2, P3, P4 e P5 foram acondicionadas em recipientes fechados e conservadas à temperatura de -20° C até o momento da análise. Para análise cromatográfica por Camada Delgada de Alta Eficiências foi coletada uma amostra de própolis vermelha proveniente do município de Marechal Teodoro, Estado de Alagoas, Brasil.

Análises microbiológicas da própolis *in natura*

Pesou-se 10 g de cada amostra da própolis *in natura* acrescentou-se 90 mL de solução salina peptonada estéril e homogeneizou-se durante 2 minutos

em Stomacher Lab-Blender (Seward tipo 400, Londres, Reino Unido). A partir do homogeneizado foram preparadas diluições sucessivas (1:10 (v/v)) no mesmo diluente estéril. As unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias mesófilas foram quantificadas por plaqueamento em profundidade, em meio Plate Count Agar (PCA) (Silva et al., 2010). A quantificação de esporos de clostrídios sulfito redutor baseou-se na Norma ISO 15213(2003) e a enumeração de bolores e leveduras na Norma ISO 21527-2 (2008). *Staphylococcus* spp. foram quantificados de acordo com a metodologia reportada por Bennett e Lancette (2001). Os coliformes totais e *Escherichia coli* foram enumerados com base no Método SimPlate (AOAC, 2005), na pesquisa da *Salmonella* spp. utilizou-se a técnica de imunodifusão 1-2 de teste (AOAC, 2005).

Análise polínica

As amostras foram preparadas seguindo a metodologia descrita por Barth (1998) e o método de acetólise proposto por Erdtman (1960). Os grãos de pólen foram fotomicrografados, para avaliar a afinidade botânica dos tipos polínicos, posteriormente procedeu-se a categorização em classes frequência estabelecida por Louveaux, Maurizio, e Vorwohl (1978): muito frequente (> 50%), frequente (20-50%), pouco frequente (10-20%) e raro (<10%).

Caracterização físico-química

Foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade e resíduo mineral fixo (cinzas) pelo método gravimétrico (AOAC, 2000); cera, massa mecânica (sólidos insolúveis em etanol) e atividade de oxidação de acordo com o reportado por De-Melo, Matsuda, e Almeida-Muradian (2012); condutividade elétrica e substâncias solúveis em etanol pelo método descrito por Dias et al. (2012) e pH pelo método estabelecido para mel (NP 1309/1976) e adaptado para amostras de própolis.

Para determinar o rendimento das amostras foram preparados extratos hidroalcolóicos (30g de própolis *in natura* em 375 mL de etanol a 70%) conforme Park, Ikegari, Abreu, e Alcici (1998) e em seguida, calculada a razão entre a massa do material após a volatilização e a massa inicial.

Análises cromatográficas

Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiências (CCDAE)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência dos extratos etanólicos da própolis vermelha proveniente do Estado de Alagoas (A e B) e amostra do Estado da Bahia (C) foram realizadas de acordo o método descrito por Park et al. (2002). Alíquotas de 4 μL das amostras foram aplicadas em placas RP18 F₂₅₄ S (Merck Co), com tempo de aproximadamente uma hora para análise. Utilizou um sistema com fase móvel composto por etanol: água destilada (55:45, v/v) e os resultados nas placas foram observados sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm.

Cromatografia Líquida acoplada ao detector de massa (LC/MS)

Foi utilizado o método qualitativo LC/MS e MSⁿ para identificação dos fenóis e flavonoides. As análises foram realizadas em espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL TM (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), controlada pelo "software" LTQ Tune Plus 2.5.5 e para aquisição dos dados utilizou-se o sistema Xcalibur 2.1.0. Foi usado o modo negativo por ser mais sensível aos compostos fenólicos e a coluna de fase reversa Gemini C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm) da Phenomenex. A fase móvel composta por água (solvente A) e a metanol (solvente B) foi acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Durante toda análise a temperatura da coluna foi mantida a 25°C, os dados cromatográficos foram adquiridos por três canais de leitura a 280nm, 320nm e 360nm. As frações foram recolhidas manualmente de acordo com a visualização do perfil de radiação ultravioleta (UV) (Falcão et al., 2013).

Composição lipídica

Inicialmente as amostras passaram pelo processo de transesterificação conforme descrito Estevinho, Rodrigues, Pereira, e Feas (2012). Foi utilizado 1 μL do preparo de cada amostra para determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG) com detecção de ionização de chama (GC-FID a 260°C) e coluna capilar Macherey-Nagel (25 X 0,32 mm ID X 0,25 μm df). Utilizou-se o cromatógrafo modelo DANI GC 1000 (Izasa, Barcelona, Spain), instrumento equipado com um injetor split / splitless. O programa de temperatura

de forno iniciou a 50° C / 2 minutos, em seguida passou para 30° C / min. até atingir 125° C, depois foram utilizados 5° C / min. até aos 160° C, 20° C / min. até aos 180° C e 3° C / min. até atingir os 200° C. Em seguida a temperatura aumentou 20° C / min. até 220° C totalizando 35,16 minutos por cada análise. A taxa de fluxo do gás (hidrogênio) foi de 4,0 mL / min (0,61 bar), medido a 50° C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos picos de amostras padrões de FAMES (Fatty Acid Methyl Esters). Os resultados foram gravados e processados usando software CSW 1.7 (DataApex 1.7, Prague, The Czech Republic) e expressos em percentagem relativa de cada um dos ácidos graxos calculados pela normalização interna da área dos picos cromatográficos. Também foram calculados as somas, proporções e índices de ácidos graxos.

Preparação dos extratos

Foram pesados 0,1 g de extrato seco e solubilizados em 25 mL de metanol resultando no Extrato Metanólico da Própolis (PME) a 4 mg/mL de concentração, o qual foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante e para quantificar os fenóis totais e flavonóides totais.

Determinação dos fenóis e flavonóides totais

Os fenóis totais e os flavonóides totais foram avaliados por métodos colorimétricos, respectivamente, do Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) e do Cloreto de Alumínio (Alencar et al., 2007). Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico a partir da curva de calibração: $y = 0,0093x + 0,0287$; $R^2 = 0,9999$ para fenóis totais e em miligramas equivalente de quercetina a partir da curva de calibração: $y = 0,0353x + 0,0073$; $R^2 = 0,9995$ para flavonóides totais.

Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) dos extratos da própolis a diferentes concentrações (0,004 a 0,4 mg / mL) foi avaliada segundo o método recomendado por Brand-Willians, Cuvelier, e Berset (1995). A leitura da absorbância foi realizada a 517 nm e os resultados expressos em EC₅₀ (concentração responsável por metade do efeito máximo).

A inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico foi avaliada no espectrofotômetro (Unicam Hekios Alpha) a um comprimento de onda de 470 nm de acordo com o reportado por Ahn, Kumazawa, Hamasaka, Bang, e Nakayama (2004). Os resultados expressaram-se em porcentagem de inibição em relação ao controle. As substâncias, butil-hidroxianisol (BHA) e o ácido ascórbico, foram utilizados como substâncias de referência nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO a 2,5% (v/v)) foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Moraes, Moreira, Feas, e Estevinho (2011), com modificações. Avaliou-se o efeito contra microrganismos de referência e contra isolados clínicos. Os primeiros microrganismos (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300TM, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076TM, e *Candida albicans* ATCC 10231TM) foram adquiridos a um distribuidor autorizado, ATCC (American Type Culture Collection), os segundos (*Staphylococcus aureus* ESA 321, *Salmonella enteritidis* ESA 87 e *Candida albicans* ESA 115) foram isolados no Centro Hospitalar do Nordeste de Portugal e identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrárias de Bragança, Bragança, Portugal.

Os inóculos foram preparados em meio líquido, Brain Heart Infusion (BHI) e Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YEPD), para bactérias e leveduras, respetivamente, e incubados em incubadora orbital (modelo SI50) a 37°C por 24 horas (bactérias) e por 48 (leveduras). Para as bactérias foi preparada uma suspensão de 1×10^8 UFC / mL em uma solução estéril a 0,85% de NaCl, isto é, a uma densidade ótica de 0,3 na escala McFarland (absorbância a 540 nm). Para as leveduras a suspensão preparada foi 1×10^6 UFC/mL, ou seja, com a densidade ótica de 0,5 na escala McFarland (absorbância a 640 nm). Posteriormente, prepararam-se diluições seriadas dos inóculos (López et al., 2015).

Em cada poço de microplacas de 96 poços colocou-se 100 μ L do extrato de própolis a diferentes concentrações (25 μ g/mL; 50 μ g/mL; 100 μ g/mL; 500

$\mu\text{g/mL}$; 1000 $\mu\text{g/mL}$; 2500 $\mu\text{g/mL}$; 500 $\mu\text{g/mL}$; 10000 $\mu\text{g/mL}$; 12500 $\mu\text{g/mL}$; 15000 $\mu\text{g/mL}$) em seguida adicionou 100 μL da suspensão do microrganismo. Foram feitos o controle positivo (100 μL do meio de cultura + 100 μL da suspensão do microrganismo) e controle negativo (200 μL do meio de cultura). Foi estabelecido controle de DMSO (DMSO com meio inoculado) e controles por antibióticos anfotericina e gentamicina. As microplacas foram incubadas a 37° C por 24h para bactérias e por 48h para leveduras. Depois adicionou-se 20 μL da solução de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) em todos os poços e incubou-se por mais um período de 2 e 3 horas, respectivamente, para bactérias e leveduras (Tsukatani et al., 2008). O MIC definiu-se como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (sem crescimento visível). Dos poços onde não houve mudança de cor retirou-se uma alíquota de 20 μL , semeou-se em placas de Petri e incubou-se a 37° C por 24h (bactérias) e por 48h (leveduras). A MBC foi considerada quando o crescimento na placa foi inferior ou igual a 10 UFC. Os resultados expressaram-se em Concentração Mínima inibitória (MIC, $\mu\text{g/mL}$) e Concentração Mínima Bactericida (MBC, $\mu\text{g/mL}$).

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Posteriormente, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett para verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, respectivamente; e, uma vez atendidas as pressuposições, foram submetidas à análise de variância one-way (ANOVA) e quando houve alguma significância pelo teste F, foi aplicado o teste post hoc Tukey a 5% de probabilidade. Para avaliar a interação do parâmetro físico-químico pH com microrganismos aeróbios mesófilos foi realizado uma correlação de Pearson. Para interpretação gráfica dos resultados, no mada de calor foi plotado com os parâmetros físico-químicos e as amostras de própolis, sendo os dados padronizados ($\mu = 0$, $\sigma = 1$). O método de Ward baseado na distância euclidiana quadrada foi utilizado para análise hierárquica de agrupamentos. As análises estatísticas foram efetuadas usando o software R (Version 3.4.1) (R Development Core Team, 2017).

Resultado e discussão

Análises microbiológicas

Os valores obtidos para os parâmetros microbiológicos estudados na própolis vermelha estão sumariados na Tabela 1. A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas (variando de 1×10^5 a 2×10^2 cfu.g⁻¹) foram diferentes entre as própolis, com maior número de colônias na amostra P4. Este resultado pode ser justificado pela correlação negativa ($r = -0,68$) entre as bactérias aeróbias mesófilas e o valor do pH referido na Tabela 3. De fato, valores baixos de pH podem ter afetado negativamente o crescimento bacteriano.

Relativamente aos coliformes totais apenas a amostra P1 apresentou contaminação (1×10^3 ufc/g). Todas as amostras apresentaram valores <10 para os bolores e leveduras e ausência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, esporos de clostrídio sulfito redutores e *Salmonella* spp.

Os coliformes totais são bactérias de origem entérica utilizadas como indicadores de agentes patógenos, como *Escherichia coli*. São comumente encontradas no meio ambiente (água, solo e planta) (Clarke, Peyton, Healy, Fenton, e Cummins, 2017), e a sua presença na amostra 1 pode estar relacionada com a manipulação inadequada por parte do apicultor. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001) refere que as práticas de fabricação são as principais responsáveis pela contaminação por coliformes totais.

Os valores obtidos neste estudo para bactérias aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais e *Echerichia coli* foram inferiores aos observados por Dias, Pereira, e Estevinho (2012), em própolis de Portugal.

As avaliações microbiológicas são essenciais para identificar condições higiênicos-sanitárias deficientes e fatores de riscos à saúde do homem (Valero, Ortiz, Fongaro, Hernández, e Rodríguez-Lázaro, 2017). *Salmonella* spp., cepas patogênicas de *Escherichia coli* e aflatoxinas foram apontados pela Organização Mundial de Saúde como os principais agentes de doenças vinculadas por alimentos (WHO, 2015). Apesar da relevância dessas análises, poucos são os estudos que avaliam esses parâmetros na própolis. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a própolis é um produto seguro quanto a qualidade microbiológica, principalmente por não apresentar microrganismos patogênicos e produtores de micotoxinas.

Tabela 1. Análise microbiológica de amostras de própolis vermelha, Bahia, Brasil, 2015.

Amostras	Aeróbios mesófilos (ufc/g)	Coliformes totais (ufc/g)	Fungos e leveduras (ufc/g)	<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. (ufc/g)	Clostrídio Sufito Redutor (0,01g)	<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)
P1	2x10 ⁴	1x10 ³	<10	<1	<10	Ausente	Ausente
P2	9x10 ²	<1	<10	<1	<10	Ausente	Ausente
P3	1x10 ³	<1	<10	<1	<10	Ausente	Ausente
P4	1x10 ⁵	<1	<10	<1	<10	Ausente	Ausente
P5	2x10 ²	<1	<10	<1	<10	Ausente	Ausente

P1 – P5 = amostras de própolis; ufc = unidade formadora de colônias

Análise polínica

No espectro polínico das amostras de própolis foram identificados 29 tipos de pólen pertencentes a 19 famílias e a 25 gêneros de plantas. Quatro tipos não tiveram a sua afinidade botânica definida (Tabela 2). A família Fabaceae foi a mais representativa (sete tipos polínicos) e os tipos *Cecropia* sp., *Cuphea* sp., *Elephantopus* sp., *Mimosa pudica*, Poaceae I, *Psidium*, *Schinus terebinthifolia*, *Spondia* sp. e *Syagrus coronata* estiveram presentes em todas as amostras analisadas.

Não foram encontrados tipos de pólen muito frequente (MF), e apenas o tipo *Mimosa pudica* (FRt = 32,04%) foi categorizado como frequente (F). *M. pudica* é uma planta espontânea característica da vegetação ruderal e considerada atrativa para as abelhas pela elevada produção de pólen (Matos e Santos, 2016). Barth (1998) relata que os grãos de pólen podem ser introduzidos intencionalmente no material resinoso da própolis a partir de polens armazenados na colmeia, bem como pelo pólen aerotransportado e por contaminação das abelhas campeiras no momento de forrageio.

Tabela 2. Tipos polínicos em amostras de própolis vermelha produzidas na região sul do Estado da Bahia, Brasil.

Tipos polínicos	Amostras (%)						
	P1	P2	P3	P4	P5	FRt	CF
Anacardiaceae							
<i>Schinus terebinthifolia</i>	13,03	10,19	1,65	33,41	17,93	13,29	PF
<i>Spondias</i> sp.	6,21	3,22	4,40	3,25	2,76	3,89	R
Areaceae							
<i>Cocos nucifera</i>		2,42	2,75	8,24	3,45	3,86	R
<i>Syagrus coronata</i>	8,28	2,14	2,20	6,07	4,14	3,78	R
Asteraceae							
<i>Bidens</i> sp.			1,10			0,43	R
<i>Elephantopus</i> sp.	0,69	0,80	0,28	1,08	1,38	0,70	R
Burseraceae							
<i>Protium heptaphyllum</i>					1,38	0,11	R
Commelinaceae							
<i>Commelina</i> sp.		1,08		0,22		0,27	R
Euphorbiaceae							
Euphorbiaceae	3,45		1,38			0,81	R
Fabaceae							
<i>Acacia</i> sp.			0,28		1,38	0,22	R
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>				5,86		1,46	R
Fabaceae I	0,69	0,27	0,69			0,38	R
Fabaceae II			0,55	1,95		0,70	R
Fabaceae III				0,22		0,05	R
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>		1,61	5,23		0,69	2,43	R
<i>Mimosa pudica</i>	47,59	52,01	33,15	17,79	4,83	32,04	F
Lamiaceae							
<i>Hyptis</i> sp.				0,22		0,05	R
Lythraceae							
<i>Cuphea</i> sp.	0,69	1,61	2,61	0,87	0,69	1,67	R
Malpighiaceae							
<i>Banisteriopsis muricata</i>		0,80	0,28	1,08	11,72	1,46	R
Malvaceae							
<i>Eurotheca</i> sp.		1,07	8,8			3,67	R
Myrtaceae							
<i>Eucalyptus</i> sp.	3,45	2,41	2,34			1,67	R
<i>Psidium</i> sp.	6,21	4,02	4,26	7,81	10,34	5,73	R
Nyctaginaceae							
<i>Bougainvillea</i> sp.				0,87		0,22	R
Poaceae							
Poaceae I	5,52	6,17	5,36	8,02	5,52	6,21	R
Rubiaceae							
<i>Borreria verticillata</i>		1,34	11,14	1,30	2,76	5,19	R
Sapindaceae							
<i>Cupaniasp.</i>				0,22		0,05	R
Sapotaceae							
<i>Pouteria ramiflora</i>				0,22		0,05	R
Urticaceae							
<i>Cecropia</i> sp.	5,52	9,12	3,16	0,65	29,66	6,00	R
Verbenaceae							
<i>Lantana</i> sp.	0,69		7,43	0,43		3,08	R
Indeterminados (Indet.)							
Indet. I			0,96			0,38	R
Indet. II				0,22		0,05	R
Indet. III					0,69	0,05	R
Indet. IV					0,69	0,05	R
Total de tipos polínicos	13	17	22	22	16	32	

P1 – P5 = amostras de própolis; FRt = Frequência Relativa total; CF = Classe de Frequência; F = frequente; PF = pouco frequente; R = raro.

Cinco tipos polínicos foram identificados como provenientes de plantas resiníferas, são eles: *S. terebinthifolia*, *Spondia* sp., *Protium heptaphyllum*, *Dalbergia ecastaphyllum* e *Cecropia* sp. Os tipos *S. terebinthifolia* e *Cecropia* sp. também foram observados em estudos realizados por Matos e Santos (2016); Matos, Alencar, e Santos (2014) e Barth e Luz (2009). Segundo estes investigadores estas espécies são fontes resiníferas importantes para a produção de própolis no Estado da Bahia, Brasil. *S. terebinthifolia* Raddi é uma árvore que é encontrada em áreas de restinga e manguezais (Sawaya, Cunha, Marcucci, Oliveira, e Eberlin, 2006), e espécies do gênero *Cecropia* em regiões com vegetação de Mata Atlântica (Matos e Santos, 2016), fitofisionômias referente à área de coleta do nosso estudo. Isto indica que, por meio da análise polínica é possível determinar a origem geográfica, caracterizar a vegetação, identificar espécies vegetais e regiões potenciais para a produção da própolis (Barth e Luz, 2009; Matos et al., 2014).

Os estudos sobre a quantificação dos grãos de pólen na própolis são escassos, no entanto, na pesquisa efetuada constata-se que *D. ecastaphyllum* apenas foi encontrada neste estudo. Esta espécie de planta com resina vermelha é indicada como a origem botânica da própolis classificada como própolis vermelha brasileira (Daugusch et al., 2008). Este tipo polínico foi categorizado como pólen raro (FRt = 1,46%) e encontrado apenas na amostra P4. Segundo Freitas, Barth, e Luz (2010), tipos polínicos com baixa frequência em amostras de própolis podem revelar as principais fontes resinífera utilizada pelas abelhas, permitindo inferir que as espécies *S. terebinthifolia*, *D. ecastaphyllum* e *Cecropia* sp. contribuíram para a produção da própolis da região Sul do Estado da Bahia, Brasil.

Caracterização físico-química

Os valores obtidos para os parâmetros físico-químicos (umidade, cinzas, massa mecânica, sólidos solúveis em etanol, atividade de oxidação, extrato seco, teor de fenóis e flavonoides) nas amostras de própolis vermelha, à exceção da amostra P4, atenderam os limites estipulados pela Legislação Brasileira (Brasil, 2001) - Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis. A amostra P4 apresentou teor de cera acima do limite máximo de 25%, diferindo estatisticamente das demais amostras (Tabela 3).

Os resultados de umidade variaram entre $2,62 \pm 0,12$ e $4,40 \pm 0,33\%$. A própolis *in natura* P1 foi estatisticamente diferente quanto ao resíduo mineral fixo ($1,98 \pm 0,07 \%$), o que pode ser explicado pelo alto valor de condutividade elétrica ($318 \pm 0,00$ mS/cm) e pela atividade de oxidação ($19,57'' \pm 0,59$) elevada. As própolis P4 e P5 apresentaram valores semelhantes e superiores para massa mecânica e inferiores para substâncias solúveis em etanol. O rendimento do extrato seco mais elevado observou-se nas amostras P2 e P5, as quais não diferiram entre si ($p < 0,05$). O conteúdo de fenóis totais foi maior nas própolis P3 ($384,61 \pm 1,78$ mg EAG/g de própolis) e P5 ($372,96 \pm 3,70$ mg EAG/g de própolis), enquanto que, o conteúdo de flavonóides totais mais elevado verificou-se na própolis P4 ($141,58 \pm 6,02$ mg EAG/g de própolis) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das amostras de própolis vermelha produzidas na Bahia, Brasil, 2015.

Parâmetros	P1	P2	P3	P4	P5	Legislação
Umíd. (%)	$2,71 \pm 0,30^c$	$3,64 \pm 0,36^b$	$4,40 \pm 0,33^a$	$3,30 \pm 0,21^{bc}$	$2,62 \pm 0,12^c$	Max. 8%
Cinzas (%)	$1,98 \pm 0,07^a$	$1,77 \pm 0,04^b$	$1,82 \pm 0,21^{ab}$	$0,66 \pm 0,05^d$	$1,33 \pm 0,05^c$	Max. 5%
M.M (%)	$31,98 \pm 0,43^b$	$32,41 \pm 0,81^b$	$32,54 \pm 0,46^b$	$34,98 \pm 0,55^a$	$34,70 \pm 0,53^a$	Max. 40%
S.S (%)	$66,64 \pm 0,42^a$	$66,22 \pm 0,81^a$	$66,09 \pm 0,46^a$	$63,65 \pm 0,54^b$	$63,91 \pm 0,53^b$	Min. 35%
Cera (%)	$23,75 \pm 0,83^b$	$24,13 \pm 2,07^b$	$24,90 \pm 1,38^b$	$29,16 \pm 0,40^a$	$11,05 \pm 2,18^c$	Max. 25%
Atv. Oxi. (s)	$19,57 \pm 0,59^a$	$5,53 \pm 1,72^b$	$3,77 \pm 0,15^{bc}$	$4,20 \pm 0,82^{bc}$	$1,80 \pm 0,43^c$	Max. 22''
Ex.seco (%)	$13,50 \pm 2,40^c$	$30,26 \pm 1,63^a$	$24,00 \pm 1,62^b$	$23,48 \pm 2,90^b$	$33,04 \pm 2,56^a$	Min. 11%
pH	$4,79 \pm 0,005^c$	$4,57 \pm 0,00^d$	$5,52 \pm 0,01^a$	$4,34 \pm 0,05^e$	$5,37 \pm 0,01^b$	-
Cond. (mS/cm)	$318 \pm 0,00^a$	$130 \pm 1,00^c$	$206 \pm 1,00^b$	$107 \pm 1,00^d$	$86 \pm 1,00^e$	-
Fen. (mg/g)	$166,30 \pm 5,16^c$	$255,81 \pm 5,43^b$	$384,61 \pm 1,78^a$	$242,55 \pm 9,62^b$	$372,96 \pm 3,70^a$	Min. 50mg/g
Flav. (mg/g)	$53,02 \pm 0,22^d$	$100,14 \pm 1,60^b$	$57,50 \pm 0,79^d$	$141,58 \pm 6,02^a$	$72,59 \pm 0,44^c$	Min 5mg/g

P1 – P5 = amostras de própolis; resultados expresse em média \pm desvio padrão. Umíd. = umidade; M.M = massa mecânica; S.S = sólidos solúveis; Atv.Oxi. = atividade de oxidação; '' = segundos; Ex.Seco = extrato seco; Cond. = condutividade; Fen. = fenóis totais; Flav. = flavonoides totais; Max = máximo; Min = mínimo; m/m = massa de umidade/soma de massas da amostra; 1 Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis (Brasil, 2001); *Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

As análises gávimétricas exigidas pela legislação brasileira para a qualidade da própolis (Brasil, 2001), permitem verificar o grau de impurezas, tais como, reíduos não voláteis a exemplo de areia, fragmentos de folhas de insetos (massa mecânica) e o excesso de cera. Os parâmetros de umidade e atividade de oxidação indicam os riscos de deterioração do produto e extrato seco a

solubilidade da própolis a um determinado solvente, a exemplo do etanol (De-Melo et al., 2012; Funari e Ferro, 2006). As análises espectrofotométricas, tem como principal função determinar os principais grupos de compostos bioativos (fenóis totais e flavonoides totais) que propiciam efeitos benéficos à saúde humana (Ruffato et al., 2017).

Diante dos parâmetros de qualidade, pode-se observar que a amostra P5 apresentou relação inversamente proporcional entre extrato seco (>) e teor de cera (<) o que influenciou diretamente na quantidade dos fenóis totais, e também obteve menor valor de umidade e atividade de oxidação. Estes dados demonstram a disponibilidade de plantas resiníferas no entorno do apiário, o que interferiram positivamente na relação resina/cera, visto que compostos fenólicos não estão presentes na composição da cera (Funari e Ferro, 2006) e que às colônias em áreas sombreadas diminui o risco de deterioração da própolis.

Os resultados dessa pesquisa foram corroborados pelos obtidos em outros estudos de caracterização físico-química da própolis brasileira (De-Melo et al., 2012; Machado et al., 2016; Ferreira, Fernandes-Silva, Salatino, Negri, e Message, 2017). Estes autores também demonstraram que este produto se enquadrou nos padrões de qualidade exigido pela Legislação Brasileira.

Os teores de fenóis e flavonóides totais da própolis vermelha deste estudo apresentaram diferença estatísticas entre as amostras, exceto a amostras P3 ($384,61 \pm 1,78$ mg/g) e P5 ($372,96 \pm 3,70$) que não diferiram ($p < 0,05$) entre si. A quantificação de fenóis e flavonoides deste estudo foram similares aos reportados por Machado et al. (2016), na própolis produzida no Estado de Sergipe e Alagoas (variando de 300,36 a 157,16 mg EAG/g; 57,60 a 25,46 mg EQ/g, respectivamente) e superiores aos encontrados por Andrade, Denadai, Oliveira, Nunes, e Narain (2017), na própolis do Estado de Alagoas ($91,32 \pm 0,49$ mg EAG/g; $31,48 \pm 0,56$ mg EQ/g). Apesar das própolis em comparação serem produzidas no Nordeste Brasileiro a discrepância quanto ao teor dos compostos fenólicos poderá ser explicada, principalmente, pela origem botânica das amostras que pode interferir nas suas propriedades biológicas.

A identificação de padrões de dissimilaridade entre diferentes amostras de própolis, de acordo com as variáveis físico-químicas foi realizada através do gráfico de agrupamento no mapa de calor (Figura 1), o qual apresenta uma estrutura de agrupamento hierárquica (Dias et al., 2012). As amostras de

própolis e variáveis físico-químicas estão representadas, respectivamente, nas linhas e colunas da matriz de dados. A Figura 1 mostra que as amostras foram divididas em quatro grupos, sendo que o grupo formado pela própolis P1 apresenta maior dissimilaridade em relação aos demais grupos. Para os parâmetros físico-químicos observou-se a formação de dois grupos: o primeiro é constituído pelas variáveis sólidos solúveis, resíduo mineral fixo, atividade de oxidação, condutividade elétrica, umidade e cera; do segundo grupo fazem parte o pH, massa mecânica, extrato seco, fenóis e flavonóides. No mapa de calor observa-se que com base nos parâmetros de atividade de oxidação, condutividade elétrica (cor cinza escuro) e teor de fenóis e extrato seco (cor cinza claro) enquadra a própolis P1 como diferente e de menor qualidade que as demais própolis vermelhas em estudo.

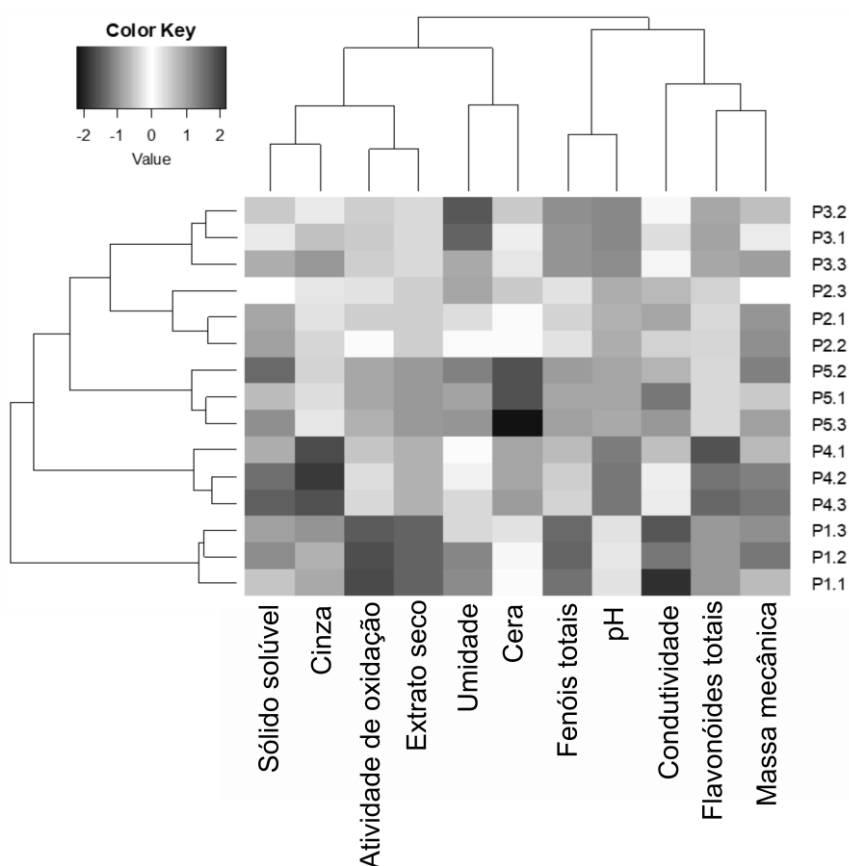


Figura 1. Análise de agrupamento por mapa de calor das amostras de própolis vermelha proveniente da região Sul do Estado da Bahia, Brasil e parâmetros físico-químicos. P1 – P5 = amostras de própolis.

Caracterização química por CCDAE e por LC/MS

Os resultados obtidos na análise cromatográfica em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE) demonstrou que a própolis proveniente da Bahia é quimicamente semelhante à própolis vermelha do Estado de Alagoas, a qual é normalmente identificada como a própolis vermelha brasileira. Essa abordagem qualitativa conforme demonstrada na figura 2, mostra placas (luz UV a 366 nm e 254 nm, respectivamente) com bandas semelhantes entre as amostras (A e B = Alagoas; C = Bahia) e quando estas bandas apresentam fluorescência azul, verde e laranja, segundo Bueno-Silva et al. (2016) são cores características de flavonóides e isoflavanonas, os quais também foram identificados por LC-MS neste estudo.

As análises dos extratos de própolis por LC/MS permitiram a identificação de 34 compostos sendo onze ácidos fenólicos, dezenove flavonóides, dois aldeídos (4- hidroxibenzaldeído e vanilina) e duas benzofenonas (guttiferone E e guttiferone F). Dentre os ácidos fenólicos, seis pertencem à classe dos ácidos hidroxicinâmico (ácido cafeico, ácido quínico, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido cinâmico). Quanto aos flavonóides, o maior número de compostos enquadrou-se na classe dos flavonóis (quercetina, quercetina-7-metil éter, dimetilgalangin, galangin, galangin-5-metil éter, kaempferol e quercetina-3-O-glucoside), seguido dos isoflavonóides (medicarpina, vestitone, neovestitol, vestitol, formononetina, biochanina A e daidzeína), flavononas (pinobanksin, naringenina, pinocembrina e liquiritigenina) e menos expressivos dihidrochalcones (floreína). Os compostos químicos bem como as respectivas massas moleculares estão representados na Tabela 4.

López, Schmidt, Eberlin, e Sawaya (2014); Almeida et al. (2017) identificaram a formononetina e pinocembrina como compostos mais abundantes em extratos da própolis vermelha. Alencar et al. (2007); Silva et al. (2008) referem a formononetina, daidzeína e isoliquiritigenina como biomarcadores químicos desse tipo de própolis. De acordo com López et al (2014); Franchin et al. (2017); Nascimento et al. (2018) o vestitol, neovestitol, medicarpina, liquiritigenina, biochanina A e isoliquiritigenina apenas são encontrados na própolis vermelha. Esses relatos corroboram a asserção de que a própolis da Bahia (Brasil) tem perfil químico semelhante à própolis vermelha brasileira. Essa própolis também foi encontrada nos Estados de Sergipe (Mendonça-Melo et al.,

2017) e Paraíba (Li, Awale, Tezuka e Kadota, 2008), reforçando que este produto não é exclusivo de um território (Estado de Alagoas), sendo essencial considerar as características físico-química e fitofisionomia da região para propor uma designação de origem.

A identificação de 34 compostos revela o quanto a própolis vermelha produzida no Estado da Bahia é um produto de composição complexa, sendo essencial a caracterização química para melhor assimilação da sua potencialidade e apontar possibilidade de uso desse produto.

Dentre os compostos, a formononetina isolada da própolis demonstrou ação antiproliferativa inibindo o crescimento de algumas linhagens de células tumorais, em outras promoveu a apoptose (Novak et al., 2014; Frozza et al., 2016). O vestitol e neovestitol evidenciaram atividades antimicrobiana, e anti-inflamatória na inibição de neutrófilos (Bueno-Silva et al., 2013) e macrófilos (Bueno-Silva, Rosalen, Alencar, e Mayer, 2017), em inflamações agudas ou crônicas. O flavonol kaempferol é relatado em atividades anti-inflamatórias, a exemplo do câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Devi et al., 2015), como cicatrizante em marcas hipertrófica e promove a ativação do colágeno dos fibroblastos (Li, Yang, Yuebing, e Gao, 2016). Um creme gel antioxidante contendo vitamina C, ácido ferúlico e floretina demonstrou eficácia e tolerância frente rugas grosseiras e hiperpigmentação na pele facial (Dahl, Oresajo, e Yatskayer, 2011).

As benzofenonas apresentam em sua composição química um grupo funcional cetona, e agem como filtro óptico capaz de dissipar a radiação UV em forma de calor ao invés de absorver e emitir radiação. Esta característica tem incentivado pesquisas com vista à utilização dessas moléculas como fotoprotetores contra radiações UV (González, Fumagalli, Benevenuto, Emery, e Gaspar, 2017). Também existe um interesse particular nestes compostos devido sua atividade citotóxica em vários carcinomas (Kuete et al., 2013).

A presença do aldeído fenólico, vanilina, pode ser o responsável pelo odor característico de baunilha apresentado pela própolis em estudo. A vanilina é um composto primário do extrato de baunilha, de cadeia carbônica longa ($C_8H_8O_3$), comumente utilizado como aditivo aromático em bebidas, fármacos, alimentos, velas e cosméticos (Kumar, Sharma, e Mishra, 2012).

Outros estudos com própolis vermelha também reportaram a presença dos flavonóides supracitados, guttiferones e vanilina (Almeida et al., 2017; Andrade et al. 2017) em seu perfil cromatográfico. A presença desses compostos na própolis vermelha do Estado da Bahia, indicam a potencialidade desse produto apícola no uso como aditivo químico, nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e alimentar.

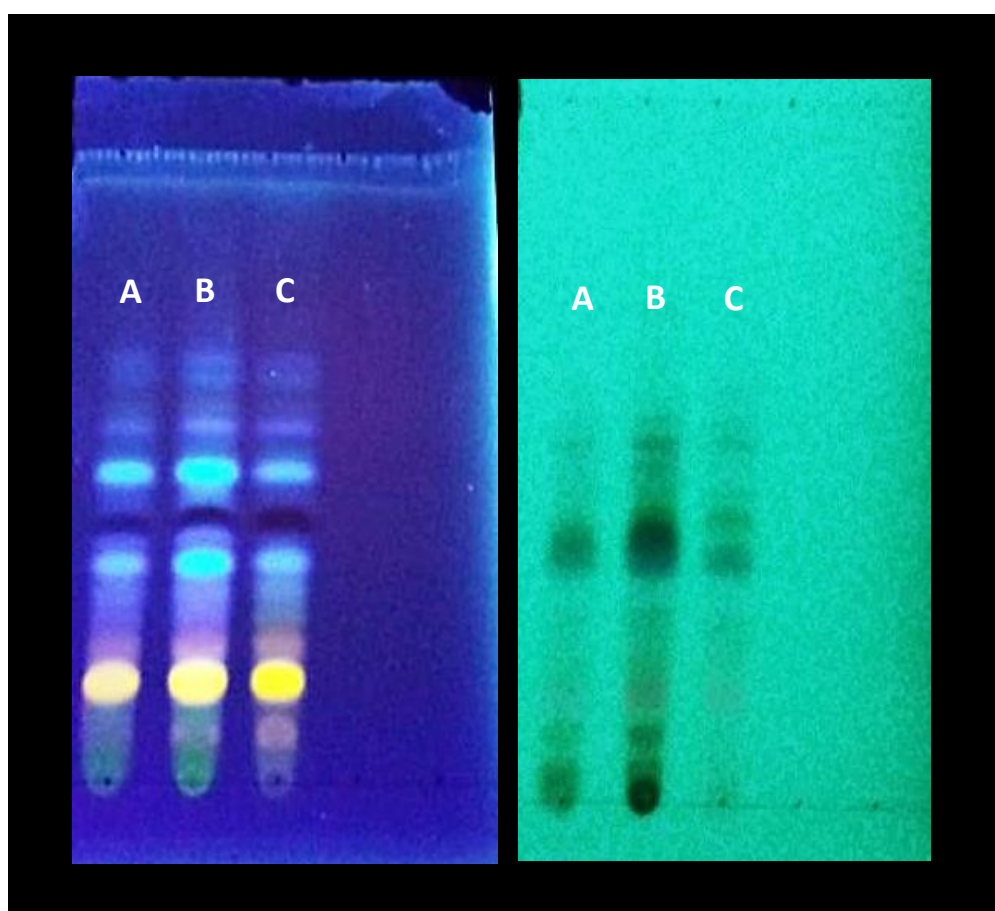


Figura 2. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (RPTLC) dos extratos etanólicos de própolis vermelha. **A-** Própolis de Alagoas: Extrato seco resuspenso a 1%; **B-**Própolis de Alagoas: Extrato etanólico bruto 80 %; **C-** Própolis da Bahia: Extrato seco resuspenso a 1%.

Tabela 4. Identificação dos compostos químicos em própolis vermelha obtidos por análises de LC / MS.

Picos	TR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS	Fórmula	Compostos	Classes de compostos	Amostras
1	2,89	179	135 (100), 89 (20), 143(18)	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico	P1; P2; P3; P4; P5
2	3,43	191	127 (100), 84 (73), 173 (63)	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quinico	Ácido hidroxicinâmico	P1; P2; P3; P5
3	3,61	193	177 (16), 149 (47), 133 (100)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ácido ferúlico	Ácido hidroxicinâmico	P2; P3; P4; P5
4	3,72	163	119	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido p-coumárico	Ácido hidroxicinâmico	P1; P2; P3; P4; P5
5	6,98	169	169 (55), 125 (100)	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	Ácido hidroxibenzóico	P1; P2; P3; P4; P5
6	11,58	153	109 (100), 153 (30)	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido protocatecuico	Ácido hidroxibenzóico	P1; P2; P3; P4; P5
7	19,47	121	91 (35), 92 (100)	C ₇ H ₆ O ₂	Ácido benzóico	Ácido hidroxibenzóico	P2; P3; P5
8	19,73	121	92 (100), 120 (89)	C ₇ H ₆ O ₂	4-hidroxibenzaldeído	Hidroxibenzaldeídos	P1; P2; P3; P4; P5
9	19,89	353	135 (5), 191 (100), 179 (34)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico	Ácido hidroxicinâmico	P1; P2; P3; P4; P5
10	27,64	151	135 (100), 106	C ₈ H ₈ O ₃	Ácido 4-hidroxifenilacético	Ácido hidroxifenilacético	P1; P2; P3; P4; P5
11	27,92	151	136 (100), 151 (34)	C ₈ H ₈ O ₃	Vanilina	Hidroxibenzaldeído	P1; P4
12	30,85	147	103	C ₉ H ₈ O ₂	Ácido cinâmico	Ácido hidroxicinâmico	P1; P2; P3; P4; P5
13	35,66	271	253 (100), 225 (26), 151 (10)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Pinobanksin	Flavanonas	P1; P2; P3; P4; P5
14	37,93	301	179 (100), 151 (60), 361	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
15	42,45	273	166	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	Floretina	Dihydrochalcones	P1; P2; P3; P4; P5
16	42,76	271	151 (100), 119 (30)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Naringenina	Flavanonas	P1; P2; P3; P4; P5
17	43,77	269	213 (30), 275 (25), 241 (100)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Medicarpina	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
18	47,27	315	300 (100), 271 (10), 243	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₀	Quercetina-7-metil éter	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
19	49,5	199	136 (25), 155 (100), 181(20)	C ₉ H ₁₀ O ₅	Ácido síringico	Ácido hidroxibenzóico	P1; P2; P3; P4; P5
20	49,74	253	197 (50), 209 (100), 225 (85)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Daidzeína	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
21	51,5	283	268 (100), 175	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Biochanina A	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
22	53,25	285	108 (100), 270 (10)	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Vestitone	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
23	58,78	271	109 (100), 134 (72), 147 (75)	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	Neovestitol	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5

24	60,27	255	118 (18), 134 (100), 152 (5)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Isoliquiritigenina	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
25	60,59	267	254 (100), 237 (39), 267	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetina	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
26	60,9	271	137 (100), 146 (60), 123 (18)	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	Vestitol	Isoflavonóides	P1; P2; P3; P4; P5
27	61,72	301	232 (5), 255 (100), 286	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	Dimetilgalangin	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
28	62,95	269	269(100), 241 (59) 227 (20)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Galangin	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
29	63,41	255	213 (100), 211 (48), 151 (38)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrina	Flavanonas	P1; P2; P3; P4; P5
30	66,41	283	268 (100), 239 (30), 211	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Galangin-5-metil éter	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
31	69,94	285	285 (100), 257 (10), 151	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
32	70,86	463	301 (100), 300 (60)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3-O-glucoside	Flavonóis	P1; P2; P3; P4; P5
33	79,69	601	465 (100), 409 (55), 557 (10)	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	Guttiferone F	Benzofenona	P1; P2; P3; P4; P5
34	83,07	601	465 (100), 395 (20), 583	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	Guttiferone E	Benzofenona	P1; P2; P3; P4; P5

TR: Tempo de Retenção (min); P1 – P5 = amostras de própolis.

Composição dos ácidos graxos

Neste estudo foram identificados e quantificados dezoito ácidos graxos (Tabela 5). O maior percentual, à exceção da amostra P2, observou-se para os ácidos saturados (SAT, variação entre 39,39 a 67,32%), seguidos dos ácidos monoinsaturados (MUFA, variação entre 22,06 a 46,44%) e ácidos polinsaturados (PUFA, variação entre 8,12 a 17,52%). O ácido oleico (MUFA, C18: 1n9, variação entre 19,46 a 46,1%) e o ácido palmítico (SAT, C16:0, variação entre 19,72 a 41,06%) foram os ácidos graxos majoritários nas amostras de própolis vermelha analisadas. Os valores obtidos para o ácido linoleico (C18:2n6c, variação 5,32 a 12,19%) também foram consideráveis e diferiram estatisticamente entre as amostras. A amostra P2 apresentou maior quantidade ($p < 0,05$) do C18:1n9, enquanto na amostra P4 a quantidade do C16:0 foi mais elevada.

A relação PUFA:SAT variou de $0,14\% \pm 0,00$ a $0,39\% \pm 0,01$ e foi superior nas amostras P1 e P2, estas não diferiram estatisticamente entre si. Os valores obtidos para a relação n6:n3 (variação de $1,51\% \pm 0,02$ a $2,60\% \pm 0,05$) em todas as amostras foram menores que 4 (limite recomendado pela WHO, 2015), indicando que a própolis analisada tem baixa propensão a acentuar doenças cardiovasculares (Santos-Silva, Bessa, e Santos-Silva, 2002).

O Índice Aterogênico (IA) nas amostras de própolis vermelha variou entre $0,41\% \pm 0,00$ a $1,99\% \pm 0,01$ enquanto que, o Índice Trombogênico (IT) variou de $0,60\% \pm 0,00$ a $1,84\% \pm 0,01$. Estes índices expressam os efeitos dos ácidos graxos ao agravo de doenças coronárias e promoção de coagulação do sangue no interior do vaso sanguíneo afetando a saúde humana, no entanto ainda não foram estabelecidos valores de referência. Segundo Souza et al. (2015), dietas com valores quanto mais baixos IA e IT podem atenuar o risco a doenças, respectivamente, a aterosclerose e a trombose.

Tabela 5. Composição química de ácidos graxos presentes em amostras de própolis vermelhas produzidas na região sul da Bahia, Brasil.

Ácidos Graxos	P1	P2	P3	P4	P5
C6:0	0,34±0,09 ^b	0,07±0,02 ^b	0,24 ±0,05 ^b	0,43±0,04 ^b	1,88 ±0,23 ^a
C8:0	0,95±0,02 ^b	0,14±0,02 ^c	0,86±0,07 ^b	1,05±0,08 ^b	2,47±0,22 ^a
C10:0	0,08±0,00 ^c	0,03±0,00 ^d	0,31±0,01 ^b	0,06±0,00 ^{c,d}	0,74±0,02 ^a
C11:0	0,38±0,00 ^a	0,02±0,00 ^c	0,03±0,00 ^c	0,07±0,00 ^b	0,04±0,00 ^{bc}
C12:0	0,26±0,02 ^b	0,03±0,00 ^c	0,33±0,07 ^b	0,18±0,03 ^{b,c}	2,27±0,04 ^a
C13:0	3,94±0,06 ^e	6,03±0,25 ^d	23,55±0,7 ^a	10,62±0,30 ^c	12,70±0,15 ^b
C14:0	2,12±0,02 ^b	1,09 ±0,05 ^d	0,74±0,00 ^e	6,00±0,07 ^a	1,70±0,06 ^c
C14:1	0,07±0,00 ^c	0,002±0,00 ^e	0,02±0,00 ^d	1,86±0,00 ^a	0,10±0,00 ^b
C16:0	26,86±0,14 ^b	20,36±0,00 ^d	21,68±0,04 ^c	41,06±0,42 ^a	19,72±0,42 ^d
C16:1	0,57±0,07 ^a	0,21±0,01 ^b	0,15±0,00 ^b	0,69±0,01 ^a	0,10 ±0,00 ^b
7C17:0	0,35±0,05 ^a	0,16±0,02 ^b	0,20±0,01 ^b	0,25±0,03 ^{a,b}	0,17±0,00 ^b
C18:0	4,15±0,04 ^b	3,01±0,00 ^d	0,67±0,04 ^e	3,60±0,21 ^c	11,26±0,07 ^a
C18:1n9	36,86±0,13 ^b	46,10±0,10 ^a	33,51±0,24 ^c	19,46±0,10 ^d	33,88±0,16 ^c
C18:2n6c	12,19±0,16 ^a	10,23±0,04 ^b	9,27±0,36 ^c	6,39±0,00 ^d	5,32±0,13 ^e
C18:3n3	5,33±0,22 ^a	3,94±0,09 ^b	3,84±0,21 ^b	4,23±0,04 ^b	2,80±0,27 ^c
C20:0	1,74±0,00 ^b	2,70±0,35 ^a	1,71±0,00 ^b	1,09 ±0,06 ^b	2,88±0,11 ^a
C20:1CIS-11	0,16±0,02 ^a	0,12±0,02 ^a	0,01±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,04±0,01 ^b
C22:0	3,62±0,13 ^a	5,73±0,13 ^a	2,83±0,01 ^c	2,88±0,36 ^{b,c}	1,89±0,02 ^d
Soma, proporções e índices de ácidos graxos					
SAT	44,80±0,21 ^d	39,39±0,01 ^e	53,17±0,81 ^c	67,32±0,16 ^a	57,73±0,03 ^c
MUFA	37,68±0,17 ^b	46,44±0,12 ^a	33,70±0,23 ^c	22,06±0,11 ^d	34,15±0,17 ^c
PUFA	17,52±0,38 ^a	14,17±0,13 ^b	13,13±0,58 ^b	10,62±0,04 ^c	8,12±0,14 ^d
Total	100	100	100	100	100
PUFA:SFA	0,39±0,01 ^a	0,36±0,00 ^a	0,25±0,01 ^b	0,16±0,00 ^c	0,14±0,00 ^c
n-6:n-3	2,29±0,06 ^{a,b}	2,60±0,05 ^a	2,41±0,04 ^a	1,51±0,02 ^c	1,91±0,23 ^{b,c}
IA	0,64±0,00 ^b	0,41±0,00 ^d	0,53±0,01 ^c	1,99±0,01 ^a	0,68±0,01 ^b
IT	0,80±0,01 ^c	0,60±0,00 ^d	0,69±0,02 ^d	1,84±0,01 ^a	1,14±0,01 ^b

Os resultados dos ácidos graxos foram expressos em porcentagem relativa, desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey. P1 – P5 = amostras de própolis. Ácido Caprílico (C8:0); Ácido Láurico (C12:0); Ácido Mirístico (C14:0); Ácido Pentadecanóico (C15:0); Ácido Cis-10-Pentadecenóico (C15:1 CIS-10); Ácido Palmítico (C16:0); Ácido Heptadecanóico (C17:0); Ácido Cis-10-Heptadecenóico (C17:1 CIS-10); Ácido Esteárico (C18:0); Ácido Oleico (C18:1n9ct); Ácido Linolelaídico (C18:2n6t); Ácido Linoléico (C18:2n6c); Ácido Linolênico (C18:3n3); Ácido Araquidônico (C20:0); Ácido Cis-11,14-Eicosadienoico (C20:2 CIS); Ácido Cis-8,11,14-Eicosadienoico (C20:3n6); Ácido Eicosatrienóico (C20:3n3); Ácido Beênico (C22:0); Ácido Tricosanoico (C23:0); Ácido Lignocérico (C24:0); Ácido Nervônico (C24:1); SAT = Total de ácido graxo saturado; MUFA = Total ácido graxo monoinsaturado; PUFA = Total de ácido graxo polinsaturado; PUFA:SAT = proporção de ácido graxo polinsaturado e saturado; n-6:n-3 = proporção de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3; IA = Índice de Aterogenicidade; IT = Índice de Trombogenicidade.

Os ácidos graxos C16:0, C18:1n9 e C18:3n3 também foram identificados por Righi, Negri, e Salatino (2013) em própolis de coloração marron e verde coletada em diferentes regiões do Brasil, no entanto não foi encontrado estudo com própolis vermelha. O ácido oleico, principal ácido graxo do óleo de azeite de oliva, é indicado como promissor na regeneração de tecidos (Jung et al., 2015), promove a redução do colesterol-LDL, atenua em fatores de riscos de doenças cardiovasculares, como aterogênese e trombogênese (Lopez-Huertas, 2010). Os índices aterogênico e trombogênico nas amostras de própolis evidenciam valores similares a outros alimentos benéficos à saúde, a exemplo do peixe (Šimat, Bogdanović, Poljak, e Petričević, 2015). A amostra P4 foi exceção devido aos elevados níveis de C16:0, ácido graxo encontrado frequentemente na cera apícola (Fayaz et al., 2017). De fato, na amostra P4 constatou-se uma relação diretamente proporcional entre C16:0 e o teor de cera, o que poderá explicar o comportamento diferenciado desta amostra.

É importante ressaltar a presença dos ácidos graxos da família ômega (C18:3n3 e C18:2n6c), os quais são relatados como suplementos da dieta que auxiliam no tratamento doenças cardíacas e inflamatórias (Borges, Santos, Telles, Correia, e Lanna, 2014). Esses resultados apontam a própolis como um produto natural rico em ácidos graxos benéficos à saúde humana, podendo vir a ser utilizado como um suplemento energético.

Atividade antioxidante

A descoberta que muitas doenças estavam relacionadas as espécies reativas de oxigênio (ERO), por exemplo, doenças cardiovasculares, neurológicas, cancro, inflamações, entre outras, incentivou os investigadores na busca de produtos naturais com propriedade antioxidantes. Entre esses produtos, a própolis tem apresentado promissor na inibição e bloqueio das ações desses radicais (Rufatto et al., 2017).

A figura 3 apresenta os resultados obtidos para a atividade antioxidante dos extratos metanólicos da própolis vermelha. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante. Os valores de IC50, determinados pelo método do DPPH, variaram de $250 \pm 5,51$ a $11,5 \pm 1,50$ $\mu\text{g/mL}$ e a amostra P2 e P3 obtiveram efeitos antioxidantes semelhantes ($p < 0,05$). A porcentagem de inibição da descoloração do β -caroteno oscilou de $75\% \pm 1,13$ a $60,10\% \pm 0,45$

e todas as amostras apresentaram valores de inibição estatisticamente diferentes. A própolis P5 evidenciou a maior capacidade para sequestrar o radical DPPH, enquanto que a P2 teve o melhor efeito na inibição da peroxidação lipídica no ensaio bioquímico do branqueamento do β -caroteno.

Ao comparar os resultados obtidos nas amostras com os padrões, observou-se que substâncias puras, como ácido butil-hidroxianisol (BHA = $11 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) e ácido ascórbico ($22 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) foram mais eficazes ($p < 0,05$) na redução do radical DPPH. No entanto, no teste do branqueamento do β -caroteno, o ácido ascórbico apresentou atividade antioxidante inferior ($43,63\% \pm 0,95$) às das amostras da própolis vermelha em estudo. Este resultado pode estar relacionado com a diminuição da capacidade antioxidante dessa substância ao longo do ensaio devido à sua instabilidade e fácil degradação (Cömert e Gökmen, 2018).

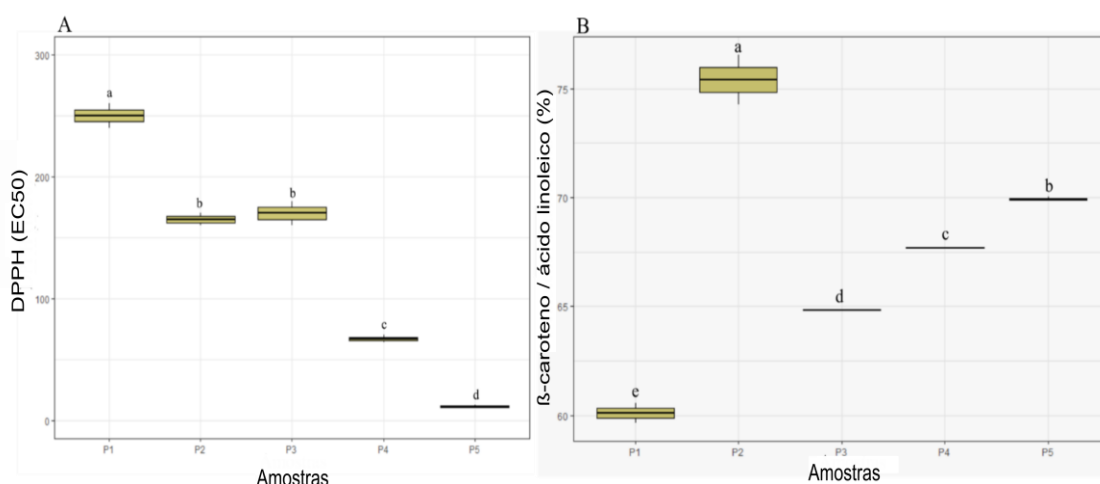


Figura 3. Determinação da atividade antioxidante dos extratos de cinco amostras de própolis vermelha, Bahia, Brasil, por DPPH (IC50) (A) e o branqueamento do β -caroteno / ácido linoleico (%) (B). As médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey. P1 – P5 = amostras de própolis.

Alguns estudos têm relatado a atividade antioxidante da própolis, por exemplo, Mendonça et al. (2015) para a própolis vermelha do Estado de Alagoas (Brasil) verificaram uma atividade antioxidante superior à observada neste estudo. Estes investigadores constataram a seguinte sequência para a atividade sequestradora do radical DPPH: extrato hexânico ($5,15 \mu\text{g/mL}$) > maior > fração clorofórmica ($5,20 \mu\text{g/mL}$) > fração de acetato de etila ($6,05$

$\mu\text{g/mL}$) > extratos etanólicos (8,01 $\mu\text{g/mL}$). Machado et al. (2016), verificaram que o extrato etanólico da própolis verde oriunda da Região sudeste do Brasil teve ação antioxidante superior ($\text{EC}_{50} = 31,80 \pm 0,16$) à das própolis vermelhas proveniente do Nordeste (EC_{50} variou de $44,29 \pm 0,29$ a $89,32 \pm 0,28$) e as própolis marrons da região Sul (EC_{50} variou de $163,00 \pm 0,31$ a $164,52 \pm 0,34$).

Righi et al. (2011) relacionam a atividade antioxidante ao flavonoide rutina. Farooqui e Farooqui (2012), referem que os ácidos clorogênico e cafeico impedem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Oldoni et al. (2011) constataram que o composto vestitol expressou atividade antioxidante. Tais compostos foram identificados na própolis em estudo e talvez sejam os principais responsáveis pelos elevados efeitos antioxidantes, principalmente da amostra P5.

Os flavonóides são indicados como os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante da própolis (Right et al., 2011; Machado et al., 2016). No entanto, neste estudo, em nenhuma das amostras, observou-se correlação entre a capacidade da própolis reduzir os radicais livres e o teor de fenóis totais ou flavonoides totais. De fato, apesar das amostras exibirem perfis químicos semelhantes, a natureza química dos compostos fenólicos, a quantidade, a interação entre eles e principalmente, a preferência pelas abelhas e disponibilidade floral são variáveis que podem interferir nas propriedades antioxidantes. O que pode justificar a relevância da atividade antioxidante observada na amostra P5.

Atividade antimicrobiana

Os resultados dos ensaios biológicos *in vitro* das ações antimicrobianas das amostras de própolis estão representados na Tabela 6. Todas as amostras de própolis testadas demonstraram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos avaliados. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, o MIC variou de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o MBC entre 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A amostra P5 foi a mais eficaz contra *S. aureus* ATCC. O crescimento de *S. aureus* ESA 321 (isolado clínico) foi inibido para concentrações de extrato que oscilaram de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as amostras P2, P3, P5, P4 e P1, respetivamente. A MBC apresentou valores mais elevados (5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as amostras P2 e P4 e mais reduzidos para amostras P3 e P5 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Isto indica que as amostras P3 e P5 foram as que induziram efeitos negativos mais acentuados no crescimento desta bactéria. O MIC para *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 variou de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a MBC de 500 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar de não se verificarem diferenças no que diz respeito ao MIC entre as amostras P1, P2 e P4, e MBC para as amostras P2 e P4 foram muito superiores, indicando que estas últimas exerceram efeitos inibidores menos relevantes. *S. enteritidis* ESA 87 apresentou valores de MIC que variaram de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e MBC de 100 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em relação a ação antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida albicans* ESA 115 a própolis P5 apresentou atividade fungistática (MIC=500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fungicida (MBC=500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) superior às demais amostras. As leveduras *C. albicans* foram mais resistentes à própolis do que as bactérias. Segundo Sánchez-Martínez e Pérez-Martín (2001), espécies do gênero *Candida* são organismos dimórfico encontrados, normalmente, na mucosa oral e vaginal, comensais do trato gastrointestinal dos humanos e a sua capacidade mutagênica poderá ser responsável pela resistência a antifúngicos.

As bactérias gram-negativas apresentaram maior resistência à ação dos extratos da própolis do que as bactérias gram-positivas o que poderá ser explicado pelas diferenças existentes na composição da parede celular. As estirpes de referência foram mais sensíveis aos efeitos negativos da própolis do que os isolados clínicos. Este comportamento era esperado, já que os isolados clínicos podem ter estado em contato com antibióticos, utilizados quer para fins terapêuticos quer profiláticos, o que poderá ter contribuído para uma seleção diferencial.

Apesar de existirem alguns estudos sobre o efeito antimicrobiano da própolis vermelha contra, principalmente, microrganismos que provocam infecções sistêmicas, como *S. aureus*, não foram encontrados relatos sobre o comportamento de *S. enteritidis*. Machado et al. (2016) verificaram que o extrato etanólico da própolis vermelha de Sergipe (Brasil) foi mais efetivo contra *S. aureus* ATCC 25923 (MIC – 25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. aureus* ATCC 33591 (MIC – 100 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC = 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) comparativamente com as própolis verde e própolis marrom. Segundo López et al. (2015), os efeitos inibidores da própolis vermelha brasileira foram similares

aos da própolis de Cuba, exceto a amostra proveniente do Estado de Alagoas (Brasil), cujos efeitos negativos foram mais acentuados. Os efeitos inibidores induzidos pelos extratos etanólicos da própolis estudada por Neves et al. (2016) contra *C. albicans* MIC ($256 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram superiores aos observados neste estudo. O método de extração dos compostos, o meio de cultura, a quantidade de inóculo (Almeida et al., 2017), bem como a adaptação do método de microdiluição para concentrações pré-determinadas ao invés de diluições sucessivas, podem ter contribuído para a discrepância dos destes resultados face aos reportados na literatura.

Verificou-se que os antibióticos, gentamicina e anfotericina, comumente utilizados, respectivamente, contra o bactérias e leveduras, foram mais eficazes que a própolis na inibição/ morte de todos os microrganismos em estudo. Regueira-Neto et al. (2017) avaliaram o efeito dos extratos hidroetanólicos da própolis isoladamente e em associação com os antibióticos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e concluíram que o efeito sinérgico do antibiótico gentamicina com o da própolis pode potencializar o efeito antimicrobiano deste produto natural, principalmente, contra cepas bacterianas resistentes. Resultado semelhante foi relatado por Pippi et al. (2015) sugerindo como uma possível estratégia terapêutica a combinação da própolis com fluconazol no tratamento de estirpes de *Candida* sp. resistentes a antifúngicos.

A identificação da isoliquiritigenina, neovestitol, vestitol e formononetina no perfil químico da própolis analisada nesse estudo pode ter contribuído para a sua atividade antimicrobiana tal como sugerido por Bueno-Silva et al. (2013) e Neves et al. (2016). Segundo Burdock (1998), esta atividade biológica depende do efeito sinérgico entre ácidos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, especialmente, pinocembrina, pinobanksin e galangina. Medicarpina também foi indicado como um potente antibacteriano contra *S. aureus* (Inui et al., 2014). Como este composto faz parte do perfil químico da própolis vermelha em estudo, poderá ter sido também responsável pela atividade antimicrobiana observada e talvez a concentração desses flavonóides associada à quantidade de fenóis totais tenham contribuído para a maior eficácia do extrato P5.

Tabela 6. Atividade Antimicrobiana de amostras de própolis vermelha produzida da região sul do Estado da Bahia, Brasil.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300		<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		<i>Staphylococcus aureus</i> ESA 321		<i>Salmonella enteritidis</i> ESA 87		<i>Candida albicans</i> ESA 115	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
P1	300	500	500	500	2500	5000	500	2500	500	5000	2500	10000
P2	500	500	500	5000	500	1000	100	5000	500	5000	500	500
P3	100	500	100	500	2500	2500	100	500	50	500	2500	2500
P4	500	500	500	5000	1000	2500	500	5000	500	5000	1000	2500
P5	50	100	50	100	500	500	100	500	50	100	1000	2500

MIC = Concentração Mínima Inibitória; MBC = Concentração Mínima Bactericida; P1 – P5 = amostras de própolis.

Conclusões

As amostras da própolis vermelha produzida no Sul do Estado da Bahia, Brasil apresentou qualidade para parâmetros físico-químicos, além de uma elevada atividade antioxidante, tendo porcentagem de inibição da descoloração do β -caroteno/ácido linoléico maior que o ácido ascórbico (substância de referência), e uma composição rica em ácido oleico, benéficos à saúde humana.

As amostras analisadas são seguras do ponto de vista microbiológico, os níveis de bactérias aeróbios mesófilos são reduzidos e as bactérias patogênicas estavam ausentes. E a análise polínica demonstrou que os tipos *S. terebinthifolia*, *D. ecastaphyllum* e *Cecropia* sp. contribuíram para a produção da própolis vermelha.

Com a identificação por LC/MS dos compostos formononetina, vestitol, neovestitol, isoliriquitigenina, biochanina A, daidzeína e medicarpina, confirma que a identidade da própolis vermelha produzida no Sul do Estado da Bahia como própolis vermelha brasileira. Assim, esse estudo sugere que a designação de origem conferida à própolis alagoana seja reconsiderada, ampliando a área de produção desse tipo de própolis, incluindo o Estado da Bahia.

Referência

Ahn, M.R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.S. e Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal Agriculture Food Chemical*, 52(24):7286-7292.

Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., e Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 278-283.

Almeida, E.T.C., Silva, M.C.D., Oliveira, J.M.S., Kamiya, R.U., Arruda, R.E.S., Vieira, D.A., e Silva, V.C. (2017). Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(5), 280-287.

Andrade, J.K.S., Denadai, M., Oliveira, C.S., Nunes, M.L., e Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129-138.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC International: Arlington, VA, USA.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2000). Official Methods of Analysis. AOAC International: Maryland, USA.

Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence- Based Complementary Alternative Medicine*, 2, 29-32.

Barbosa, R.A., Nunes, T.L.G.M., Nunes, T.L.G.M., Paixão, A.O., Belo Neto, R., Moura, S., Albuquerque Junior, R.L.C., Cândido, E.A.F., Padilha, F.F., Quintans-Júnior, L.J., Gomes, M.Z., e Cardoso, J.C. (2015). Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54 (6), 1-12.

Barth, O.M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana*, 37, 97-101.

Barth, O.M., e Luz, C.F.P. (2009). Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 181-188.

Bennett, R.W., e Lancette, G.A. (2001). *Staphylococcus aureus*, Chapter 12. In FDA Bacteriological analytical manual, 8th ed., Rev.A. AOAC international, Gaithersburg, MD.

Borges M. C., Santos F. M. M., Telles R. W., Correia M. I. T. D., e Lanna C. C. D. (2014). Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? *Revista Brasileira de Reumatologia*, 54 (6), 459-466.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., e Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant. *Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Brasil. (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2011. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF.

Brasil. (2001). Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>

Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., e Rosalen, P.L. (2013). Antiinflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19),4546-4550.

Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S.M., e Rosalen, P.L. (2016). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Natural Product Research*, 6, 1-7.

Bueno-Silva, B., Rosalen, P.L., Alencar, S.M., e Mayer, M.PA. (2017). Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. *Journal of Functional Foods*, 36, 440-447.

Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). (1998). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.

Cömert, E.D., e Gökmen, V. (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105, 76–93.

Clarke, R., Peyton, D., Healy, M.G., Fenton, O., e Cummins, E. (2017). A quantitative microbial risk assessment model for total coliforms and *E. coli* in surface runoff following application of biosolids to grassland. *Environmental Pollution*, 224, 739-750.

Dahl, A., Oresajo, C., e Yatskayer, M. (2011). Clinical evaluation of an antioxidant gel cream containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin on photodamaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(2), AB24.

Daugusch, A., Morais, C.S., Fort, P., e Park, Y.K. (2008). Brazilian red própolis – chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 435-441.

De-Melo, A.A.M., Matsuda, A.H., e Almeida-Muradian, L.B. (2012). Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. *Instituto Adolfo Lutz*, 71(3), 540-548.

Devi, K.P., Malar, D.S., Nabavi, S.F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S.M., Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, 99, 1–10.

Dias, L.G., Pereira, A.P., e Estevinho, L.M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4246–4253.

Erdtman, G. (1960). The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskr*, 54, 561–564.

Estevinho, M.L., Rodrigues, S., Pereira, A.P., e Feas, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429–435.

Falcão, S.I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M.R.M., Freire, C., Cardoso, S.M., e Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, 24, 309-318.

Farooqui, T., e Farooqui, A.A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience*, 1(4), 779-793.

Fayaz, G., Goli, S.A.H., Kadivar, M., Valoppi, F., Barba, L., Balducci, C., Conte, L., Calligaris, S., e Nicoli, M.C. (2017). Pomegranate seed oil organogels structured by propolis wax, beeswax, and their mixture. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1-11.

Ferreira, J.M., Fernandes-Silva, C.C., Salatino, A., Negri, G., e Message, D. (2017). New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3552-3558.

Franchin, M., Freires, I.A., Lazarini, J.G., Nani, B.D., Cunha, M.G., Colon, D.F., Alencar, S.M., e Rosalen, P.L. (2017). The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 27, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>

Freitas, A.S., Barth, O.M., e Luz, C.F.P. (2010). Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. *Revista Brasileira de Botânica*, 33(2), 343-354.

Frozza, C.O.S., Brum E.S., Alving A., Moura, S., Henriques, J.A., e Roesch-Ely, M. (2016). LC-MS analysis of Hep-2 and Hek-293 cell lines treated with Brazilian red propolis reveals differences in protein expression. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(8), 1073-84. doi: 10.1111/jphp.12577

Funari, C. S., e Ferro V. O. (2006). Análise de própolis. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 171-178.

González, M.T.P., Fumagalli, F., Benevenuto, C.G., Emery, F.S., e Gaspar, L.R. (2017). Novel benzophenone-3 derivatives with promising potential as UV filters: Relationship between structure, photoprotective potential and phototoxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 200-210. doi: 10.1016/j.ejps.2017.02.014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>, Acesso em: agosto de 2016.

ISO 15213. (2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. International Standards Organization, Switzerland.

ISO 21527-2. (2008). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds – Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95. International Standards Organization, Switzerland.

Inui, S., Hatano, A., Yoshino, M., Hosoya, T., Shimamura, Y., Masuda, S., Ahn, M.R., Tazawa, S., Araki, Y., e Kumazawa S. (2014). Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Natural Product Research*, 28(16),1293-1296. doi: 10.1080/14786419.2014.898146.

Jung, Y.H., Lee, S., Oh, S.Y., Lee, H.J., Ryu, J.M., e Han, H.J. (2015). Oleic acid enhances the motility of umbilical cord blood derived mesenchymal stem

cells through EphB2-dependent F-actin formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(8), 1905-1917.

Kuete, V., Tchakam, P.D., Wiencha, B., Ngameni, B., Wabo, H.K., Tala, M.F., MOUNGANG, M.L., Ngadjui, B.T., e Murayama, T. (2013). Efferth, T. Cytotoxicity and modes of action of four naturally occurring benzophenones: 2,2',5,6'-Tetrahydroxybenzophenone, guttiferone E, isogarcinol and isoxanthochymol. *Phytomedicine*, 20(6), 528-536.

Kumar, R., Sharma, P. K., e Mishra, P.S. (2012). A Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1), 266-279.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., e Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red própolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434–5440.

Li, H., Yang, L., Yuebing, Z., e Gao, Z. (2016). O Kaempferol inibe a síntese, a proliferação e a ativação do colágeno de fibroblastos na cicatriz hipertrófica por meio do direcionamento do receptor de TGF- β tipo I. *Biomedicina e Farmacoterapia*, 83, 967-974.

López, B.G.C., Lourenço, C.C., Alves, D.A., Machado, D., Lancellotti, M., e Sawaya, A.C.H.F. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: na alert for its safe use. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 677-687.

López, B.G.C., Schmidt, E.M., Eberlin, M.N., e Sawaya, A.C.H.F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, 146, 174–180.

Lopez-Huertas, E. (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*, 61(3), 200-207.

Louveaux, J., Maurizio, A., e Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, Gerrards Cross, 59, 139-157.

Machado, B.A.S., Silva, R.P.D., Barreto, G.A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandão, H.N., Rocha, J.L.C., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A.P., Umsza-Guez, M.A., e Padilha, F.F. (2016). 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*, 8, 1-26.

Matos, V.R., Alencar, S.M., e Santos, F.A.R. (2014). Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the Semiarid Region of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(1), 407-418.

Matos, V.R., e Santos, F.A.R. (2016). The pollen spectrum of the propolis of *Apis mellifera* L. (Apidae) from the Atlantic Rainforest of Bahia, Brazil. *Palynology*, 1-9.

Mendonça, I.C.G., Porto, I.C.C.M., Nascimento, T.G., Souza, N.S., Oliveira, J.M.S., Arruda, R.E.S., Mousinho, K.C., Santos, A.F., Basílio-Júnior, I.D., Parolia, A., e Barreto, F.S. (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*, 15(357), 1-12.

Mendonça-Melo, L., Mota, E., Lopez, B., Sawaya, A., Freitas, L., Jain, S., Batista, M., e Araújo, E. (2017). Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 56 (1), 1-8.

Morais, M., Moreira, L., Feas, X., e Estevinho, L.M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096-1101.

Nascimento, T.G., Silva, A.S., Constant, P.B.L., Silva, S.A.S., Moura, M.A.B.F., Almeida, C.P., Silva, V.C., Wanderley, A.B., Basílio Júnior, I.D., e Escodro, P.B. (2018). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some comercial extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 57(2), 1-9.

Neves, M.V.M., Silva, T.M.S., Lima, E.O., Cunha, E.V.L., e Oliveira, E.J. (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 159-166.

NP 1309. (1976). Mel – Determinação da acidez, Ed. 1.

Novak, E.M., Silva, M.S.C., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., López, B.G., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi, R.R., Marumo, K.T., Rodrigues, R.F., e Maria, D.A. (2014). Antitumoural activity of Brazilian red própolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. *Journal of Functional Foods*, 11, 91-102.

Oldoni, T.L.C., Cabral, I. S. R., d'Arce, M.A.B.R., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Nascimento, A.M., e Alencar, S.M. (2011). Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*, 77(2), 208–213.

Park, Y.K., Ikegari, M., Abreu, J.A.S., e Alcici, N.M.F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3), 313-318.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Scamparini, A..R.P., Aguiar, C.L. (2002). Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Yruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32(6), 997-1003.

Pippi, B., Lana, A.J.D., Moraes, R.C., Gñuez, C.M., Machado, M., Oliveira, L.F.S., Poser, G. L.V., e Fuentefria, A.M. (2015). In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red

própolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 839-50.

Regueira-Neto, M.S., Tintino, S.R., Silva, A.R.P., Costa, M.S., Boligon, A.A., Matias, E.F.F., Balbino, V.Q., Menezes, I.R.A., e Coutinho, H.D.M. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572-580.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyerd, H., e Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2363-2370.

Righi, A.A., Negri, G., e Salatino, A. (2013). Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.

Rufatto, L.C., Santos, D.A., Marinho, F., Henriques, J.A.P., Ely, M.R., e Moura, S. (2017). Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591–598.

Sánchez-Martínez, C., e Pérez-Martín, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), 214-221.

Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., e Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77:187-194.

Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C., Oliveira, R.F., e Eberlin, M. (2006). Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie*, 37, 398-407.

Silva B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., e Alencar, S.M. (2008). Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 313-316.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., e Gomes, R.A.R. (2010). Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos e Água. Varela, 4^o edição, São Paulo.

Šimat, T., Bogdanović, T., Poljak, V., e Petričević, S. (2015). Changes in fatty acid composition, atherogenic and thrombogenic health lipid indices and lipid stability of bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) during storage on ice: Effect of fish farming activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40,120-125.

Simone-Finstrom, M. e Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41, 295-311.

Singleton, V.L., Orthofer, R., e Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299:152-178.

Souza, A.H.P., Corrêa, R.C.G., Barros, L., Calhelha, R.C., Santos-Buelga, C., Peralta, R.M., Bracht, A., Matsushita, M., e Ferreira, I.C.F.R. (2015). Phytochemicals and biactive properties of *Ile paraguariensis*: an in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Research International*, 78:286-294.

Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, K., e Matsumoto, K. (2008). Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 109-116.

Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Hernandez, J., e Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131, 645–651.

Valero, A., Ortiz, J.C., Fongaro, G., Hernández, M., e Rodríguez-Lázaro, D. (2017). Definition of sampling procedures for collective-eating establishments based on the distribution of environmental microbiological contamination on food handlers, utensils and surfaces. *Food Control*, 77, 8-16.

WHO - World Health Organization. (2015). Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. 255p.

WHO. World Health Organization. Nutrition: population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. 2015. Available at: <http://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/index13.html>. Accessed on: December 12 2016.

ARTIGO 3

**SIMILARIDADE POLIFENÓLICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA, DO CAULE E
FOLHA DA *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB.³**

³Artigo será ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*, em versão na língua inglesa.

Similaridade polifenólica, atividade antioxidante e antimicrobiana da própolis vermelha brasileira, do caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Resumo: A própolis vermelha brasileira tem demonstrado efeitos benéficos à saúde humana o que tem despertado interesse na composição química e na principal fonte botânica que compõe este produto. Neste contexto, este estudo tem por objetivo investigar por HPLC-DAD a similaridade polifenólica em própolis vermelha brasileira com a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., assim como verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro. As amostras foram coletadas em apiários localizados no Sul do Estado da Bahia, Brasil, no período de fevereiro de 2015. Foram preparados extratos metanólicos para a análise por HPLC, determinação dos conteúdos de fenóis totais e flavonoides totais, atividade antioxidante (DPPH, branqueamento do β -caroteno-ácido linoleico). Os extratos foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Candida albicans*, tanto estirpes de ATCC como de isolados clínicos. Os compostos kaempferol, ácido cinâmico e naringinina apresentaram maiores concentrações na própolis enquanto que o miricetina e catequina foram majoritários na folha e no caule. A folha obteve teor elevado para os fenóis totais e melhor atividade antioxidante frente ao radical DPPH. A própolis se destacou no teor de flavonoides totais e na peroxidação lipídica, bem como na atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados. Apesar da própolis vermelha, o caule e folha da *D. ecastaphyllum* apresentarem matriz química semelhantes, o efeito sinérgico da mistura polifenólica da própolis foi mais acentuado frente a atividade antimicrobiana e destaque para amostra P5, no ensaio antioxidante pelo método DPPH.

Palavras-chave: HPLC; kaempferol; miricetina; atividades biológicas.

Polyphenolic similarity, antioxidant and antimicrobial activity of Brazilian red propolis and leaf and stem of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.

Abstract: Brazilian red propolis has shown beneficial effects to human health, which has aroused interest in the chemical composition and the main botanical source that makes up this product. In this context, this study aims to investigate the polyphenolic similarity in Brazilian red propolis with the species *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., as well as to verify the antioxidant and antimicrobial activity *in vitro*. The samples were collected in apiaries located in the south of the State of Bahia, Brazil, in the period of February 2015. Methanolic extracts were prepared for HPLC analysis, determination of total phenol content and total flavonoids, antioxidant activity (DPPH, β -carotene-linoleic acid bleaching). The extracts were tested against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Candida albicans*, both strains of ATCC and clinical isolates. The compounds kaempferol, cinnamic acid and naringenin showed higher concentrations in propolis while myricetin and catechin were the major components in the leaf and stem. The leaf obtained high content for the total phenols and better antioxidant activity against the radical DPPH. Propolis excelled in total flavonoid content and lipid peroxidation, as well as antimicrobial activity against all microorganisms tested. In spite of the red propolis, the stem and leaf of *D. ecastaphyllum* presented similar chemical matrix, the synergistic effect of the polyphenolic mixture of propolis was more accentuated against the antimicrobial activity and highlighted the P5 sample in the antioxidant assay by the DPPH method.

Keywords: HPLC; kaempferol; myricetin; biological activities.

1. Introdução

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em vários tecidos vegetais, os quais possuem em sua estrutura química um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, apresentam uma grande diversidade e complexidade, podendo variar de moléculas simples a polímeros complexos (HARBORNE, 1989; MARTI et al., 2015). Uma das principais características destes compostos é a elevada capacidade antirradicalar, os quais são formados em condições de estresse como injúrias, infecções, radiações ultravioletas, contaminantes, déficits hídricos e atuam como antipatógenos (MUCHUWETI et al., 2007; TAKSHAK; AGRAWAL, 2015).

Os fenólicos presentes em plantas e/ou produtos naturais provenientes destas, a exemplo da própolis, vêm sendo amplamente estudados por apresentar uma gama de propriedades biológicas com benefícios à saúde humana (DIAS et al., 2016; RUFATTO et al., 2017). Huang et al. (2014) relataram que 241 compostos químicos foram isolados pela primeira vez, a partir de própolis de diferentes partes do mundo, e que destes 112 determinados como compostos fenólicos da classe dos flavonoides, os quais contribuem de maneira substancial para as atividades farmacológicas da própolis.

Com benefícios à saúde promovida pela própolis tem-se aumentado o interesse em sua composição química, a qual é influenciada diretamente por fontes botânicas, condições climáticas e geográficas (BANKOVA et al., 2005; RIGHI et al., 2013; RUFATTO et al., 2017). A resina oriunda de exsudações de fontes vegetais contém compostos fenólicos que compõem aproximadamente metade dos constituintes da própolis (BANKOVA et al., 2005). As resinas podem ser recolhidas pelas abelhas preferencialmente por uma e/ou várias plantas conferindo desta forma a variabilidade e complexidade química desse produto (SALATINO et al., 2011). A identificação da própolis com base na origem botânica da resina é uma informação muito útil para a sua padronização química podendo assim, garantir uma melhor qualidade e segurança na comercialização (FALCÃO et al., 2013).

A própolis vermelha brasileira foi tipificada como origem botânica da espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) por apresentarem perfis químicos

semelhantes com destaque para os compostos flavonoides (DAUGSCH et al., 2008; MENDONÇA-MELO et al., 2017). Muitos desses flavonoides, como a formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina e daidzeína, não tinham sido antes relatados em amostras de própolis, sendo considerados como marcadores químicos da própolis vermelha (CABRAL et al., 2009; LÓPEZ et al., 2014; MENDONÇA-MELO et al., 2017). Compostos isolados desse tipo de própolis têm sido investigados quanto às suas propriedades biológicas e apresentado resultados satisfatórios (NEVES et al., 2016; BRENO-SILVA et al., 2017). Também foi conferida essa origem botânica para própolis vermelha do México e Cuba (LOTTI et al., 2010; PICCINELLI et al., 2011). No entanto, López et al. (2014), inferem que a mistura resinífera da própolis vermelha brasileira pode ter outras fontes botânicas visto que, em seus estudos os principais compostos identificados na *D. ecastaphyllum* não estavam presentes no produto apícola.

Apesar de um número crescente de estudos focados na própolis vermelha, em conjunto com suas fontes botânicas, ainda são insuficientes a caracterização polifenólica e atividades biológicas da própolis produzida nas diferentes regiões do Brasil. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar por Cromatografia de Alta Performance com detecção de matriz de iodo (HPLC-DAD) a similaridade polifenólica da própolis vermelha brasileira com a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., assim como verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. Apesar da elevada produção de própolis vermelha no litoral sul da Bahia - Brasil para exportação, ainda são incipientes os estudos que elucidem a caracterização química, a possível origem botânica e as propriedades biológicas desse produto.

2. Material e método

2.1 Produtos químicos e reagentes

O metanol e etanol foram fornecidos pela Pronolab (Lisboa, Portugal). Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH) e β -caroteno foram fornecidos pelo Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os meios de cultura para análise antimicrobiana foram adquiridos à Himedia (Índia).

Para análises de HPLC, o etanol anidro absoluto (p.a.) foi comprado de Carlo Erba (Peypin, França), metanol, ácido fórmico (grau HPLC) pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e os padrões de referências de compostos fenólicos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Foram adquiridos ácidos fenólicos: 4-hidroxibenzaldeído (98%), ácido 4-hidroxibenzóico ($\geq 99\%$), ácido 4-hidroxifenilacético (98%), ácido cafeico ($\geq 98\%$), ácido cinâmico ($\geq 99\%$), ácido clorogênico ($> 95\%$), ácido ferúlico ($\geq 99\%$), ácido gálico ($\geq 98\%$), ácido p-cumárico ($\geq 98\%$), ácido protocatecúico (99,63%), ácido sinápico ($\geq 99\%$), ácido syringic ($\geq 98\%$), ácido vanílico ($\geq 97\%$); flavonoides: (+) – catequina ($\geq 98\%$), (-)-Epicatechin ($\geq 98\%$), floretina ($\geq 98,5\%$), kaempferol ($\geq 98\%$), kaempferol-3-O-glucoside (95%), kaempferol-3-O-rutinoside ($\geq 98\%$), miricetina ($\geq 96\%$), naringina ($\geq 95\%$), naringenina (98%), pinocembrina (95%), phloridzin (99%), quercetina (95%), quercetina-3-O-glucopiranosídeo ($\geq 99\%$), rutina ($\geq 94\%$), tiliroside ($\geq 98\%$); e o estilbeno, resveratrol (99%). A água ultrapura utilizada durante os experimentos (18 M Ω .cm) foi obtido a partir de um sistema de purificação de Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

2.2 Obtenção das amostras

As amostras de própolis vermelha foram coletadas em colônias de *Apis mellifera* instaladas em colmeias Langstroth adaptadas com coletores de própolis, no período de fevereiro de 2015, em apiários localizados nos municípios de Canavieiras (S 15° 40' 30" e W 38° 56' 50") (n=4) e de Ilhéus (S 14° 47' 20" e W 39° 02' 58") (n=1), Estado da Bahia, Brasil. Simultaneamente, nos arredores de cada apiário (n=5), foram coletadas amostras de caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum*. Foram adquiridos um total de 15 amostras (própolis (P1-P5) n=5; caule (C1-C5) n=5; folha (F1-F5) n=5). Estes municípios localizam-se no litoral sul do Estado da Bahia, Brasil e apresentam fitofisionomia de Mata Atlântica e vegetação de mangue (IBGE, 2016).

2.3 Extração de compostos fenólicos

As amostras (1g) foram extraídas em etanol a 70% (12,5 mL) por 12h e após filtração foram submetidas à evaporação completa do solvente à temperatura ambiente sobre baixa pressão resultando em extratos secos a

8g/mL de concentração (PARK et al., 1998), o quais foram acondicionados à temperatura de -20° até o momento das análises.

2.4 Análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Um sistema de HPLC Shimadzu equipado com uma bomba de proeminência LC-20AD, um desgaseificador de proeminência DGU-20AS, um forno de coluna VP de CTO-10AS, um auto-amostrador de proeminência SIL-20A HT e um fotodiodo SPD-M20A detector de matriz (DAD) (Kyoto, Japão). Foram utilizados para identificar e quantificar compostos fenólicos em extratos da própolis vermelha brasileira, caule e folha da *D. ecastaphyllum* por meio da comparação do tempo de retenção e dos espectros UV-vis detectados pelos padrões puros (supracitados no item produtos químicos). Os espectros de UV foram registados em uma gama de 190-600 nm, e a quantificação foi realizada a 280, 320 e 360 nm dependendo da absorção máxima do composto fenólico, de acordo ao recomendado por Moreira et al. (2017).

Com um programa de gradiente, uma coluna Phenomenex Gemini C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) e uma coluna de proteção mantidas à 25 ° C foram utilizadas a separação de compostos fenólicos. A fase móvel apresentou 0,1% de ácido fórmico em metanol (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em água (solvente B), estes foram desgaseificados e filtrados, e utilizados para eluição a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min. O seguinte gradiente foi aplicado: 0-13 min: 20-26,5% A; 13-18 min: 26,5% A; 18-25 min: 26,5-30% A; 25-50 min: 30-45% A; 50-60 min: 45-50% A; 60-70 min: 50-55% A; 70-90 min: 55-70% A; 90-100 min: 70-100% A, seguido de 100% de A por 5 min e de volta a 20% A em 10 minutos e 5 minutos de condicionamento antes da próxima injeção. Os extratos antes da injeção foram filtrados em membrana de nylon de 0,2 µm e 10 µL de cada amostra foram injetados. Os resultados das concentrações dos compostos foram calculados em triplicata e expressos em mg por g de extrato seco da amostra.

2.5 Preparação dos extratos metanólicos

Foram preparados extratos metanólicos das amostras utilizando 0,1 g de extrato seco e solubilizado em 25 mL de metanol resultando em extrato de 4

mg/mL de concentração, o qual foi utilizado para quantificar o teor de fenóis totais e flavonoides totais e avaliar a atividade antioxidante *in vitro*.

2.6 Determinação dos fenólicos totais

Os fenóis totais foram medidos pelo método do Folin-Ciocalteu (SILGLETON et al., 1999) e os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por g de extrato seco da amostra (mg EAG/ g de extrato seco) a partir da curva padrão: $y = 0,0093x + 0,0287$; $R^2 = 0,9999$. Os flavonoides totais foram determinados pelo método colorimétrico do Cloreto de Alumínio (ALENCAR et al., 2007) e os resultados expresso em miligramas equivalente de quercetina por g de extrato seco da amostra (mg EQ/ g de extrato seco) a partir da curva padrão: $y = 0,0353x + 0,0073$; $R^2 = 0,9995$.

2.7 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade de eliminação de radicais livres estáveis DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) dos extratos foram avaliados espectrofotometricamente (Unicam Hekios Alpha, absorvância de 517 nm), segundo o método recomendado por Brand-Willians et al. (1995). Os resultados foram expressos em EC₅₀ (concentração responsável por metade do efeito máximo). A atividade do branqueamento do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico foi determinada a um comprimento de onda de 470 nm como recomendado por Ahn et al. (2004) e os resultados expressaram-se em porcentagem de inibição em relação ao controle.

2.8 Atividade antimicrobiana

Microorganismos investigados

Foram utilizados microrganismos (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300TM, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076TM, e *Candida albicans* ATCC 10231TM) adquiridos de um distribuidor autorizado, ATCC (American Type Culture Collection) e microrganismos (*Staphylococcus aureus* ESA 321, *Salmonella enteritidis* ESA 87 e *Candida albicans* ESA 115) isolados no Centro Hospitalar do Nordeste de Portugal e identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrárias de Bragança, Bragança, Portugal.

Preparação das amostras e dos inóculos

Os extratos secos das amostras foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO a 2,5% (v/v)) e os inóculos foram preparados em meio líquido, Brain Heart Infusion (BHI) e Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YEPD), para bactérias e leveduras, respectivamente e incubados em incubadora orbital (modelo SI50) a 37°C por 24 horas (bactérias) e por 48 (leveduras). As suspensões bacterianas foram de 1×10^8 UFC / mL em uma solução estéril a 0,85% de NaCl, com a densidade ótica de 0,3 na escala McFarland (absorbância a 540 nm), e para as leveduras a suspensão foi de 1×10^6 UFC/mL (densidade ótica de 0,5 na escala McFarland, absorbância a 640 nm). Ambas suspensões seguidas de diluições seriadas dos inóculos (LÓPEZ et al., 2015).

Análise antimicrobiana em microplacas de 96 poços

A atividade antimicrobiana foi avaliada seguindo o protocolo descrito por Moraes et al. (2011), com modificações. Em cada poço da microplaca foi adicionado 100 µL da amostra a diferentes concentrações (25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 500 µg/mL; 1000 µg/mL; 2500 µg/mL; 5000 µg/mL; 10000 µg/mL; 12500 µg/mL; 15000 µg /mL) e acrescentou-se 100 µL da suspensão do microrganismo. Foram estabelecidos controle positivo (100 µL do meio de cultura + 100 µL da suspensão do microrganismo) e controle negativo (200 µL do meio de cultura). Foi estabelecido controle de DMSO (DMSO com meio inoculado) e controles por antibióticos, anfotericina e gentamicina. As microplacas contendo bactérias foram incubadas a 37° C por 24h e por 48h para leveduras. Depois desse período de crescimento do microrganismo adicionou-se 20 µL da solução de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) em todos os poços e incubou-se por mais 2h (bactérias) e 3h (leveduras) (TSUKATANI et al., 2008). O MIC (Concentração Mínima Inibitória; µg/mL) definiu-se como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (sem crescimento visível). Dos poços onde não se verificou mudança de cor retirou-se uma alíquota de 20 µL, semeou-se em placas de Petri e incubou-se a 37° C por 24h (bactérias), 48h (leveduras) e determinou que contagem inferior ou igual 10 UFC considerou-se como Concentração Mínima Bactericida (MBC, µg/mL).

2.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Posteriormente, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos e de Bartlett para homogeneidade das variâncias. Uma vez atendidas as pressuposições, foram submetidas à análise de variância one-way (ANOVA). Os dados com significância pelo teste F, foi aplicado o teste post hoc Tukey a 5% de probabilidade. A análise discriminante canônica e o teste estatístico multivariado de Lambda de Wilks foi realizado somente para compostos quantificados em todas as amostras. As análises estatísticas foram efetuadas usando o software R (Version 3.4.1) (R Development Core Team, 2017).

3. Resultados e discussão

3.1 Análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A quantificação dos compostos por HPLC foi baseada na área dos picos dos fenólicos identificados em relação às áreas do pico do padrão analítico correspondente. Os resultados da quantificação dos conteúdos de ácidos fenólicos (n=13), flavonoides (n=15) e estilbeno (n=1) nas amostras de própolis vermelha, caule e folha da *D. ecastaphyllum* são apresentados na Tabela 1, tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. Dentre os ácidos fenólicos, seis pertencem a classe dos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido sináptico) e entre as classes dos flavonoides investigados (flavanol, flavanonas, dihidrochalconas e flavonol) sete são flavonóis.

Os compostos kaempferol (variação de $0,28 \pm 0,01$ a $0,77 \pm 0,01$ mg/g), ácido cinâmico (variação de $0,34 \pm 0,01$ a $0,71 \pm 0,05$ mg/g) e naringenina (variação de $0,21 \pm 0,02$ a $0,62 \pm 0,02$ mg/g) foram os mais abundantes nas amostras de própolis. O miricetina ($1,06 \pm 0,01$ a $5,63 \pm 0,15$ mg/g) e o catequina ($1,53 \pm 0,07$ a $6,93 \pm 0,07$ mg/g) foram os compostos majoritários nas amostras de caule. Estes compostos, miricetina ($0,66 \pm 0,01$ a $14,83 \pm 0,00$ mg/g) e catequina ($0,01 \pm 0,00$ a $8,31 \pm 0,73$ mg/g), também foram registrados

em elevadas concentrações nas amostras de folha, seguido da Rutina ($0,01 \pm 0,00$ a $7,21 \pm 0,29$ mg/g). Os compostos químicos analisados foram identificados em todas as amostras, exceto o kaempferol-3-O-glucoside, resveratrol e o ácido siríngico nas amostras de caule.

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos (mg/g) presente em amostras de própolis vermelha.

Compostos (n=29)	Própolis				
	P1	P2	P3	P4	P5
4-hidroxibenzaldeído	$0,03 \pm 0,00$	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	<LOD	$0,03 \pm 0,00$
Ácido 4-hidroxibenzóico	$0,04 \pm 0,00$	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	<LOD	<LOD
Ácido 4-hidroxifenilacético	$0,15 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,01$	<LOD	$0,10 \pm 0,01$
Ácido cafeico	<LOD	<LOD	$0,03 \pm 0,00$	<LOD	<LOD
Ácido cinâmico	$0,34 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,05$
Ácido clorogênico	$0,45 \pm 0,01$	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Ácido ferúlico	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido gálico	$0,16 \pm 0,00$	<LOD	$0,06 \pm 0,00$	<LOD	<LOD
Ácido p-coumárico	$0,04 \pm 0,00$	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	<LOD	<LOD
Ácido protocatecuico	$0,14 \pm 0,00$	<LOD	$0,56 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,00$	<LOD
Ácido sinápico	$0,06 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,01$
Ácido siríngico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido vanílico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Catequina	$0,24 \pm 0,00$	<LOD	$0,07 \pm 0,00$	<LOD	<LOD
Epicatequina	<LOD	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	<LOD	$0,06 \pm 0,00$
Floridzina	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD
Kaempferol	$0,28 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$
Kaempferol-3-O-glucoside	$0,04 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$
Kaempferol-3-O-rutinoside	$0,30 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,00$	$0,45 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,03$
Miricetina	$0,16 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,00$
Narigenina	$0,21 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$
Naringina	$0,06 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$
Phloretin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pinocembrina	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$
Quercetina	$0,09 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,00$
Quercetina-3-O-glucopyranoside	$0,06 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$
Resveratrol	<LOD	$0,04 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
Rutina	$0,04 \pm 0,00$	<LOD	$0,05 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$
Tiliroside	-	$0,06 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$

Resultados apresentados em média \pm desvio padrão; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Tabela 2. Conteúdo de compostos fenólicos (mg/g) presente em amostras de caule da *Dalbergia ecastaphyllum*.

Compostos (n=29)	Caule				
	C1	C2	C3	C4	C5
4-hidroxibenzaldeído	<LOQ	0,07 ± 0,01	<LOQ	0,05 ± 0,00	<LOQ
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Ácido 4-hidroxifenilacético	1,00 ± 0,08	0,31 ± 0,01	0,64 ± 0,01	1,79 ± 0,08	1,75 ± 0,08
Ácido cafeico	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Ácido cinâmico	0,59 ± 0,05	0,66 ± 0,05	0,83 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,90 ± 0,05
Ácido clorogênico	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Ácido ferúlico	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,12 ± 0,01	<LOQ
Ácido gálico	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,07 ± 0,0
Ácido p-coumárico	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Ácido protocatecuico	0,40 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,34 ± 0,00	0,51 ± 0,03	0,24 ± 0,00
Ácido sinápico	0,30 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Ácido siríngico	-	-	-	-	-
Ácido vanílico	0,35 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,21 ± 0,00	0,40 ± 0,03	0,21 ± 0,00
Catequina	2,89 ± 0,07	6,93 ± 0,07	1,53 ± 0,07	3,97 ± 0,07	2,21 ± 0,07
Epicatequina	0,12 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Floridzina	1,64 ± 0,02	2,79 ± 0,22	0,32 ± 0,02	1,31 ± 0,02	0,78 ± 0,02
Kaempferol	0,38 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,94 ± 0,01
Kaempferol-3-O-glucoside	-	-	-	-	-
Kaempferol-3-O-rutinoside	0,97 ± 0,03	1,93 ± 0,03	0,32 ± 0,00	1,35 ± 0,03	0,38 ± 0,03
Miricetina	3,22 ± 0,15	5,63 ± 0,15	1,06 ± 0,01	4,07 ± 0,15	1,64 ± 0,15
Narigenina	0,56 ± 0,02	1,08 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,92 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Naringina	0,76 ± 0,03	1,31 ± 0,03	0,30 ± 0,03	1,17 ± 0,03	0,43 ± 0,03
Phloretin	0,05 ± 0,00	0,17 ± 0,01	<LOD	0,19 ± 0,01	<LOD
Pinocembrina	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	<LOQ	<LOQ	0,10 ± 0,00
Quercetina	0,26 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,08 ± 0,00
Quercetina-3-O-glucopyranoside	0,29 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,59 ± 0,02	0,16 ± 0,00
Resveratrol	-	-	-	-	-
Rutina	0,20 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,50 ± 0,03	1,62 ± 0,03	0,05 ± 0,00
Tiliroside	<LOQ	0,17 ± 0,00	<LOQ	0,23 ± 0,22	<LOQ

Resultados apresentados em média ± desvio padrão; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Tabela 3. Conteúdo de compostos fenólicos (mg/g) presente em amostras de folha da *Dalbergia ecastaphyllum*.

Compostos (n=29)	Folha				
	F1	F1	F3	F4	F5
4-hidroxibenzaldeído	<LOD	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Ácido 4-hidroxibenzóico	<LOD	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Ácido 4-hidroxifenilacético	<LOD	0,01 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,14 ± 0,01
Ácido cafeico	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Ácido cinâmico	0,45 ± 0,01	0,63 ± 0,05	0,06 ± 0,00	1,10 ± 0,05	0,69 ± 0,05
Ácido clorogênico	0,51 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,54 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,16 ± 0,00
Ácido ferúlico	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Ácido gálico	0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Ácido p-coumárico	<LOD	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Ácido protocatecuico	0,17 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,21 ± 0,00
Ácido sinápico	0,15 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Ácido siríngico	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ácido vanílico	0,43 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,69 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,29 ± 0,03
Catequina	6,30 ± 0,07	0,01 ± 0,00	8,31 ± 0,73	7,84 ± 0,73	0,14 ± 0,01
Epicatequina	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,0	0,16 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Floridzina	0,95 ± 0,02	0,17 ± 0,00	2,19 ± 0,22	1,36 ± 0,02	0,86 ± 0,02
Kaempferol	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Kaempferol-3-O-glucoside	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,99 ± 0,03
Kaempferol-3-O-rutinoside	0,26 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,52 ± 0,03	1,58 ± 0,03	0,02 ± 0,00
Miricetina	8,58 ± 0,15	0,66 ± 0,01	14,83 ± 0,00	6,67 ± 0,15	4,48 ± 0,15
Narigenina	0,96 ± 0,02	0,08 ± 0,00	1,68 ± 0,16	0,11 ± 0,00	0,86 ± 0,02
Naringina	0,32 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,27 ± 0,00
Phloretin	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,01
Pinocembrina	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Quercetina	0,51 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Quercetina-3-O-glucopyranoside	0,72 ± 0,02	0,06 ± 0,00	1,29 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Resveratrol	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Rutina	2,95 ± 0,29	0,10 ± 0,00	7,21 ± 0,29	2,68 ± 0,03	1,13 ± 0,03
Tiliroside	0,09 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,10 ± 0,00

Resultados apresentados em média ± desvio padrão; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Os principais fenólicos encontrados nas amostras analisadas pertencem a classe dos flavonóis. Estes são acumulados nas plantas, principalmente, devido à suas funções de tolerância à extremas condições de estresse, como exposição à radiação UV, seca, frio e até congelamento (POPOVA; HINCHA, 2016). Na própolis vermelha, compostos dessa classe de flavonoides são

frequentemente relatados e associados a ações biológicas (FREIRE et al., 2016; RUFATTO et al., 2017).

O kaempferol também foi identificado por Almeida et al. (2017) em amostras de própolis vermelha e Andrade et al. (2017) obteve concentração ($0,59 \pm 0,00$ mg/g) semelhante ao deste estudo. Tsai et al. (2018), a partir de lesão hepática aguda induzida por propacetamol em camundongos verificaram que o kaempferol protege o fígado contra lesão funcionando como agentes anti-oxidantes, anti-inflamatórios e atividades anti-apoptóticas. Os compostos miricetina, quercetina, fisetina e kaempferol, flavonoides presentes em própolis, tem sido estudado como quimiopreventivos contra cancros (ZABAIYOU et al., 2017). A literatura também informa que os derivados do ácido cinâmico da própolis revelou atividade antioxidantes e anti-cancerígenas, sendo sugerido a ingestão suplementar destes na prevenção do câncer (KUMAZAKI et al., 2014).

O miricetina é normalmente encontrado em espécies de plantas do gênero *Myrcia* (SALDANHA et al., 2013) e ao que se sabe foi a primeira vez quantificado em *D. ecastaphyllum*. Além da indicação quimiopreventiva supracitada, este flavonol tem potencialidade antioxidante e dependendo da sua concentração e das condições ambientais podem desempenhar função inversa e atuar com um pró-oxidante (DE-MELO et al., 2018). A catequina apresentou atividade antioxidante promissora quanto comparado a outros fenólicos e a substâncias sintéticas e devido a sua versatilidade para esta propriedade, Grzesik et al. (2018) elucida seu uso em formulações de nanopartículas em terapias. Diante do exposto, a identificação desses flavonóides aponta as possibilidades biológicas da própolis e do caule e folha da *D. ecastaphyllum* adquiridas ao sul do Estado da Bahia, Brasil.

Nas plantas, comumente são encontrados diferentes açúcares como rutinose, glicose e galactose ligados ao kaempferol para produzir glicoconjugados como kaempferol-3-O-glucoside (DEVI et al., 2015). No entanto, este estudo nos revela uma informação interessante, visto que o kaempferol-3-O-glucoside, foi encontrado na folha e na própolis e ausente no caule. Comportamento semelhante observado para o resveratrol (estilbeno), levando a inferir que provavelmente, estes compostos foram assimilados pelas abelhas nos exsudatos das folhas para compor a complexa mistura química que é a própolis. Este estudo demonstra uma visão mais holística frente as

possíveis fontes exploradas pelas abelhas revelando resultados preliminares interessantes na caracterização química desse produto apícola.

Com base na literatura revisada, esta foi a primeira vez que o resveratrol foi identificado na própolis vermelha brasileira. Wang et al. (2014) registrou o resveratrol, tanto na própolis chinesa, como na *Populus* sp. Szkudelski e Szkudelska (2018), em estudo com animais tratados com álcool induzindo distúrbios metabólicos e danos no fígado verificaram que o estilbeno resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) reduziu efetivamente o acúmulo de lipídios no fígado, apresentando ação hepatoprotetora associando esse efeito à sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória. Os autores relatam que este composto pode reduzir danos causados pela ingestão excessiva do álcool, no entanto testes clínicos devem ser realizados com seres humanos. Este estilbeno é um dos principais compostos da uva e seus derivados, a exemplo do vinho, e tem revelado propriedade cardioprotetora, quimiopreventiva do câncer e neuroprotetora (FABJANOWICZ; PŁOTKA-WYSYŁKA; NAMIEŚNIK, 2018).

Daugusch et al. (2008) também detectaram a rutina, quercetina e pinocembrina, Piccinelli et al. (2011), o narigenina em própolis vermelha e resinas da *D. ecastaphyllum*. Andrade et al. (2017) e Andrade et al. (2018) quantificaram 9 compostos (ácido clorogênico, ácido gálico, ácido p-coumárico, ácido protocatéquico, kaempferol, narigenina, pinocembrina, quercetina e rutina) em extratos e própolis encapsulada. Outros estudos com própolis (Almeida et al., 2017; Mendonça-Melo et al., 2017; Regueira-Neto et al., 2017; Nascimento et al., 2018) encontraram pelo menos um dos padrões averiguados por esta pesquisa.

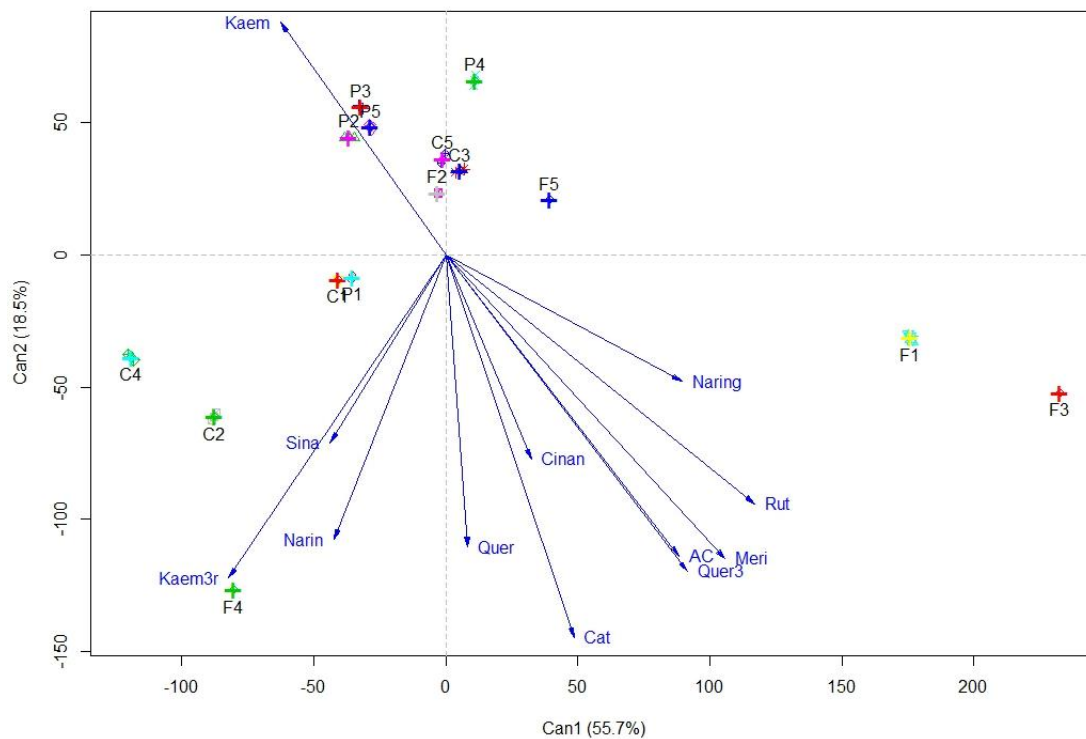
Mendonça-Melo et al. (2017), Piccinelli et al. (2011), Silva et al. (2008) e Daugusch et al. (2008) em estudos comparativos do perfil químico da própolis vermelha brasileira com a resina proveniente do caule da *D. ecastaphyllum* verificaram uma similaridade química propondo que essa espécie botânica é a principal fonte de recursos resinífero da própolis de coloração avermelhada. Este estudo corrobora aos supracitados, ao verificar que todos os compostos quantificados na própolis também foram registrados no caule e/ou na folha da *D. ecastaphyllum* diferindo-os quanto as concentrações, e demonstrando uma similaridade polifenólica. No entanto, López et al. (2014), analisando própolis de coloração vermelha de diferentes regiões do Brasil, identificaram que os

principais compostos na *D. ecastaphyllum* não estavam presentes no produto apícola. Essa divergência não está relacionada a coloração da própolis, mas sim a composição química que está diretamente associada às espécies botânicas no entorno na colmeia, condições climáticas e variações sazonais (PICCINELLI et al., 2011).

Como relatado por Regueira-Neto et al. (2017), a maioria dos compostos identificados em própolis vermelha brasileira foram provenientes de amostras do Estado de Alagoas e Sergipe, sendo que os demais, a exemplo da Bahia, também região produtora desse tipo de própolis, ainda foi pouco caracterizada. Este estudo é importante para a discussão do perfil químico da própolis vermelha brasileira, a qual tem demonstrado não ser exclusiva de um Estado na região Nordeste do Brasil.

Ao analisar o efeito do conjunto das variáveis por meio da análise discriminante canônica e do teste estatístico multivariado de Lambda de Wilks, verificou-se que existe diferença significativa entre amostras ($p < 0,05$), e o primeiro componente canônico (dimensão 1) explica 55,7% do fenômeno biológico. O efeito do conjunto das variáveis permitiu identificar diferenças significativas entre as amostras, e demonstrou que entre os compostos comuns às amostras, o Kaempferol por apresentar maior valor na própolis, influenciou tanto no discriminante 1 como no discriminante 2, na separação dessas amostras. As amostras de caule e folha apresentaram uma grande variabilidade na quantidade dos compostos, sendo as amostras F1 e F3 mais parecidas devido à influência dos compostos narigenina, rutina, miricetina, ácido clorídrico, quercetina 3-O-glucopyranoide, ácido cinâmico, catequina e quercetina. Observando o discriminante canônico 1 as amostras de caule estão mais relacionadas às amostras de própolis, o que provavelmente, é a fonte dos flavonoides, kaempferol, kaempferol 3-O-rutinoside, narigenina e do ácido sinápico (Figura 1).

Figura 1. *Biplot* de discriminante canônica dos compostos fenólicos quantificados tanto nas amostras de caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum* e na própolis vermelha produzida no sul da Bahia, Brasil, 2015.



Can1 = discriminante canônico 1; Can2 = discriminante canônico 2; Kaem=kaempferol; kaem3r=kaempferol 3-o-rutiniside; sina=Ácido sinápico; narin=narigin; quer=quercetina; cat=catequina; cinan=ácido cinâmico; quer3=quercetina 3-O-glucopyranoside; AC=ácido clorídrico; meri=miricetina; rut=rutina; naring=narigenina. P1-P5 = própolis; C1-C5 = caule; F1-F5 = folha.

3.2 Determinação dos fenólicos totais e atividade antioxidante

As amostras de própolis vermelha, caule e folha da *D. ecastaphyllum* apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para compostos fenólicos totais (Tabela 4). Os teores de fenóis totais foram estatisticamente superiores nas amostras de folhas (variação de $612,86 \pm 2,05$ a $735 \pm 11,72$ mg EAG/g), seguidas dos caules (variação de 467 a 389 mg EAG/g) e da própolis (variação de 384,61 a 166,3 mg EAG/g). Globalmente, a própolis apresentou maior (84,97 mg EQ/g) teor de flavonóides totais diferindo ($p < 0,05$) da folha (47,51 mg EQ/g) e do caule (12,96 mg EQ/g).

Os teores de fenóis totais para as folhas da *D. ecastaphyllum* encontrados neste estudo, foram mais elevados aos relatados por Lianhe et al. (2012) e Chaitra et al. (2015) para outras espécies do gênero *Dalbergia* e por Andrade et al. (2017) e Nascimento et al. (2018) para própolis vermelha. Os

compostos fenólicos são oriundos principalmente, das plantas e a maior concentração nas folhas possivelmente estar relacionado à função fisiológica desses compostos na proteção UV dos tecidos fotossintéticos que estão expostos à intensa radiação (MOSADEGH et al., 2018).

Tabela 4. Valores obtidos para os compostos fenólicos e atividades antioxidante das amostras de caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum* e da própolis vermelha.

Amostras	Fen. (mg EAG/g)	Flav. (mg EQ/g)	DPPH (µg/mL)	β-carot./A.L. (%)
Própolis				
P1	166,30 ± 5,17 ⁱ	53,02 ± 0,23 ^f	246,33 ± 5,51 ^c	60,09 ± 0,45 ^{g,h}
P2	255,82 ± 5,43 ^{g,h}	100,15 ± 1,60 ^b	165,00 ± 5,00 ^{e,f}	75,41 ± 1,14 ^a
P3	384,61 ± 1,78 ^f	57,50 ± 0,79 ^d	173,00 ± 6,08 ^{d,e}	64,83 ± 0,03 ^{d,e,f}
P4	242,55 ± 9,62 ^{h,i}	141,58 ± 6,02 ^a	67,00 ± 3,00 ^f	67,69 ± 0,02 ^{b,c,d}
P5	372,96 ± 3,70 ^g	72,59 ± 0,45 ^c	11,50 ± 1,50 ⁱ	69,93 ± 0,10 ^b
Média	284,45 ^C	84,97 ^A	132,57 ^B	67,59 ^A
Caule				
C1	467,14 ± 4,27 ^d	11,42 ± 0,26 ^m	420,00 ± 9,50 ^{a,b}	45,59 ± 2,28 ⁱ
C2	460,55 ± 11,10 ^d	13,15 ± 0,60 ^k	380,00 ± 10,00 ^b	57,73 ± 1,00 ^h
C3	404,99 ± 6,06 ^e	16,10 ± 0,73 ^j	479,00 ± 11,53 ^a	62,63 ± 1,94 ^{f,g}
C4	483,18 ± 8,64 ^c	11,66 ± 0,22 ^m	221,33 ± 2,31 ^d	68,70 ± 1,70 ^{b,c}
C5	389,31 ± 7,08 ^f	12,49 ± 0,13 ^l	255,00 ± 11,55 ^c	68,67 ± 0,74 ^{b,c}
Média	441,03 ^B	12,96 ^C	351,07 ^A	60,95 ^B
Folha				
F1	677,83 ± 11,50 ^b	56,77 ± 0,28 ^d	30,66 ± 1,15 ^h	68,23 ± 0,95 ^{b,c}
F2	729,19 ± 7,18 ^a	34,96 ± 0,75 ⁱ	30,66 ± 1,15 ^h	77,50 ± 0,58 ^a
F3	735,33 ± 11,72 ^a	55,54 ± 1,00 ^e	34,66 ± 4,62 ^g	63,68 ± 1,21 ^{e,f}
F4	733,98 ± 10,99 ^a	48,42 ± 0,45 ^g	31,33 ± 1,15 ^{g,h}	76,07 ± 0,78 ^a
F5	612,86 ± 2,05 ^c	41,88 ± 0,37 ^h	34,66 ± 4,62 ^g	66,33 ± 0,85 ^{c,d,e}
Média	697,84 ^A	47,51 ^B	32,4 ^C	70,26 ^A

EAG = equivalente de ácido gálico; EQ = equivalente de quercetina; Fen. = Fenóis totais; Flav. = flavonóides totais; DPPH = 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; β-carot./A.L.= branqueamento do β-caroteno/ácido linoleico. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha e letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna diferem estatisticamente (p <0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

A própolis é um produto formado por acúmulos de exsudatos recolhidos pelas abelhas em uma e/ou várias plantas e em diferentes partes (caule, folha, botão floral) do vegetal (SALATINO et al., 2011) o que pode ter proporcionado a alta quantificação dos flavonóides neste produto devido a diferentes misturas polifenólicas. Nos últimos anos, pesquisas com flavonóides têm confirmado a sua ampla atuação benéfica a saúde humana (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA,

2018), e apesar dos vegetais serem fonte primária de flavonóides, o resultado deste estudo corrobora para inferir que a própolis vermelha é um produto rico em flavonóides e segundo Rufatto et al. (2017) é promissor em diferentes ações farmacológicas.

Quanto aos ensaios antioxidantes com radicais DPPH observou-se que a reatividade desse radical com moléculas de hidrogênio disponibilizadas pelos extratos metanólicos da folha foram estatisticamente mais eficazes no sequestro do DPPH (valor médio EC50 = 32,40 µg/mL), seguida dos extratos de própolis (valor médio EC50 = 132,57 µg/mL) e dos extratos de caule (valor médio EC50 = 352,07 µg/mL). Ao analisar todas as amostras em estudo verificou-se que a própolis P5 foi a que obteve significativamente ($p < 0,05$) a maior capacidade ($11,50 \pm 1,50$ µg/mL) para o sequestro do radical DPPH, diferindo-a das demais amostras de própolis, de folha e de caule. A própolis (67,59%) e a folha (70,26%) apresentaram maiores porcentagem de inibição da descoloração do β -caroteno e não diferindo estatisticamente em si (Tabela 4).

Os compostos fenólicos são considerados moléculas de alta capacidade antioxidante devido à facilidade de doação de elétrons proveniente do radical hidroxila na estabilização de radicais livres (BITTENCOURT et al., 2015). Esta afirmativa também foi estimada por este estudo, visto que, a folha da *D. ecastaphyllum* obteve maior teor de fenóis totais e maiores concentrações dos compostos miricetina (DE-MELLO et al., 2018), catequina e resveratrol (SKROZA et al., 2015) o que sinergicamente podem ter proporcionado o melhor desempenho nos ensaios antioxidantes.

No entanto, não somente a quantidade total dos fenólicos pode influenciar no efeito antioxidante, mas também a natureza química do composto, a concentração e o efeito sinérgico, talvez seja a justificativa para o resultado elevado da amostra P5 na inibição do radical DPPH. Skroza et al. (2015), verificaram que misturas binárias entre o resveratrol e compostos fenólicos, tais como catequina, ácido gálico e ácido cafeico, apresentaram atividades antioxidantes mais acentuada que substâncias puras. Diante do exposto, pode-se inferir que talvez a própolis seja mais útil na atividade antioxidante devido a sua mistura fenólica, que compostos isolados.

Não foram encontrados estudos anteriores que relatem atividade antioxidante de caule e/ou folha da *D. ecastaphyllum*, e nem estudos com

abordagem comparativa para essa propriedade biológica entre a própolis vermelha e sua provável origem botânica. Mas, para própolis, há um vasto registro na literatura (FREIRE et al., 2016; RUFATTO et al., 2017) da atividade antioxidante, com resultados similares, assim como, demasiadamente discrepantes à dessa investigação. Essa grande variabilidade de resultados reportado pela literatura, assim como nas amostras em estudo, pode estar associado a diversos fatores como, condições edafoclimática, exposição da amostra à radiação UV o que promove a oxidação, armazenamento, métodos de extração e a polaridade do solvente (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

3.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos nos ensaios da microdiluições em microplacas de 96 poços demonstraram que todas as amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados, conforme representado na tabela 5. Globalmente, as amostras de própolis foram mais eficazes na inibição do crescimento microbiano, no efeito bactericida e fungicida, exceto contra ao isolado clínico *Staphylococcus aureus* ESA 321, o qual o caule da *D. ecastaphyllum* apresentou MBC de 2600 µg/mL. As amostras de folha apresentaram valores mais elevados MIC (variando de 1800 a 1433 µg/mL) e MBC (variando de 11000 a 14333 µg/mL) contra as bactérias (*S. aureus* e *Salmonella enteritidis*), no entanto para a ação antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida albicans* ESA 115 apresentaram menor inibição (MIC) que o caule. Os antibióticos, gentamicina (bactericida) e anfotericina (fungicida), testados como controle positivo, foram mais eficazes na inibição dos microrganismos que as amostras de própolis, caule e folha da *D. ecastaphyllum*.

A investigação de produtos naturais com ação bactericida e fungicida tem se tornado uma alternativa para formulação de novos fármacos visto que microrganismos como o *S. aureus* podem ser um patógeno sistêmico (TONG et al., 2015); espécies do gênero *Salmonella*, as quais são agentes zoonóticos de origem alimentar, comumente, associadas a ovos e frangos (SHAH et al., 2017) e espécies do gênero *Candida*, encontrada na mucosa oral e vaginal que causam infecções superficiais e invasivas (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; PÉREZ-

MARTÍN, 2001), tem se tornado resistentes aos antibióticos comerciais o que compromete à saúde humana.

A potencialidade da ação antimicrobiana da própolis vermelha brasileira tem sido relatada por alguns estudos (REGUEIRA-NETO et al., 2017; RUFATTO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018). Mas, o que é de conhecimento, somente a investigação de Bueno-Silva et al. (2016) propõem uma discussão da influência da sazonalidade nesse efeito biológico em amostras de própolis e resina da *D. ecastaphyllum*, não sendo encontrados outras sobre a comparação de estruturas vegetativas (caule e folha) da possível origem botânica que disponibilizam exsudatos que compõe a própolis.

Bueno-Silva et al. (2016) apresentaram respostas semelhantes do MIC e MBC para extratos de própolis e caule em várias amostras ao longo de ano, o que diferem deste estudo em que a própolis teve efeito mais acentuado nos microrganismos testados. Para *S. aureus* ATCC 25923 os autores encontraram valores inferiores (variação: 31,2 a 250 µg/mL) de MIC e MCB aos reportados nos extratos desse trabalho. Guedes et al. (2014) verificou que as folhas da *D. ecastaphyllum* inibiram estirpe de bactéria gram-positiva (*S. aureus*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Neste contexto, o kampferol, composto de maior quantidade nas amostras de própolis deste estudo, em combinação com o resveratrol, também quantificado nessas amostras, inibiram o crescimento de bactéria gram-positiva (VALLE et al., 2016).

Sugere-se que a relevância do efeito inibitório da própolis em relação ao caule e a folha da *D. ecastaphyllum* está diretamente ligada a concentração de compostos químicos, a exemplo do kaempferol ou ao efeito combinatório dos compostos nocivos aos microrganismos testados, bem como a complexidade da matriz química desse produto que se destaca quanto as atividades biológicas.

Tabela 5. Atividade Antimicrobiana de amostras de própolis, caule e folha da *Dalbergia ecastaphyllum*.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300		<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		<i>Staphylococcus aureus</i> ESA 321		<i>Salmonella enteritidis</i> ESA 87		<i>Candida albicans</i> ESA 115	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
Própolis												
P1	300	500	500	500	2500	5000	500	2500	500	5000	2500	10000
P2	500	500	500	5000	500	1000	100	5000	500	5000	500	500
P3	100	500	100	500	2500	2500	100	500	50	500	2500	2500
P4	500	500	500	5000	1000	2500	500	5000	500	5000	1000	2500
P5	50	100	50	100	500	500	100	500	50	100	1000	2500
Média	290	420	330	2220	1400	1400	260	2700	320	3120	1500	3600
Caule												
C1	833	4167	1000	5000	5000	12500	1000	8333	1000	5000	5000	12500
C2	1000	3333	1000	2500	5000	10000	833	1000	1000	2500	5000	12500
C3	833	5000	1000	5000	5000	10000	1500	2500	2500	5000	5000	10000
C4	667	667	667	667	5000	10000	500	667	500	1000	5000	10000
C5	500	500	500	500	2500	5000	500	500	500	1000	2500	10000
Média	767	2733	833	2733	4500	9500	867	2600	1100	2900	4500	11000
Folha												
F1	2500	12500	2000	14167	2500	10000	2000	14167	2500	15000	2500	12500
F2	2500	15000	4167	14167	2500	12500	2500	15000	2000	14167	2500	12500
F3	2500	15000	5000	15000	2500	10000	2500	15000	2500	15000	2500	10000
F4	1000	12500	833	12500	2500	12500	1000	12500	1000	12500	2500	10000
F5	1000	15000	1000	15000	2500	10000	1000	15000	1000	15000	2500	10000
Média	1900	14000	2600	14167	2500	11000	1800	14333	1800	14333	2500	11000

MIC=Concentração Mínima Inibitória; MBC=Concentração Mínima Bactericida; P1-P5 = própolis; C1-C5 = caule; F1-F5 = folha.

4. Conclusões

A própolis vermelha, o caule e a folha da *Dalbergia ecastaphyllum* apresentaram similaridade polifenólica, diferindo ao nível de concentração dos compostos. A esses dados pode-se inferir que a espécie botânica contribui de maneira significativa para composição química do produto apícola.

Todas as amostras analisadas apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana, no entanto a própolis obteve melhores resultados para atividade antimicrobiana, foi estatisticamente semelhante às folhas quanto a atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoléico e no conjunto amostras, a própolis P5 foi significativamente o antioxidante natural mais eficaz na inibição do DPPH.

Apesar da própolis vermelha, o caule e folha da *D. ecastaphyllum* apresentarem matriz química semelhantes, o efeito sinérgico da mistura polifenólica da própolis foi mais acentuado frente a atividade antimicrobiana e destaque para amostra P5, no ensaio antioxidante pelo método DPPH.

Referência

- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal Agriculture Food Chemical**, v.52, n.24, p.7286-7292, 2004.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.278-83, 2007.
- ALMEIDA, E.T.C.; SILVA, M.C.D.; OLIVEIRA, J.M.S.; KAMIYA, R.U.; ARRUDA, R.E.S.; VIEIRA, D.A.; SILVA, V.C. 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.

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, p.129-138, 2017.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.29-32, 2005.

BITTENCOURT, M.L.F.; RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v.76, n.3, p.449-457, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

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, p.440–447, 2017.

BUENO-SILVAA, 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, 2016.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade e antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.3, n.6, p.1523-1527, 2009.

CHAITRA, S.; KUMAR, N.N.; SHALINI, P.; SHARU RAJ, K.M. *In vitro* antioxidant activity of methanolic extracts of *Dalbergia paniculata* Roxb. **International Journal of Pharma Sciences**, v.5, p.938-944, 2015.

DAUGSCH, A.; MORAIS, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red própolis-chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DE-MELO, A.A.M.; ESTEVINHO, L.M.; MOREIRA, M.M.; DELERUE-MATOS, C.; ALEX DA SILVA DE FREITAS, A.S.; BARTH, M.O.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. **Journal of Biochemistry**, p. 1-21, 2018.

DEVI, K.P., MALAR, D.S., NABAVI, S.F., SUREDA, A., XIAO, J., NABAVI, S.M., DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v.99, p.1–10, 2015.

DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; ALVES, R.C.; FERREIRA, I.C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

FABJANOWICZ, M.; PŁOTKA-WYSYŁKA, J.; NAMIEŚNIK, J. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. **Tendências TrAC em Química Analítica**, v.103, p.21-33, 2018.

FALCÃO, S.I.; TOMÁSA, A.; VALE, N.; GOMES, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese própolis. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.805-812, 2013.

FALCÃO, S.I.; VALE, N.; GOMES, P.; DOMINGUES, M.R.M.; FREIRE, C.; CARDOSO, S.M.; VILAS-BOAS, M. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. **Phytochemical Analysis**, v.24, p.309-318, 2013.

FREIRES, R.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.110, p.267-279, 2016.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOS, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, n.15, p. 480-492, 2018.

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

HARBORNE, J.B. **General Procedures and Measurements of Total Pehnolics**. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B Methods in Plant Biochemistry, pp. 1-28. (Eds.) Academic Press, San Diego, CA, 1989.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G.L.; HU, F. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, p.19610-19632, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (**IBGE**). Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>, Acesso em: agosto de 2016.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v.18, n.2, p.2328-2375, 2013.

KUMAZAKI, M.; SHINOHARA, H.; TANIGUCHI, K.; YAMADA, N.; OHTA, S.; ICHIHARA, K.; AKAO, Y. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. **Phytomedicine**, v.21, n.8-9, p.1070–1077, 2014.

LIANHE Z.; XING, H.; LI, W.; ZHENGXING, C. Physicochemical Properties, Chemical composition and antioxidant activity of *Dalbergia odorifera* T. Chen seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.5, p.883–890 89, 2012.

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**, 146, 174-180, 2014.

LÓPEZ, B.G.C., LOURENÇO, C.C., ALVES, D.A., MACHADO, D., LANCELLOTTI, M., e SAWAYA, A.C.H.F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: na alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.3, p.677-687, 2015.

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

MARTÍ, R.; VALCÁRCEL, M.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; ROSELLÓ, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. **Food Chemistry**, v.169, p.169–179, 2015.

MENDONÇA-MELO, L.; MOTA, E.; LOPEZ, B.; SAWAYA, A.; FREITAS, L.; JAIN, S.; BATISTA, M.; ARAÚJO, E. Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.56, n.1, p.1-8, 2017.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEAS, X.; ESTEVINHO, L.M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.5, p.1096-1101, 2011.

MOREIRA; M.M.; BARROSO, M.F.; BOEYKENS, A.; WITHOUCK, H.; MORAIS, S.; DELERUE-MATOS, M.C. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v.104, n.1, p.210-220, 2017.

MOSADEGH, H.; TRIVELLINI, A.; FERRANTE, A.; LUCCHESINI, M.; VERNIERI, P.; MENSUALI, A. Applications of UV-B lighting to enhance phenolic accumulation of sweet basil. **Scientia Horticulturae**, v.229, n.9, p.107-116, 2018.

MUCHUWETI, M.; KATIVU, E.; MUPURE, C. H.; CHIDEWE, C.; NDHLALA, A. R.; BENHURA, M. A.N. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, 2, 414-420, 2007.

NASCIMENTO, T.G.; SILVA, A.S.; CONSTANT, P.B.L.; SILVA, S.A.S.; MOURA, M.A.B.F.; ALMEIDA, C.P.; SILVA, V.C.; WANDERLEY, A.B.; BASÍLIO JÚNIOR, I.D.; ESCODRO, P.B. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some comercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v.57, n.2, p.1-9, 2018.

NEVES, M.V.M.; 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.

PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C.G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.646, p.107–112, 2018.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; 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, p.6484-6491, 2011.

POPOVA, A.V.; HINCHA, D.K. Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying. **Biochim Biophys Acta**, v.1858, n.12, p.3050-3060, 2016.

REGUEIRA-NETO, M.S.; TINTINO, S.R.; SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S., BOLIGON, A.A.; MATIAS, E.F.F.; BALBINO, V.Q.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v.107, p.572-580, 2017.

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

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.; FERNANDES-SILVA,C.C.; ABBUD RIGHI, A.; SALATINO, M.L.F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v.28, p.25-936, 2011.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESIIT- MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v.18, n.12, p.8402–8416, 2013.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; PÉREZ-MARTÍN, J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, n.2, p.214-221, 2011.

SHAH, D.H.; PAUL, N.C.; SISCHO, W.C.; CRESPO, R.; GUARD, J. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Poultry Science**, v.96, n.3, p.687-702, 2017.

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 Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SKROZA, D.; MEKINIĆ, I.; G.; SVILOVIĆ, S.; SIMAT, V.; KATALINIC, C.

Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.38, p.13-18, 2015.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Potential of resveratrol in mitigating metabolic disturbances induced by ethanol. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v.101, p.579-584, 2018.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S.B. Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.97, p.124-138, 2015.

TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; VANCE G. FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.3, p.603-61, 2015.

TSAI, M.S.; WANG, Y.H.; LAI, Y.Y.; TSOU, H.K.; LIOU, G.G.; KO, J.L.; WANG, S.H. Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. **Toxicology Letters**, v.290, n.15, p.97-109, 2018.

TSUKATANI, T.; SUENAGA, H.; HIGUCHI, T.; AKAO, T.; ISHIYAMA, M.; EZOE, K.; MATSUMOTO, K. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.109-116, 2008.

VALLE, P. D.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.G.; ARRIAGA, D.; GONZÁLEZ-DONQUILES, C.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, P.; RÚA, J. Antimicrobial activity of

kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. **Food Control**, v.61, p. 213-220, 2016.

WANG K.; ZHANG, J.; PING, S.; MA, Q.; CHEN, X.; XUAN, H.; SHI, J.; ZHANG, C.; HU, F. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus×canadensis*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.1, p.300-311, 2014.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J.M.A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.207, p.214–222, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região Sul do Estado da Bahia, Brasil abriga diversos ecossistemas que permite o direcionamento na produção de vários produtos das abelhas, tendo como destaques a produção de mel, pólen e própolis. Dentre as cidades dessa região, Canavieiras e Ilhéus, tem se dedicado a produção de pólen e própolis vermelha. A atividade apícola nessa região apresenta uma organização profissional, não vista somente como uma alternativa, mas sim, como a principal fonte de renda de muito dos apicultores.

O pólen apícola é o principal produto que movimenta o comércio apícola na região Sul do Estado da Bahia, no entanto nos últimos anos, com o interesse crescente nos benefícios nutracêuticos promovido pela própolis vermelha brasileira, associada especialmente, à produzida no Estado de Alagoas, e pela *Dalbergia ecastaphyllum* ser a provável origem botânica desse tipo de própolis, os apicultores tem selecionado colmeias para a produção desse tipo de própolis, visto que a espécie botânica (*D. ecastaphyllum*) fonte de resina tem ampla distribuição em todo litoral brasileiro.

A investigação físico-química realizada com o caule e folha da fonte botânica *D. ecastaphyllum* revelaram elevados teores de compostos fenólicos, os quais, miricetina e catequina foram os mais abundantes, e um dado muito interessante foi a quantificação dos ácidos linoléico e ácido linolênico, pertencente a família do ômega, o qual é amplamente relatada como ácidos graxos de caráter preventivo a promoção da saúde.

Os resultados obtidos para a própolis vermelha produzida na Bahia demonstraram qualidade microbiológica e físico-química conforme recomendado pela legislação brasileira. Sua mistura polifenólica propiciou eficácia na ação antioxidante e antimicrobiana, e a identificação do ácido oleico contribuem com os efeitos benéficos promovidos à saúde humana. A presença de flavonóides como formononetina, isoliquiritigenina, biochanina A, medicarpina, daidzeína, vestitol, neovestitol e pinocembrina confere a está própolis perfil químico semelhante a própolis vermelha proveniente do Estado de Alagoas, Sergipe e Paraíba. Diante do exposto, fica evidente que este produto não é exclusivo do Estado de Alagoas, o qual foi definido por limites políticos e não por características físico-química do

produto e fitofisionomia da região. Este estudo sugere que a designação de origem seja reconsiderada, ampliando a área de produção desse tipo de própolis, incluindo o Estado da Bahia.

Com as análises cromatográficas (LC/MS e HPLC) foi possível afirmar que a própolis vermelha produzida no Sul do Estado da Bahia apresentou similaridade polifenólica com o caule e folha da *D. ecastaphyllum*, o que sugere uma relevância dessa na composição química da própolis. Porém, apesar das semelhanças dos perfis químicos, a mistura polifenólica da própolis apresentou efeito antimicrobiano mais eficaz que o caule e folha da *D. ecastaphyllum*, e um destaque entre as amostras para inibição do DPPH no ensaio antioxidante *in vitro*.

Embora a própolis vermelha produzida na região Sul do estado da Bahia ter uma boa aceitação comercial, devido a aspectos como textura, coloração e aroma até o momento, nada se sabia quanto a composição química, sua ação biológica e a origem botânica. Acredita-se que os dados compilados por esse estudo possam agregar valor, visibilidade ao produto apícola, além de incentivar a conservação da *D. ecastaphyllum*, a qual vem sofrendo supressão ao longo dos anos, bem como indicam que estes produtos naturais podem vir a ser testadas como antioxidantes naturais, aditivos alimentares, alimentos funcionais, na indústria farmacêutica e cosmética.

No entanto, novos experimentos visando identificar/quantificar outros compostos fenólicos, fontes resiníferas, correlaciona-los com as atividades biológicas, bem como inserir variáveis como sazonais na coleta das amostras, devem e podem ser realizados.