UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NATIVA DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

DÉBORAH MUNIQUE NOGUEIRA DE SOUSA

MOSSORÓ, RN – BRASIL
JANEIRO – 2014

DÉBORAH MUNIQUE NOGUEIRA DE SOUSA

ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NATIVA DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista

MOSSORÓ, RN – BRASIL
JANEIRO – 2014

O Conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade de seus autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

S963a Sousa, Débora Munique Nogueira de.

Análise química e avaliação das atividades biológicas da geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) nativa do Semiárido nordestino. / Déborah Munique Nogueira de Sousa. -- Mossoró, 2014.
148f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

1. Geoprópolis. 2. Melipona subnitida. 3. Perfil químico. 4. Atividades biológicas. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /007-14 CDD: 595.799

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba
CRB-15/452

DÉBORAH MUNIQUE NOGUEIRA DE SOUSA

ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NATIVA DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM 09/12/2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)

Orientador

Profa. Dra. Olga Maria Duarte Silva (UL)

Primeiro Conselheiro

Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá (UFCG)

Segundo Conselheiro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DÉBORAH MUNIQUE NOGUEIRA DE SOUSA – nasceu no dia 21 de agosto de 1988, no município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte - Brasil. Ingressou no curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em julho de 2006. Durante a graduação participou de projetos de pesquisas relacionadas à área de toxicologia, atuando nos seguintes temas: avaliação da toxicidade, do comportamento e da genotoxicidade de plantas em animais de laboratório. Por um ano cooperou como monitora, com as disciplinas de Controle de Qualidade de Medicamentos e Controle Biológico de Medicamentos. Em julho de 2011 concluiu a graduação, tornando-se bacharel em Farmácia e Bioquímica, e em março de 2012 iniciou o mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) sob orientação do Prof. Dr. Jael Batista. Durante o mestrado desenvolveu pesquisas relacionadas à análise da composição química e avaliação de atividades biológicas da geoprópolis da abelha nativa jandaíra (*Melipona subnitida*); neste mesmo âmbito, estagiou por três meses no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Lisboa – Portugal, sob a orientação das Professoras Dras. Olga Silva e Rita Serrano, afim de aprofundar conhecimentos relativos ao objeto de pesquisa.

Aos meus pais, Hilário e Marlene, e ao meu esposo Marcos Aragão, por acreditarem em mim e me darem todo apoio necessário.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores e orientadores Jael Soares, Olga Silva e Rita Serrano: agradeço por toda dedicação e valiosos ensinamentos.

A Profª. Selene Morais (UECE), pela colaboração nos estágios iniciais da pesquisa.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Ciência Animal, especialmente Prof. Jean Berg e Prof. Iberê Carlos, com os quais sempre pude contar.

A todos os amigos que cooperaram com seus trabalhos e reflexões no desenvolvimento desta pesquisa, especialmente, Clécio, Robério, Geysa, Taciana, Idalécio, Rociene, Wesley, Artemísia, Maryam, Sophia, Nuno, D. Rosário e Dra. Paula.

A minha tia Lucinha e Giomar (Mel Boa Fé), pela doação das amostras de geoprópolis.

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa.

Aos meus pais, Hilário Nogueira de Sousa Filho e Marlene Maria Nogueira de Sousa, os quais eu destaco, pelo amor, carinho e compreensão. Vocês são meus grandes exemplos de vida e determinação.

Ao meu querido esposo, Marcos Aragão Fontoura, pela compreensão e apoio em todos os momentos desta jornada, sempre com muita paciência e amor.

Aos meus irmãos Jordana, Lucas, Rebecca e a pequena Giovana por toda a alegria que me trazem. Amo muito vocês!

Aos meus familiares: avós, tios e primos. Vocês também fazem parte dessa conquista.

Aos irmãos e amigos da igreja, pelas orações a Deus em meu favor.

Enfim, agradeço a Deus pela minha vida e por seu infinito amor. Obrigada Deus porque fui alcançada pela Sua maravilhosa graça, como um Pai me orientas em cada passo que dou.

A todos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa conquista, o meu agradecimento.

"Se as abelhas desaparecerem da face da Terra, ao homem apenas restam quatro anos de vida. Não há abelhas, não há polinização, não há plantas, não há animais, não há homem."

Albert Einstein

ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NATIVA DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

SOUSA, Déborah Munique Nogueira de. **Análise química e avaliação das atividades biológicas da geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) nativa do semi-árido nordestino**. 2013. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN.

RESUMO: Própolis é um material resinoso de coloração e consistência variadas, obtido por abelhas através da coleta de resinas da flora da região, e alteradas pela ação de enzimas contidas em sua saliva. As abelhas nativas da Tribo Meliponini adicionam barro e/ou terra à sua própolis, denominando-a geoprópolis. Nesse estudo, amostras de geoprópolis da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*), obtidas de uma região do semi-árido, foram caracterizadas morfologicamente e quimicamente, através de microscopia óptica e cromatografia de camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de matriz de díodos (LC-UV/DAD), respectivamente; paralelamente quantificou-se os fenóis totais. Além disso, atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* foram investigadas, a saber: atividade antioxidante (através do método DPPH), atividade antibacteriana, através do método de difusão em ágar, atividade cicatrizante, através da indução de feridas cirúrgicas experimentais em ratos Wistar e por fim, realizou-se um ensaio de toxicidade preliminar frente à *Artemia salina* com uma das amostras. As amostras analisadas exibiram características organolépticas semelhantes entre si e mostraram-se ricas em grãos de pólen predominantemente pertencentes à subfamília Mimosoideae. Através da TLC e da LC-UV/DAD, encontrou-se dois perfis químicos, um predominantemente composto por flavonóis e flavonas e o outro rico em taninos e ácidos fenólicos, como o ácido gálico. O teor de fenóis totais variou entre 2,845 ± 0,059 % e 11,291 ± 0,262 %. Uma maior capacidade antioxidante foi conferida pela amostra A6 ($IC_{50\%}$ = 0,084). O extrato sem cera, obtido dessa amostra (ESC6) apresentou baixos efeitos inibitórios contra as quatro estirpes de bactérias testadas. Já no ensaio de cicatrização, o creme de geoprópolis de *Melipona subnitida* 10% diminuiu os sinais de inflamação, estimulou a angiogênese e a produção de colágeno, adiantando o processo de re-epitelização nos animais tratados, entretanto somente no 14º dia pós-operatório houve diferença estatisticamente significativa nas áreas das feridas. A amostra testada frente à *Artemia salina* apresentou valor médio de CL_{50} de 1282,61µg/mL, demonstrando assim, baixa toxicidade. Por fim, pode-se concluir que a geoprópolis da abelha jandaíra obtida na região do semi-árido é uma importante fonte de compostos fenólicos, podendo ser usada na medicina não convencional como agente antioxidante e cicatrizante.

Palavras-chave: geoprópolis, *Melipona subnitida*, perfil químico, atividades biológicas.

ABSTRACT: Propolis is a resinous material of varying color and consistency, obtained by bees through collect of resin flora of the region, and altered by the action of enzymes contained in their saliva. The native bees from the tribe Meliponini add clay and/or land to their propolis, originating geopropolis. In this study, samples of jandaira's geopropolis (*Melipona subnitida*), obtained from a semi-arid region, were characterized morphologically and chemically, by light microscopy and Thin Layer Chromatography (TLC) and Liquid Chromatography with UV/Diode Array Detection (LC-UV/DAD) respectively; parallel to this was quantified total phenols content. In addition, biological activities were investigated *in vitro* and *in vivo*, such as antioxidant activity (by DPPH), antibacterial activity (by agar diffusion method), healing activity, through the induction of experimental surgical wounds in rats and finally, a preliminary toxicity test on *Artemia salina* with a sample was performad. The samples exhibited organoleptic characteristics similar to each other and were rich in pollen grains predominantly belonging to the subfamily Mimosoideae. By TLC and LC-UV/DAD, two chemical profiles was demonstrated, one predominantly composed of flavonols and flavones and the other rich in tannins and phenolic acids, such as gallic acid. The total phenolic content varied between 2.845 ± 0.059 % and 11.291 ± 0.262%. Highest antioxidant capacity was conferred by the sample A6 (IC_{50} = 0.084 %). The extract without wax, obtained from this sample (ESC6) showed bad inhibitory effects against four strains of bacteria. In the assay healing, cream *Melipona subnitida*'s geopropolis 10 % decreased signs of inflammation, stimulated angiogenesis and collagen production, advancing the process of re-epithelialization in the treated animals, however only on the 14th post-operative day was seen difference statistically significant between the areas of wounds of experimental and control groups. The sample tested on *Artemia salina* averaged LC_{50} of 1282.61 mg / mL, demonstrating low toxicity. Finally, we can conclude that the jandaira's geopropolis, obtained in the semi-arid region, is an important source of phenolic compounds, may be used in non-conventional medicine as an antioxidant and wound healing agent.

Key-words: geopropolis, *Melipona subnitida,* biological activities.

TRABALHO APRESENTADO ONDE CONSTA DADOS DA DISSERTAÇÃO:

- Resumo publicado nos anais do **5th iMed.UL Postgraduate Students Meeting**

Morphological and Chemical Profile and Antioxidant Potential of *Melipona subnitida* Geopropolis

Sousa D[1,2], Malmir M[1], Encarnação S[1], Graça N[1], Batista J[2], Serrano R[1], Silva O[1]

[1]*Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Portugal,* [2]*Department of Animal Sciences, Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Brazil.*

deborah_munique@hotmail.com

Pharmacological Sciences

Introduction: Propolis is a resinous mixture that honey bees collect from the flora of the region and use to protect the hive. In Brazil, *Melipona subnitida*, a bee species popularly known as "Jandaira" is endemic to the northeast caatinga. This species has the peculiarity of adding clay or other earth components to the propolis, forming geopropolis. This study presents results concerning the morphological characterization and the chemical profile, phenol content and antioxidant potential of different geopropolis samples collected in the semi-arid Northeast of Brazil.

Methods: Five different samples were analyzed by means of stereomicroscopy and optical microscopy. Chemical studies were performed in the traditional formulation (TF, 70% hydroethanolic extract). Thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography linked to a diode array detector (LC-UV-DAD) were used. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method using gallic acid as the calibration standard and the antioxidant activity by 2, 2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) test with ascorbic acid as positive control. These parameters were evaluated on the total TF and on treated TF (without wax).

Results: All samples showed a heterogeneous appearance and rigid consistency at room temperature. Abundant pollen grains and some trichomes were identified. The different samples showed a similar floral profile, frequently revealed the presence of various pollen grain forms including tetrads and polyads features in subfamily Mimosaceae. Major compounds were flavonoids and gallic acid tannin derivatives. For the different samples the total phenolic content of TF was between 6.472 ± 0.131 and 2.845 ± 0.059% (m / m) and for the TF without wax 9.439 ± 0.313 and 4.368 ± 0.287% (m / m) of gallic acid equivalent. The samples with wax showed IC_{50} between 0.514 ± 0.02072 and 1.663 ± 0.00095 mg / mL and samples without wax 0.272 ± 0.00013 and 0.946 ± 0.00016 mg / ml.

Conclusion: Morphological, chemical and antioxidant profiles were reported for the first time to this type of geopropolis .The total phenolic content and the antioxidant activity were higher in the samples without wax and the correlation between assays was also more significant (R^2 = 0.86), revealing that the different percentages of wax in the samples directly interfere in the content of total phenolic and antioxidant activity. The obtained results could be useful on the raw material standardization.

This work was supported by grant PEst-OE/SAU/UI4013/2011 and 2012 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Lisbon, Portugal.

LISTA DE SIGLAS

26-L5	Células de carcinoma de cólon murino
3,4-diCQA	3,4-ácido di-cafeoil quínico
A	Apigenina
A (1-7)	Amostra (1-7)
A549	Células de adenocarcinoma pulmonar humano
AKR1C3	Prostaglandina F sintase
AMH	Ágar Mueller Hinton
ATCC	*American type cell culture*
ATP	Adenosina trifosfato
B16-BL6	Linhagem melanoma
BBN	N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina
BHI	*Brain heart infusion*
Bok	Genes relacionados à apoptose
B-on	Biblioteca do Conhecimento Online
BS	β-sitosterol
C	Canferol
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CAPE	Fenetil éster do ácido caféico
CAT	Enzima catalase
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas
CI	Ácido cinâmico
CL	Ácido clorogênico
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
$CL_{50\%}$	Concentração capaz de matar 50% das larvas de *Artemia salina*
CNS	*Staphylococcus* coagulase-negativa
Con A	Concanavalina A
Cry j1	Antígeno de pólen de cedro japonês
CU	Ácido cumárico
Cys-LT	Cisteinil-leucotrienos
DCBEN	2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano
DE	Diâmetro equatorial
DHCA	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico
DMAC	1,1-dimetilalilcafeato
DMBA	9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOAJ	*Directory of Open Access Journals*
DP	Diâmetro polar
DPB	2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
E	Ácido elágico
EC	Extrato com cera
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EG	Etilgalhato
EPP-AF®	Extrato padronizado de própolis
ESC	Extrato sem cera
F	Fridelina
FP9	Farmacopéia Portuguesa 9
G	Ácido gálico
GAE	Equivalente de ácido gálico
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
HeLa	Células de adenocarcinoma cervical
Hek-293	Células normais do epitélio de rins embrionário
Hep-2	Células humanas de carcinoma epidermóide da laringe
HepG2	Células tumorais de hepatócitos
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia
HL-60	Células de leucemia
HR-DIMS	Espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta
HSV-2	Vírus *Herpes simplex* tipo 2
HT-1080	Fibrocarcinoma metastático
IAV	Vírus da influenza A
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1β	Interleucina-1β
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
INFORMS	*Institute for Operations Research and the Management Sciences*
IR	Espectroscopia do infravermelho
L	Luteolina
LC-UV/DAD	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de matriz de díodos
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LLC	Carcinoma de pulmão de Lewis
M	Mericitrina
MAPK	Proteína cinase estimulada por mitógeno
MDA-MB- 435	Melanoma
MIC	Concentração inibitória mínima
MMC	Concentração microbicida mínima
MS	Espectroscopia de massa
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NF-κB	Fator nuclear *kappa* B

NMR	Ressonânica nuclear magnética
O	Ácido oleanólico
PANC-1	Células humanas de câncer pancreático
PDA	Detector de arranjo de díodos
PHCA	Ác. 3-prenil-4-hidroxicinâmico
PLoS	*Public Library of Science*
PV1	Poliovírus tipo 1
Q	Quercetina
QR	Quercetrina
R	Rutina
RCAAP	Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal
Rf	Fator de retenção
RN	Rio Grande do Norte
RNA II	Ácido ribonucléico II
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SF-295	Células de glioblastoma
SMART	Teste para detecção de mutação e recombinação
SOD	Enzima superóxido desmutase
TGF-β1	Fator transformador do crescimento beta
Th1 e Th2	Linfócitos T *helper* 1 e 2
TLC	Cromatografia de Camada Delgada
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
t_R	Tempo de retenção
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UV	Luz ultra-violeta
V	Vitexina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes condições cromatográficas testadas, com indicação do tipo de placa, sistema eluente, revelador e substância de referência..... 71

Tabela 2 – Frequência dos grãos de pólen: PI (Pólen isolado) 3–15%; PA (Pólen acessório) 15–45%; PD (Pólen dominante) > 45%..... 89

Tabela 3 – Extratos produzidos com cada amostra e suas respectivas massas iniciais, rendimentos e % cera..... 92

Tabela 4 – Registro dos resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcóolico de geoprópolis de jandaíra proveniente da comunidade Pedra Branca/RN (ESC6)..... 94

Tabela 5 – Tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção dos sete compostos majoritários encontrados nas amostras de geoprópolis: ESC1, ESC2, ESC3, ESC4 e ESC5. 108

Tabela 6 – Tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção das substâncias de referencia: ácido gálico (G), ácido elágico (E) e quercetina (Q)..... 113

Tabela 7 – Teor de fenóis totais (%) de extratos hidroalcóolicos da geoprópolis de *Melipona subnitida*..... 117

Tabela 8 – Valores de $IC_{50\%}$ das amostras de geoprópolis *M. subnitida* testadas.. 118

Tabela 9 – Halos de inibição (mm) das diferentes soluções do extrato ESC6, através do método de difusão em ágar..... 121

Tabela 10 – Valores de média ± desvio padrão dos achados histológicos dos animais, pertencentes aos grupos controle (GC) e experimental (GE) nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório..... 124

Tabela 11 – Valores de média ± desvio padrão das áreas e grau de contração (%) das feridas em animais..... 125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Extensão do bioma caatinga em verde. Limites do clima semi-árido em vermelho..... 24

Figura 2 – Abelha *Melipona subnitida,* popularmente conhecida por "jandaíra" e endêmica da Caatinga nordestina..... 24

Figura 3 – Amostra de geoprópolis de jandaíra (*Melipona subnitida*) obtida na região do semi-árido norte-riograndense. 25

Figura 4 – Percentagem de publicação por ano ou período, dentre os 179 artigos selecionados para a revisão..... 28

Figura 5 – Distribuição das publicações em relação às espécies de abelhas envolvidas (*Apis mellifera* e abelhas nativas). 29

Figura 6 – Distribuição dos tipos de própolis estudados entre os anos 1995 e 2013 (abril)..... 29

Figura 7 – Mapa indicando a localização do município de Mossoró e do estado do Rio Grande do Norte, Brasil..... 64

Figura 8 – Delineamento experimental, com preparo dos extratos e ensaios aplicados..... 69

Figura 9 – Radical DPPH..... 73

Figura 10 – Leitura dos halos de inibição com auxílio de um paquímetro..... 74

Figura 11 – Delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante... 76

Figura 12 – Atração das larvas de *Artemia salina* pela fonte de luz..... 77

Figura 13 – Amostras A1 (a), A2 (b), A3 (c), A4 (d) e A5 (e)..... 79

Figura 14 – Detalhes das amostras A1 (a, b), A2 (c, d), A3 (e, f), A4 (g, h) e A5 (i, j, k, l)..... 81

Figura 15 – Grãos de pólen encontrados em amostras de geoprópolis de Melipona subnitida. Grãos de pólen das Famílias: Leguminosa Mimosoideae (a, c – vista equatorial e b – vista lateral), Onagraceae (d), Ulmaceae (e – superfície, foco baixo e f – superfície foco alto), Euphorbiaceae (g), Combretaceae (h), tipo polínico Borreria verticillata (i), Malvaceae (j), Smilaceae (k), Myrtaceae (l), Meliaceae (m) e Poaceae (n)..... 84

Figura 16 – Grãos de pólen encontrados em amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* coletada na zona rural de Mossoró/RN (Brasil). Famílias: Dilleniaceae (a, b), Arecaceae (c, d, g – superfície foco alto, h – superfície foco

baixo), Lamiaceae (superfície, foco alto – e; foco baixo – f)..... 86

Figura 17 – Outras estruturas encontradas nas amostras de geopópolis de *Melipona subnitida.* Cristais de oxalato (a) e tricoma (b) encontrados em A1. Tricomas encontrados em A2 (c, d, e). Pequeno tricoma (f) em A3. Materiais orgânicos encontrados em A4 (g e h). Vaso (i) e conjunto de pequenos tricomas (j) encontrados em A5..... 87

Figura 18 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 1: placa sílica gel F254, sistema acetato de etila/ácido fórmico/água (60:10:10) e revelador NEU. Substância de referência utilizada: quercetina (Q). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A) e B)**..... 95

Figura 19 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 1: placa sílica gel F254, sistema acetato de etila/ácido fórmico/água (60:10:10) e revelador Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: β-sitosterol (BS). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 96

Figura 20 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 2: placa celulose alumínio, sistema ácido acético 6% e revelador *Fast blue salt*. Substâncias de referência utilizadas: ácido gálico (G) e ácido elágico (E). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 97

Figura 21 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 2: placa celulose alumínio, sistema: ácido acético 6% e revelador vanílica clorídrica. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (CL). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 98

Figura 22 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 3– placa celulose alumínio, sistema: ácido acético 45% e revelador Dragendorff. Substância de referência utilizada: rutina (R). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 99

Figura 23 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 3: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45% e revelador NEU. Substância de referência utilizada: canferol (C). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 100

Figura 24 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 4: placa sílica RP (fase reversa), sistema eluente metanol/água (80:20) e revelador NEU. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (C). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm.. 101

Figura 25 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 4: placa sílica RP (fase reversa), sistema eluente metanol/água (80:20) e revelador

Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (CL). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 102

Figura 26 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa sílica gel F254, sistema eluente tolueno/acetato etila (90:10) e revelador anisaldeído. Substâncias de referência utilizadas: ácido oleanólico (O) e β-sitosterol (BS). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 103

Figura 27 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa sílica gel F254, sistema eluente tolueno/acetato etila (90:10) e revelador Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: fridelina (F). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 104

Figura 28 – Comparação entre os extratos com cera (EC) e os extratos sem cera (ESC) das amostras A1 e A2. Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45%, revelador NEU. **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 105

Figura 29 – Investigação de compostos por TLC. Comparação entre os extratos com cera (EC) e os extratos sem cera (ESC) das amostras A1 e A2. Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45%, revelador NEU. **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm..... 106

Figura 30 – Perfil químico do extrato ESC1 – cromatograma *maxplot*..... 108

Figura 31– Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC1..... 109

Figura 32 – Perfil químico do extrato ESC2 – cromatograma *maxplot*..... 109

Figura 33 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC2..... 109

Figura 34 – Perfil químico do extrato ESC3 – cromatograma *maxplot*..... 110

Figura 35 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC3..... 110

Figura 36 – Perfil químico do extrato ESC4 – cromatograma *maxplot*..... 110

Figura 37 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC4..... 111

Figura 38 – Perfil químico do extrato ESC5 – cromatograma *maxplot*..... 111

Figura 39 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC5..... 111

Figura 40 – Estrutura básica dos flavonóides. As diversas classes de flavonóides variam de acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado (anel C)..... 112

Figuras 41 – Perfil químico do extrato ESC6 e espectros de absorvência de 3 dos seus constituintes (G, 8 e 9) 113

Figuras 42 – Cromatograma e espectro de absorvância do ácido gálico (G)..... 114

Figuras 43 – Cromatograma e espectro de absorvância do ácido elágico (E)..... 114

Figuras 44 – Cromatograma e espectro de absorvância da quercetina (Q)..... 115

Figura 45 – Reta de calibração do ácido gálico..... 116

Figura 46 – Reta de calibração do ácido ascórbico..... 119

Figura 47 – Correlação entre $IC_{50\%}$ e teor de compostos fenólicos (%) nos extratos sem cera (ESC). 120

Figura 48 – Branqueamento da solução de DPPH por várias concentrações testadas dos extratos de geoprópolis..... 121

Figura 49 – Aspecto macroscópico de feridas cutâneas em ratos Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 3º dia pós-cirúrgico..... 123

Figura 50 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se acentuada diferença no infiltrado inflamatório (I) de polimorfonucleares entre os grupos GE (A) e GC (B). Área correspondente à crosta espessa (C) e tecido de granulação (G). Obj. 20x. Barra de escala = 200μm..... 123

Figura 51 – Aspecto macroscópico de ferida cutânea em rato Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 7º dia pós-cirúrgico..... 125

Figura 52 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se área correspondente à crosta (C), coágulos (S) e tecido de granulação (G). Camada basocelular (seta). Obj. 5x. Barra de escala = 500μm..... 125

Figura 53 – Intensa angiogênese no GE – grupo experimental – no 7º dia pós-cirúrgico..... 126

Figura 54 – Aspecto macroscópico de ferida cutânea em rato Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 14º dia pós-cirúrgico..... 127

Figura 55 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução

pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se área correspondente à epiderme regenerada (E) e fibroblastos e fibras colágenas (F). Obj. 20x. Barra de escala = 200μm 127

Figura 56 – Crista de cicatrização observada no GE – grupo experimental – no 14º dia pós-operatório..... 128

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Lista das pesquisas sobre as ativ. antioxidante, antibacteriana e cicatrizante da própolis brasileira..... 46

Quadro 2 – Lista das pesquisas sobre as ativ. antioxidante, antibacteriana e cicatrizante da próp. brasileira (cont.)..... 47

Quadro 3 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira..... 58

Quadro 4 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.) 59

Quadro 5 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.)..... 60

Quadro 6 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.)..... 61

Quadro 7 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.)..... 62

SUMÁRIO

PÁGINA

1 INTRODUÇÃO 23
2 OBJETIVOS 26
2.1 OBJETIVO GERAL 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3 REVISÃO DE LITERATURA 27
3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO 27
3.1.1 Estratégia de busca 27
3.1.2 Critérios de inclusão 27
3.1.3 Seleção e análise dos estudos 27
3.2 GEOPRÓPOLIS 30
3.2.1 Abelha jandaíra 31
3.2.2 Principais espécies botânicas envolvidas 32
3.2.3 Composição química 34
3.2.4 Atividades biológicas 38
3.2.4.1 Atividade antioxidante 38
3.2.4.2 Atividade antibacteriana 40
3.2.4.3 Atividade cicatrizante 43
3.2.4.4 Outras atividades biológicas 48
3.2.4.4.1 Imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica 48
3.2.4.4.2 Antialérgica 49
3.2.4.4.3 Antitumoral, citotóxica e antiproliferativa 50
3.2.4.4.4 Quimiopreventiva 52
3.2.4.4.5 Antigenotóxica e genotóxica 52
3.2.4.4.6 Antiaterogênica 53
3.2.4.4.7 Antiangiogênica 53
3.2.4.4.8 Anti-hipertensiva 54
3.2.4.4.9 Tratamento diabetes 55
3.2.4.4.10 Antiulcerosa e Anti-Helicobacter pylori 55
3.2.4.4.11 Hepatoprotetora 55
3.2.4.4.12 Neuroprotetora 56
3.2.4.4.13 Laxativa 56
3.2.4.4.14 Antiparasitária 56
3.2.4.4.15 Antifúngica 57
3.2.4.4.16 Antiviral 57
3.2.4.4.17 Aprimoramento de tratamento odontológico 57
3.2.5 Estudos de avaliação da segurança 63

4 MATERIAL E MÉTODOS 64
4.1 MATERIAL 64
4.1.1 Obtenção das amostras 64
4.1.2 Formulação do creme de geoprópolis 65
4.1.3 Animais 65
4.1.4 Substâncias de referência, solventes e reagentes 65
4.2 MÉTODOS 66

4.2.1 Caracterização morfológica de amostras de geoprópolis por microscopia óptica..... 66
4.2.2 Análise química..... 67
4.2.2.1 Obtenção do extrato etanólico de geoprópolis..... 67
4.2.2.1.1 Amostras coletadas no assentamento Boa Fé/RN (A1-A5)..... 67
4.2.2.1.2 Amostra coletada na comunidade Pedra Branca/RN (A6)..... 68
4.2.2.1.3 Amostra coletada na zona metropolitana de Mossoró/RN (A7) 68
4.2.2.2 Caracterização fitoquímica preliminar por reação em tubo..... 69
4.2.2.3 Estabelecimento do perfil químico por Cromatografia de Camada Delgada (TLC) 70
4.2.2.4 Caracterização das amostras de geoprópolis de jandaíra (LC/UV-DAD) 71
4.2.2.5 Quantificação dos fenóis totais..... 72
4.2.3 Atividades biológicas..... 72
4.2.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*..... 72
4.2.3.2 Atividade antibacteriana *in vitro*..... 73
4.2.3.3.Atividade cicatrizante *in vivo*..... 74
4.2.4. Ensaio toxicológico preliminar *in vitro*..... 76

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 78
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA..... 78
5.1.1 Análise macroscópica..... 78
5.1.2 Análise com o auxílio do microscópio estereoscópico Olympus SZ61..... 78
5.1.3 Análise microscópica..... 82
5.1.3.1 Análise qualitativa..... 82
5.1.3.2 Análise quantitativa..... 89
5.2 ANÁLISE QUÍMICA..... 91
5.2.1 Obtenção do extrato etanólico de geoprópolis..... 91
5.2.2 Caracterização fitoquímica preliminar por reação em tubo..... 93
5.2.3 Caracterização química por Cromatografia de Camada Delgada (TLC). 94
5.2.3.1 Comparação entre EC e ESC..... 104
5.2.3.2 Tentativa de investigação de compostos por TLC..... 105
5.2.4 Caracterização das amostras de geoprópolis por LC/UV-DAD..... 107
5.2.5 Quantificação dos fenóis totais..... 116
5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 118
5.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*..... 118
5.3.2 Atividade antibacteriana *in vitro*..... 121
5.3.3 Atividade cicatrizante *in vivo*..... 122
5.4 ENSAIO TOXICOLÓGICO PRELIMINAR *IN VITRO*..... 130

6 CONCLUSÕES..... 131

REFERÊNCIAS..... 133

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a biodiversidade é vasta, sendo considerada uma das maiores do planeta (BRASIL, 1998). Nesse contexto, destaca-se a Caatinga, que é um bioma exclusivo do território brasileiro, principalmente da região Nordeste (Figura 1). A busca, na biodiversidade, inclusive na Caatinga, por recursos que contenham compostos bioativos com potencial atividade terapêutica tem sido alvo de estudos há bastante tempo. Apesar dessas investigações focarem especialmente em espécies vegetais, outros produtos naturais, como a própolis, têm sido alvo de interesse (BASTOS et al., 2011).

A própolis é utilizada por diferentes civilizações desde 300 a.C na medicina popular (GHISALBERTI, 1979; apud BANSKOTA et al., 1998) e mais recentemente, no comércio, vários produtos contendo própolis são vendidos, incluindo sabonetes e cremes dentais (SALATINO et al., 2011). Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, em brotos, flores e exsudatos de plantas, os quais são alterados por secreções salivares destes insetos e acrescentados de cera e pólen para elaboração do produto final (BRASIL, 2001). A composição química é mais diversa nas própolis obtidas de regiões tropicais, que nas de climas temperados, refletindo a variedade vegetal desses locais (FABRIS et al., 2013). Concernente à própolis, múltiplas atividades farmacológicas foram comprovadas: antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, entre outras (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011; SFORCIN e BANKOVA, 2011; TAKEMURA et al., 2011; CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012). Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos flavonóides e aos ácidos fenólicos (FUNARI e FERRO, 2006). A natureza dos compostos terpenóides e aromáticos, encontrados na própolis, tem importância biológica, variando de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011). Embora vários estudos sobre própolis venham sendo publicados, a maioria deles refere-se à própolis produzida pela abelha africanizada *Apis mellifera* (CUNHA et al., 2013).

Em se tratando de abelhas, vale salientar que as abelhas das espécies pertencentes à tribo Meliponini, conhecidas como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, "meliponíneos" são muito populares em diversos países tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil (SOUZA et al., 2009). No sertão nordestino destaca-se a espécie jandaíra (*Melipona subnitida*) que é considerada endêmica da Caatinga (Figura 2) (FREITAS, 1999). As abelhas nativas pertencentes à tribo Meliponini, coletam barro e adicionam-o às resinas, formando geoprópolis. Este material é utilizado principalmente na construção da entrada da

colméia, para fechar aberturas e no batume divisório, possuindo consistência dura e cor característica do barro da região (Figura 3) (ALVES, CARVALHO e SOUZA, 2007). Assim, abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) produzem própolis e abelhas nativas, dependendo da tribo, produzem própolis ou geoprópolis.

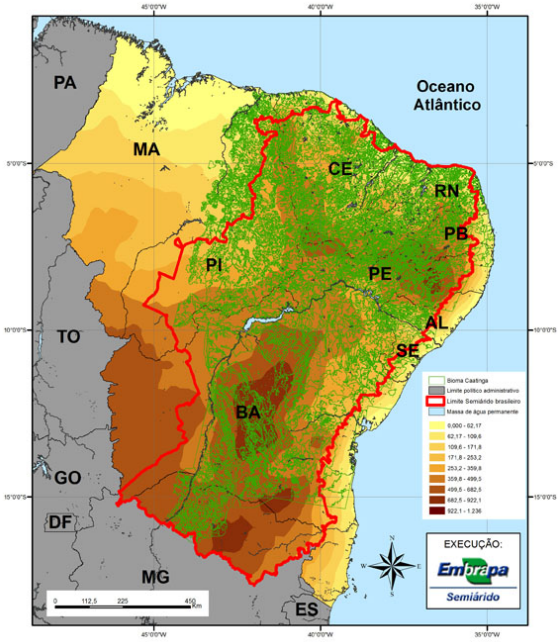


Figura 1 – Extensão do bioma caatinga em verde. Limites do clima semi-árido em vermelho.
Fonte: Embrapa, 2013.



Figura 2 – Abelha *Melipona subnitida,* popularmente conhecida por "jandaíra" e endêmica da Caatinga nordestina.
Fonte: Mahybe, 2008.



Figura 3 – Amostra de geoprópolis de jandaíra (*Melipona subnitida*) obtida na região do semi-árido norte-riograndense.
Fonte: dados da pesquisa, 2013.

A geoprópolis igualmente a própolis, é amplamente utilizada para tratamento de diferentes doenças (SOUZA et al., 2009), com algumas atividades biológicas já comprovadas (VELIKOVA et al., 2000; LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013). Entretanto, em relação à geoprópolis de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*), estudos sistematizadas sobre sua composição química, origem botânica e atividades farmacológicas são escassos.

Considerando a importância de se pesquisar amostras de própolis em áreas que nunca foram estudadas (SFORCIN e BANKOVA, 2011), o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfologicamente amostras de geoprópolis da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) coletadas em uma região do semi-árido do Rio Grande do Norte (RN), através de microscopia óptica, correlacionando com a flora circunvizinha às colmeias; caracterizar quimicamente essas amostras, através de cromatografia de camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de matriz de díodos (LC/UV-DAD) e paralelamente quantificar o teor dos fenóis totais. Algumas atividades biológicas foram investigadas *in vitro* ou *in vivo*, a saber: atividade antioxidante, através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo); atividade antibacteriana, através do método de difusão em ágar, atividade cicatrizante (creme de geoprópolis de jandaíra 10%) e por fim, realizou-se um ensaio de toxicidade preliminar frente à *Artemia salina*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil químico e o potencial terapêutico da geoprópolis de jandaíra (*Melipona subnitida*) nativa do semi-árido nordestino, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar morfologicamente diferentes amostras de geoprópolis de jandaíra através de microscopia óptica e correlacionar com a flora circunvizinha às colmeias.
b) Estabelecer o perfil químico de amostras de geoprópolis de jandaíra através de TLC e LC/UV-DAD;
c) Quantificar os fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante da geoprópolis de jandaíra (*in vitro*);
d) Avaliar *in vitro* o potencial antibacteriano da geoprópolis de jandaíra, através do método de difusão em ágar;
e) Avaliar *in vivo* a atividade cicatrizante de um creme de geoprópolis de jandaíra 10%, através da indução de feridas cirúrgicas experimentais em ratos Wistar;
f) Determinar *in vitro* a toxicidade da geoprópolis de jandaíra frente à *Artemia salina*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1.1 Estratégia de busca

A pesquisa bibliográfica foi realizada na plataforma Biblioteca do Conhecimento Online (B-on), buscando artigos publicados até abril de 2013 (sem limite inferior de ano). Dentre os recursos consultados, estão: BioMed Central, BioOne, *Bioline International*, *Directory of Open Access Journals* (DOAJ), *Future Science Group*, *Institute for Operations Research and the Management Sciences* (INFORMS), Medline / Pubmed, *Project Gutenberg*, PubMed Central, *Public Library of Science* (PLoS), *Scielo Global*, *Universidad de la Rioja* - DialNet, Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal (RCAAP).

As palavras-chave utilizadas foram: "*Propolis and Brazil*". E os seguintes passos foram seguidos para a pesquisa rápida: "Qualquer" "contém" "*Propolis and Brazil*", em qualquer idioma e ano de publicação, sendo encontrado um total de 551 referências.

3.1.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão dos artigos para a revisão foram: artigos com textos completos disponíveis, relacionados com a composição química e/ou atividades biológicas de própolis brasileira. A busca foi realizada pelo acesso on-line e utilizando os critérios de inclusão, a amostra final desta revisão foi constituída de 179 artigos (32,48%).

3.1.3 Seleção e análise dos estudos

Os trabalhos selecionados foram publicados entre os anos 1995 e 2013 (até abril), todavia verifica-se que 2012 e 2011 foram os anos com maior número de publicações, com 32 e 29 trabalhos publicados respectivamente, representando um total de 34% da amostra (Figura 4). Observa-se que a partir de 2006 houve crescente interesse de estudos sobre a própolis brasileira.

Analisando os 179 artigos, pode-se observar que 97% destes estão relacionados à própolis produzida pela abelha africanizada *Apis mellifera*, refletindo a escassez de trabalhos relacionados a própolis produzida por abelhas nativas ou indígenas (Figura 5). Dentre os

trabalhos relacionados à própolis de abelhas nativas, observa-se maior incidência de informações acerca do gênero *Melipona*. Em relação ao tipo de própolis estudada, observa-se que a própolis verde lidera o número de estudos (44%) (Figura 6). Contudo, somente por volta de 2004 é que a própolis oriunda da fonte vegetal *Baccharis dracunculifolia* e produzida nos estados de Minas Gerais e São Paulo, começou a ser chamada própolis verde, o que implica que publicações anteriores já a estudavam, mas ainda não a caracterizavam como "própolis verde". A própolis vermelha é o segundo tipo de própolis brasileira mais bem estudada e a partir de 2006 pode-se encontrar trabalhos caracterizando-a quimicamente e botanicamente (*Dalbergia ecastaphyllum*). Em relação à geoprópolis da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*), nenhum trabalho foi encontrado até abril de 2013. Diante dessa realidade, foi necessário recorrer a literaturas alternativas, como livros, artigos (publicados em periódicos não contemplados por esta pesquisa), dissertações e teses locais para auxiliar a escrita da revisão de literatura nas seções "Geoprópolis" e "Abelha jandaíra".

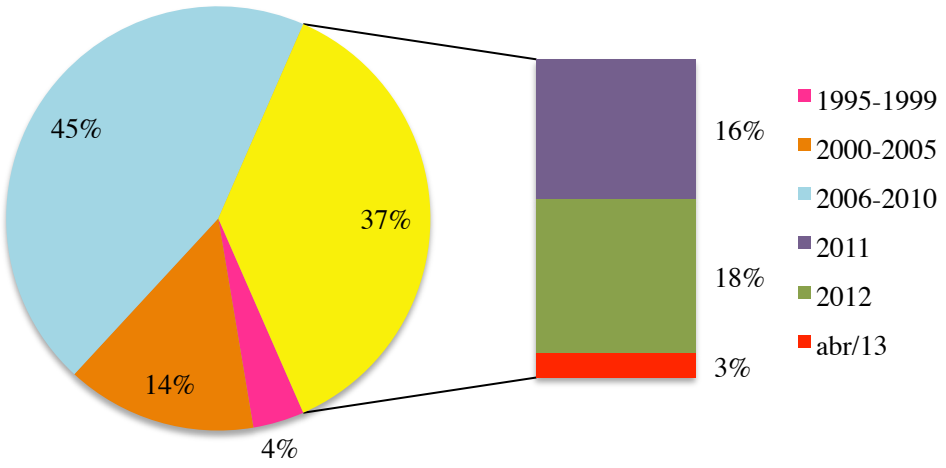


Figura 4 – Percentagem de publicação por ano ou período, dentre os 179 artigos selecionados para a revisão.
Fonte: dados da pesquisa, 2013.

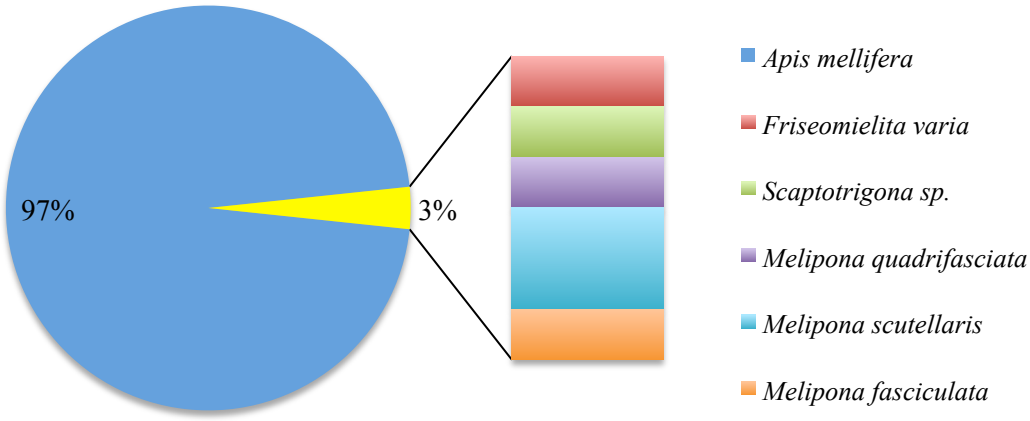


Figura 5 – Distribuição das publicações em relação às espécies de abelhas envolvidas (*Apis mellifera* e abelhas nativas).
Fonte: dados da pesquisa, 2013.

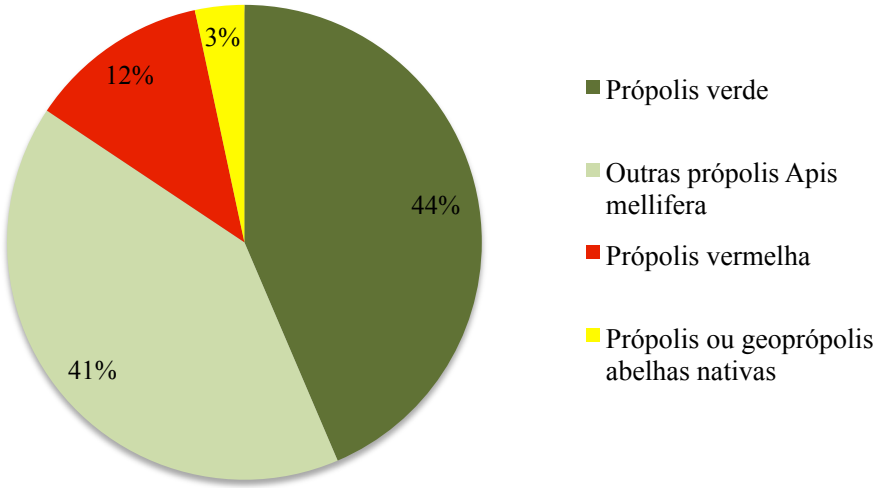


Figura 6 – Distribuição dos tipos de própolis estudados entre os anos 1995 e 2013 (abril).
Fonte: dados da pesquisa, 2013.

3.2 GEOPRÓPOLIS

A palavra própolis é derivada do grego e significa em defesa da comunidade (*pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade) (MIGUEL e ANTUNES, 2011). A própolis é produzida pelas abelhas a partir da coleta de ceras e substâncias derivadas de plantas (como resinas e compostos voláteis). As abelhas têm a própolis como a sua "arma química" mais importante, utilizando-a contra micro-organismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colméia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (BANKOVA, 2005).

A origem botânica da propólis está diretamente relacionada à sua composição química, mas fatores como sazonalidade, variabilidade genética da abelha que a produz e reações geradas, através das secreções hipofaringianas da abelha (hidrólise de glicosídeos flavonóides em agliconas), podem levar a transformações em sua composição (CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012; NUNES e GUERREIRO, 2012). Tipicamente, a própolis é formada por cerca de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e 5% de pólen (NIKOLAEV, 1978; apud ASHRY e AHMAD, 2012). Sua cor varia do marrom escuro à verde, amarelo e vermelho. Em geral, o sabor é resinoso e o odor aromático (SALATINO et al., 2011). Entre seus compostos, se encontram, em sua maior parte, flavonóides e outros ésteres fenólicos e seus derivados, compostos aromáticos, minerais (ferro, cálcio, zinco, cobre, manganês) e vitaminas (C , E, e do grupo B) (CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012).

Conforme Gregory et al. (2002), a humanidade usa a própolis como remédio há milênios. Uma série de propriedades têm sido atribuídas a este produto natural, tais como antimicrobiano, anti-inflamatório e até mesmo antiácido; usos evidenciados pelas tradições populares, ainda fortemente preservadas por muitas sociedades sul-americanas. Durante as últimas décadas, muitas dessas atividades biológicas foram reportadas e confirmadas cientificamente: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetor, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011; SFORCIN e BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012; FABRIS et al., 2013). Entretanto são escassas revisões críticas sobre o uso de produtos à base de própolis no contexto clínico (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Todavia, vale salientar que, apesar das diferenças existentes na composição entre os diversos tipos de própolis, estes apresentam similaridades em suas propriedades

farmacológicas. Na verdade, não é surpreendente os diferentes tipos de própolis possuírem atividade antibacteriana e antifúngica, pois na colméia as abelhas utilizam-na para esse fim. Assim, "o fato de compostos químicos de naturezas distintas, conduzirem ao mesmo tipo de atividade e em alguns casos, até para a mesma ordem de grandeza da atividade, é encantador" (BANKOVA, 2005, p. 30)[1].

Além das dificuldades acerca da existência de estudos clínicos com própolis e, embora uma considerável quantidade de estudos sobre própolis tenham sido publicados, a maioria deles refere-se à própolis produzida pela abelha africanizada *Apis mellifera,* originária da África. No Brasil, em adição à *Apis mellifera* (principal produtora de mel e própolis), há centenas de espécies de abelhas nativas, também conhecidas por abelhas indígenas sem ferrão. Estas abelhas produzem cerumen, a partir da cera, e própolis ou geoprópolis. As abelhas nativas pertencentes à tribo Meliponini elaboram geoprópolis, que difere da própolis produzida pelas abelhas sociais sem ferrão da tribo Trigonini e pelas abelhas do gênero *Apis* por utilizarem terra e/ou barro, além de resinas de plantas e cera (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011; CUNHA et al., 2013).

Em relação à geoprópolis das abelhas Meliponini, há escassez de estudos sistematizados e, destes poucos, alguns trabalhos já indicam bons resultados quanto às suas propriedades imunomoduladora e antimicrobiana (VELIKOVA et al., 2000; LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN, M. et al., 2012; CUNHA et al., 2013). Quanto à geoprópolis da jandaíra (*Melipona subnitida*), Souza (2012), em seu estudo, descreveu o perfil químico e realizou a avaliação da atividade antioxidante de uma amostra coletada no sertão da Paraíba. A análise palinológica mostrou que a geoprópolis apresentava o tipo polínico dominante Senna, já a análise química detectou abundância de flavonóides e fenilpropanóides glicosilados. A geoprópolis de jandaíra apresentou, ainda, promissora atividade antioxidante.

3.2.1 Abelha jandaíra

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como "abelhas indígenas sem ferrão", ou ainda, "meliponíneos". As abelhas indígenas da tribo Meliponini, composta por 619 espécies, são caracterizadas, portanto, pela ausência de ferrão associado ao

[1] "*The fact that different chemistry leads to the same type of activity and in some cases even to activity of the same order of magnitude is amazing"* (Bankova, 2005, p. 30).

ovipositor. Na Caatinga, cerca de 18 espécies da tribo Meliponini já tiveram sua ocorrência registrada (ZANELLA, 2000), dentre elas, a abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) é um dos meliponíneos típicos do sertão nordestino (NOGUEIRA-NETO, 1997). Nesta região do Brasil de clima predominantemente semi-árido, muitos agricultores têm se empenhado na criação de abelhas africanizadas e algumas espécies de abelhas nativas, como a mandaçaia, jataí e jandaíra, como fonte alternativa de renda (SOUZA et al., 2009).

A criação de abelhas nativas é de fácil manejo e contribui para a conservação das abelhas e de seus hábitats, sendo considerada sustentável, pois inclui a restauração ambiental através da preservação e plantio de árvores que servem de locais de nidificação, além da atuação das abelhas na polinização da flora nativa (FREITAS, 1999; ZANELLA E MARTINS, 2003). Além da sua importância para a polinização, as abelhas produzem cera, mel, própolis ou geoprópolis, possuindo alguns desses produtos propriedades terapêuticas (BRUENING, 1990). Desse modo, o interesse econômico gira em torno do mel que é apreciado pela população local pela ótima qualidade (sabor, cheiro, cor, valor nutricional e terapêutico) e dos enxames, que são vendidos no tronco ou em cortiços (CÁMARA et al., 2004). Por isso, a demanda do mel das abelhas sem ferrão vem aumentando no mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diversas regiões do Brasil (SOUZA et al., 2004).

Faz-se necessário informar que no ambiente natural de ocorrência da jandaíra, as espécies vegetais mais procuradas para nidificação (construção de suas colônias) são a imburana, a catingueira, o angico e a baraúna. Na coleta do pasto apícola, as seguintes espécies foram notificadas: *Anacardium occidentale* (cajueiro), *Commiphora leptophloeos* (imburana), *Libidibia ferrea* (jucazeiro), *Poincianella bracteosa* e *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira), *Anadenanthera colubrina* (angico), *Pityrocarpa moniliformis* (catanduva), *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), *Tarenaya spinosa* (mussambê), *Senna uniflora* (matapasto-cabeludo), *Senna obtusifolia* (matapasto), *Waltheria americana* (malva-branca), *Chamaecrista calycioides* e *Chamaecrista supplex* (palma-do-campo), *Borreria verticillata* (cabeça de velho) (MAIA-SILVA et al., 2012).

3.2.2 Principais espécies botânicas envolvidas

A informação sobre a origem botânica e composição química das própolis utilizadas em estudos de atividades biológicas, pode ajudar na compreensão da correlação entre os tipos

específicos de própolis e suas atividades biológicas (FUNARI, FERRO e MATHOR, 2007). No Brasil, há uma diversidade climática (equatorial, tropical e sub-tropical) e, por isso, a variedade vegetal é considerável (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011). Tal variedade implica em dificuldade de determinação da principal fonte botânica, já que para formar uma única amostra de própolis as abelhas visitam diversas plantas. No entanto, essa determinação tem papel crucial na caracterização química do tipo de própolis, devido a presença de metabólitos secundários (SALATINO et al., 2011). Em geral, as abelhas escolhem os exudados vegetais a serem utilizados no fabrico da própolis devido às suas propriedades físicas (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Nesse sentido, Park, Alencar e Aguiar (2002) classificaram a própolis brasileira em 12 (doze) grupos de acordo com as suas características físico-químicas. Dentre esses grupos, três tiveram suas principais fontes botânicas determinadas. As própolis pertencentes aos grupos 6 (nordeste) e 12 (sudeste) são formadas por brotos ou folhas jovens de *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente. Enquanto que o grupo 3 (sul) é formado por própolis produzida a partir da resina do botão floral de *Populus alba*. No sul do Brasil, coníferas como a araucária (*Araucaria angustifolia*), tem sido sugerida como fonte de diterpenos para a própolis, enquanto que no sudeste e centro do Brasil esses compostos são fornecidos pela *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO *et al.*, 2011).

Os estudos de Funari, Ferro e Mathor (2007) confirmaram que a própolis verde, oriunda do cerrado brasileiro, é produzida principalmente a partir da fonte botânica *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteracea), popularmente conhecida como "alecrim-do-campo" ou "vassourinha". Nesse tipo de própolis o composto mais abundante identificável é a artepilina C, um ácido fenólico prenilado; sendo este considerado o provável marcador fitoquímico da própolis verde. Derivados do ácido cafeoilquínico também são abundantes (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008). No Brasil, a própolis verde é o tipo de própolis com maior importância comercial, por ser o principal fornecedor de própolis para o Japão, com 80% da demanda. No Japão, a própolis verde é utilizada como suplemento alimentar na profilaxia de doenças devido às suas ótimas características organolépticas e também em razão do menor teor de poluentes ambientais (SOUSA et al., 2007; BISCAIA e FERREIRA, 2009).

A própolis vermelha, encontrada na Mata Atlântica da região nordeste do Brasil (estados Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba), também tem sua fonte botânica bem caracterizada, a *Dalbergia ecastophyllum (L) Taub*. (Leguminosae), popularmente chamada de "rabo-de-bugio" (SILVA et al., 2008). O perfil químico mostrou presença de

iquiritigenina, dalbergina, isoliquiritigenina, daidzeina, formononetina e biochanina A, sendo os três últimos compostos isoflavonóides (DAUGSCH et al., 2008).

Diante do levantamento bibliográfico realizado torna-se possível inferir que há poucos estudos acerca da composição química e plantas relacionadas no fabrico de própolis de abelhas sem ferrão. Embora a composição da resina seja dependente das espécies das abelhas e da região geográfica do lugar onde a amostra foi coletada, a espécie vegetal *Schinus terebenthifolius*, popularmente conhecida por "aroeira", foi reconhecida como uma importante fonte botânica para a própolis de abelhas sem ferrão em todas as regiões do Brasil (SAWAYA et al., 2010).

3.2.3 Composição química

Visando compreender a bioatividade da própolis, se faz necessário caracterizar quimicamente os extratos a serem testados nos estudos de atividade biológica (SFORCIN e BANKOVA, 2011), pois as propriedades farmacológicas da própolis estão diretamente relacionados à sua composição química, que por sua vez depende da flora local e sazonalidade (SILVA, et al., 2006). Mas, ao contrário da própolis européia, a própolis produzida no Brasil possui grande variabilidade em sua composição química, devido a diversidade vegetal encontrada no território brasileiro (CASTRO et al., 2007; NUNES e GUERREIRO, 2012).

A própolis contém compostos fenólicos e terpenóides, mas não apresenta compostos nitrogenados, tais como alcalóides, glucosinolatos e compostos cianogênicos. Usualmente, esses compostos não são encontrados nas superfícies das plantas (locais onde as abelhas coletam as resinas e exsudatos), com exceção dos alcalóides cafeína e teobromina, que são encontrados na cera foliar de *Ilex paraguariensis* (SALATINO et al., 2011).

Os autores, Park, Alencar e Aguiar (2002) delinearam o perfil de flavonóides presentes em amostras de própolis pertencentes a três grupos. No grupo 3 (região sul), as amostras eram ricas em pinobanksina, pinocembrina, pinobanksina 3-acetato, crisina e galangina, compostos frequentemente encontrados em fontes vegetais de regiões de clima temperado. No grupo 12 (região sudeste), as amostras são compostas dos flavonóides canferide, isosakuranetina e pequenas quantidades de canferol. Nas amostras pertencentes ao grupo 6 (nordeste) não foram identificados flavonóides.

Em relação à própolis verde, seu constituinte majoritário é o ácido 3,5-diprenil-4-

hidroxicinâmico (DHCA), conhecido por artepilina C (FUNARI e FERRO, 2006). Outros compostos fenólicos foram identificados em amostras de própolis verde e Baccharis, sua principal fonte vegetal: ácido cumárico, rutina, pinobansksina, quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, pinobanksina-3-acetato, crisina, galangina, canferide e tectocrisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008); ramnocitrina, eupalitina, acacetina, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido (E)-3-[4-(3-fenilpropanoiloxi)]-3,5-diprenil-cinâmico e os triterpenos α- e β-amirina e lupeol por Ressonânica nuclear magnética (1D- e 2D-NMR), Espectroscopia de massa (MS) e Espectroscopia do infravermelho (IR) (TAVARES et al., 2010).

Outros compostos foram, ainda, posteriormente isolados: procrim A (lupeol-3-(3-R-hidroxi)-hexa-decanoato), bacarina (ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico), beturetol, isosacuranetina, ácido (E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-cinâmico, diidrocanferide e drupanina (ácido 3-prenil-*p*-cumárico) (HATTORI et al., 2011). Compostos alifáticos foram encontrados em um extrato etanólico de própolis verde. Os autores Chang et al. (2008) chamam a atenção para o fato destes compostos não absorverem luz ultra-violeta (UV), não sendo normalmente reportados na literatura.

Já os extratos aquosos possuem composição semelhante aos extratos etanólicos, tendo como componentes majoritários os derivados das ácidos cafeoilquínico (ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ác. 3,5-di-O-cafeoilquínico, ác. clorogênico) e cinâmico (ác. *p*-cumárico, artepilina C, drupanina, bacarina) (NAKAJIMA et al., 2007; MOURA et al., 2011). Quanto aos compostos voláteis da própolis verde, 23 substâncias foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG-EM), sendo 17 deles presentes em ambos os óleos essenciais da própolis verde e Baccharis. O nerolidol foi o composto volátil majoritário em ambos os óleos essenciais (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008). Além do nerolidol, outros sesquiterpenos foram identificados no óleo essencial de própolis verde: β-cariofileno e selina-3,7(11)dieno, conferindo odor característico a esse tipo de própolis (ALBUQUERQUE et al., 2008).

A família Asteraceae, a qual pertence a *Baccharis dracunculifolia* – principal fonte botânica da própolis verde – é conhecida pela sua diversidade em possuir ácidos clorogênicos. Entretanto, nem todas as suas espécies são capazes de esterificar todas as quatro hidroxilas do ácido quínico, não somente com vários ácidos cinâmicos, mas também com ácido succínico (CLIFFORD et al., 2006; apud MOURA et al., 2011).

O estudo de Fabris et al. (2013) comparou amostras de própolis de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso. As amostras de Minas Gerais continham significante quantidade de pinocembrina, e pequenas quantidade de ácido caféico, canferol, galangina e quercetina. As amostras de São Paulo continham principalmente ácido caféico, canferol e fenetil éster do ácido caféico (CAPE), e somente em uma amostra, concentrações consideráveis de pinocembrina e quercetina foram encontradas. Já as amostras do Mato Grosso continham principalmente apigenina, galangina e 1,1-dimetilalilcafeato (DMAC) e em uma amostra, encontrou-se CAPE e quercetina em concentrações significantes. A variedade na composição química dessas amostras, está relacionada a grande diversidade vegetal encontrada no território brasileiro.

Outro tipo de própolis pesquisado por Teixeira et al. (2006), obtida na região do estado de Minas Gerais, de coloração castanha, com manchas brancas e dureza inferior à própolis verde, foi reportada por possuir como composto majoritário um triterpeno pentacíclico, o acetato de Bauer-7-en-3β-il. Supõe-se que a principal fonte botânica deste tipo de própolis seja a soja.

Em relação à própolis vermelha produzida a partir da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, os principais marcadores químicos são as isoflavonas. Nesse tipo de própolis, 15 compostos foram identificados: *trans*-anetol, metil eugenol, *trans*-metil isoeugenol, elemicina, *trans*-isoelemicina, 20(29)-lupen-3-one, α- e β-amirina, cicloartenol, lupeol, isosativana, medicarpina, gutiferone E, xantocimol, 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona, sendo este último encontrado pela primeira vez em um produto natural (TRUSHEVA et al., 2006). Alencar et al. (2007) identificaram outros 20 compostos após análise em cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massa (CG–EM), sendo as isoflavonas homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'- isoflavonol os compostos mais abundantes. Posteriormente, Li et al. (2008) isolaram outros flavonóides de um extrato metanólico: a flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona e a isoflavana mucronulatol, tendo estes compostos apresentado forte atividade citóxica.

Ainda em relação à própolis vermelha, Silva et al. (2008) mostrou percentagens significantes dos isoflavonóides 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano e medicarpina em um extrato hidroalcóolico. Já em um extrato etanólico e na sua fração clorofórmica, apenas o flavonóide quercetina, as isoflavonas formononetina e daidzeina e o ácido ferúlico foram identificados (CABRAL et al., 2009). No extrato metanólico da própolis vermelha, a fração clorofórmica revelou presença de isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona

(isoliquiritigenina) (OLDONI et al., 2011). Nesse mesmo ano, Righi et al. (2011) analisaram os extratos metanólico e clorofórmico da própolis vermelha, sendo a 3,4,2',3'-tetrahidroxichalcona eleito como principal composto encontrado. Outros constituintes importantes foram: a chalcona isoliquiritigenina, as isoflavanas (3S)-vestitol e (3S)-7-O-metilvestitol, o pterocarpano medicarpina, os fenilpropenos *trans*-anetol, metileugenol, elimicina, metoxieugenol e *cis*-asarone, e por fim, os álcoois triterpenos lupeol e α- e β-amirinas. Apesar de ter sido encontrado em baixas concentrações, um C-glicósido foi reportado pela primeira vez: naringenina-8-C-hexósido.

Os pigmentos responsáveis pela coloração rubra da própolis vermelha foram identificados como duas C30 isoflavanas, a retusapurpurina B e a retusapurpurina A (PICCINELLI et al., 2011). Em 2013, a partir de espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta (HR-DIMS), foi possível determinar como compostos principais da própolis vermelha as isoflavonas formononetina e biochanina A. A liquiritigenina também é comumente encontrada (FROZZA et al., 2013).

Em uma pesquisa realizada acerca da própolis do estado do Paraná por Marcucci et al. (2001) foram identificados no extrato metanólico os seguintes compostos: ác. 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), ác. 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA – artepilina C) e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB). Em um extrato oleoso obtido na mesma região por Carvalho *et al.* (2011), foram identificados o PHCA, o ácido 3,4-dihidroxi-5-prenil-cinâmico, isosacuranetina, canferide, artepilina C, diidrocanferide, o ácido (E)-3-{-4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-fenilfenil}-2-propenóico. Apesar desses estudos, para as própolis obtidas no estado do Paraná, a pinocembrina tem sido indicada como o principal marcador químico (SALATINO et al., 2011).

Quanto à própolis encontrada na região da Amazônia brasileira, Ishida et al. (2011) reportaram como principais compostos, benzofenonas polipreniladas: 7- epi-nemorosona, 7-epi-clusianona xantochimol e gambogenona. Além destes compostos, triterpernóides (β-amirinas, β-amirenona, lupeol e lupenona) foram ubíquos em algumas dessas amostras.

De forma diversa aos tipos de própolis apresentados anteriormente, na (geo)própolis[2] de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram identificados três diterpenóides *ent*-kaurene por Velikova et al. (2000). Ainda em relação às abelhas nativas, mas de outra espécie, a análise química da geoprópolis de *Melipona scutellaris* realizada por Cunha et al. (2013),

[2] O prefixo "geo" foi utilizado em adição ao termo "própolis", porque o autor não considerou a própolis obtida pela abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* como geoprópolis.

revelou ausência de flavonóides e presença de benzofenonas. Por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (CG-EM) foi possível identificar o 2-propensaeure-3-fenil-trimetilsililester e ácido 1,2-benzenedicarboxílico.

3.2.4 Atividades biológicas

Devido ao volume de pesquisas já realizadas, principalmente concernentes às própolis verde e vermelha foi possível perceber que a própolis brasileira possui diversas atividades biológicas, dentre as quais destacam-se: antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, imunomoduladora e antitumoral. As três primeiras atividades biológicas são alvos direto de investigação neste trabalho; dados sumarizados nos Quadros 1 e 2.

3.2.4.1 Atividade antioxidante

Na avaliação da atividade antioxidante de extratos de própolis, o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e o método de inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico têm sido amplamente empregados. Já para formulações farmacêuticas tópicas, os ensaios de inibição da peroxidação lipídica e sistema xantina/xantina oxidase/luminol mostraram-se mais adequados (MARQUELE et al., 2005).

Em relação às própolis verde e marrom, extratos aquosos mostraram maior atividade sequestradora do radical DPPH, que seus respectivos extratos metanólicos (BANSKOTA et al., 2000). Outro extrato aquoso da própolis brasileira, estudado por Nagai et al. (2003), mostrou maior atividade antioxidante que o ácido ascórbico 5mM nas concentrações de 1 e 5 mg/ml através do modelo de peroxidação lipídica. Posteriormente, Wang, Lien e Yu (2004), demonstraram atividade antioxidante concentração-dependente de frações de um extrato etanólico da própolis brasileira, fracionadas por fluido supercrítico, através da capacidade sequestradora dos radicais DPPH, superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH). Em outro estudo, Sheng et al. (2007) ao compararem o potencial antioxidante de um extrato etanólico com um extrato éter de petróleo, ambos de própolis brasileira, mostrou que o primeiro exibiu maior atividade tanto através do método DPPH, como através do método tiocianato férrico.

Ao fazer levantamento acerca da atividade antioxidante da própolis verde, encontrou-se que, dentre os compostos bioativos da própolis verde, a artepilina C mostrou capacidade de penetrar as células Caco-2 (extraídas de adenocarcinoma de cólon humano), que são usadas para mimetizar o epitélio gastrointestinal. Adicionalmente a isso, esse composto foi capaz

de prevenir o dano oxidativo em células HepG2 (hepatócitos), mostrando tanto sua biodisponibilidade, como sua capacidade antioxidante (SHIMIZU et al., 2004). Além desse estudo, Simões et al. (2004) avaliaram a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos estimulados, após tratamento com extrato etanólico de própolis verde. O maior efeito inibitório foi demonstrado pela fração hexânica e pelo canferide no ensaio dependente de luminol.

Ainda em relação à própolis verde, Izuta et al. (2009) compararam o potencial anti-radicalar de própolis de diversos países, inclusive do Brasil. Através desse estudo demonstrou-se que a própolis chinesa exibiu maior potência em sequestrar o radical DPPH, quando comparado com a própolis verde e alguns de seus compostos isolados. No caso da própolis chinesa, a atividade antioxidante pode ter ocorrido em virtude da presença do CAPE, e no caso da própolis verde, pela presença de derivados do ácido cafeoilquínico e ácido caféico. Em outro estudo comparativo, avaliou-se as própolis obtidas na Rússia, Itália e Brasil. Dentre as própolis testadas, as amostras do Brasil apresentaram menores valores de concentração capaz em inibir em 50% o radical DPPH ($IC_{50\%}$), variando entre 2-20mg/L. Dentre essas amostras, a própolis verde exibiu maior potencial antioxidante quando comparada as própolis do Pantanal e de São Paulo (FABRIS et al., 2013). Já Capucho et al. (2012), utilizando ratos Wistar machos tratados com extrato aquoso de própolis verde, demonstraram que uma maior produção de espermatozóides e maior altura do segmento inicial do epitélio do epidídimo (sem indução de estresse oxidativo) foi obtida nesses animais, quando comparados a animais do grupo controle. Os autores concluíram que devido à sua capacidade antioxidante, a própolis verde foi capaz de melhorar a função reprodutiva dos ratos.

A própolis vermelha também possui efeito antioxidante relevante. Um estudo comparou o potencial antioxidante de frações obtidas de um extrato hidroalcóolico da própolis vermelha, através dos métodos de sequestro de radical DPPH e inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico. No primeiro método, a fração hexânica apresentou maior atividade antioxidante (74,4%), enquanto que no segundo método, a fração clorofórmica apresentou maior atividade (64,84%). O estudo concluiu que existe uma maior correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico (R^2=0,86) (CABRAL et al., 2009). Em um ensaio semelhante, investigadores observaram que um extrato metanólico da própolis vermelha mostrou maior atividade antioxidante no método de oxidação do β-caroteno, quando

comparado ao método do DPPH. Os autores sugeriram que os principais compostos ativos, isoflavonas e chalconas, têm maior afinidade pela fase orgânica (RIGHI et al., 2011). Em um estudo posterior, isolou-se os seguintes compostos da fração clorofórmica: dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina). Dentre esses compostos, o vestitol mostrou maior atividade antioxidante em relação aos demais, através do modelo β-caroteno/ácido linoléico (OLDONI et al., 2011). Já Frozza et al. (2013), ao analisar um extrato hidroalcóolico de própolis vermelha obteve $IC_{50\%}$ = 270μg/mL e acentuada atividade enzimática tipo superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT), importantes no estresse oxidativo.

A atividade antioxidante está intimamente relacionada às propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. No caso da própolis marrom, observou-se redução das lesões extra-vaginais e danos histológicos causados pela infecção pelo vírus *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) em tecidos vaginais de animais por agir em processos oxidativos e inflamatórios (SARTORI et al., 2011). Já a propriedade antioxidante da própolis verde contribuiu na inibição da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) por neutrófilos estimulados por zimosan, através da mensuração por quimioluminescência. Após a análise qualitativa, observou-se que a aromadendrina-4-metil éter e a bacarina têm função essencial na atividade antioxidante, enquanto que a artepilina C não se mostrou tão importante para esse efeito (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

3.2.4.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da própolis é uma de suas propriedades farmacológicas mais bem elucidada. Sabe-se que, de um modo geral, as bactérias gram-positivas são mais sensíveis do que as gram-negativas aos extratos de própolis (GONSALES et al., 2006; JÚNIOR et al., 2006; CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012). O mecanismo da atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído a inibição do crescimento bacteriano por bloqueio da divisão celular, desorganização do citoplasma por inibição da síntese de proteína, ou ainda, pela inibição do processo adesão (SCAZZOCCHIO et al., 2006; FAROOQUI e FAROOQUI, 2010 apud CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012).

Orsi et al. (2007) analisaram um extrato hidroalcóolico da própolis da região sudeste, que exibiram potencial atividade contra isolados de diferentes sorovares de *Salmonella*, mas a *Salmonella typhimurium* foi a que mostrou maior resistência. Anteriormente, o efeito

sinergístico foi observado na administração concomitante desse extrato com antibióticos contra *Salmonella* typhi (ORSI et al., 2006). Em outro estudo, os extratos da própolis verde, obtidos da mesma região, mostraram atividade contra *Paenibacillus larvae*, uma bactéria formadora de esporos responsável pela doença loque americana, que afeta os estágios larvares das abelhas (BASTOS et al., 2008).

Em relação à própolis vermelha, a atividade antimicrobiana do extrato total e frações foi investigada. No estudo de Daugsch et al. (2008), alguns extratos etanólicos foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Já no estudo de Cabral et al. (2009) as frações apresentaram-se biologicamente mais ativas do que o extrato etanólico contra esta mesma bactéria. A fração hexânica apresentou maior atividade sequestradora de radicais livres, enquanto que a fração clorofórmica exibiu maior potencial antibacteriano. Com isso, os autores concluíram que os efeitos antioxidante e antibacteriano, não são devido a um efeito sinérgico entre os vários componentes do extrato etanólico. Posteriormente, outros autores isolaram da fração clorofórmica obtida a partir do extrato metanólico de própolis vermelha, dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina). A atividade antimicrobiana desses três compostos contra *Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* foi avaliada e os autores concluíram que isoliquiritigenina foi o composto com maior atividade (OLDONI et al., 2011).

Ainda em relação à própolis vermelha, um extrato metanólico apresentou atividade antimicrobiana em bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*) e gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) e contra o fungo *Candida albicans*. A maior concentração microbicida mínima (MMC) encontrada foi para *Klebsiella pneumoniae,* demonstrando maior resistência de bactérias gram-negativas, como já reportado (RIGHI et al., 2011). Em outro estudo recente, a fração acetanólica foi eficiente em 100% dos micro-organismos testados (bactérias gram-positivas e *Candida albicans*) (JÚNIOR et al., 2012).

No estudo de Koo et al. (2000), apesar da diferente composição química entre a própolis do nordeste, as própolis do sul e do sudeste, a atividade contra *Streptococcus mutans, S. sobrinus* e *S. cricetus* foi observada em todas as três diferentes amostras. Em discordância aos dados obtidos com a própolis da região nordeste, Silva et al. (2006) mostraram que a própolis obtida na Paraíba, não foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e do fungo, *Candida albicans*.

A atividade antimicrobiana das própolis do tipo 6 (nordeste) e 12 (sudeste) foram avaliadas em função da sazonalidade frente à bactéria *Streptococcus mutans*. Os autores Castro et al. (2007) concluíram que a sazonalidade influencia diretamente no perfil químico e potencial antimicrobiano das amostras testadas. Em relação à própolis do tipo 6, coletada na Bahia, a atividade antibacteriana foi acentuada em uma subfração da fração hexânica, rica em compostos da classe das benzofenonas. Em estudos posteriores, isolou-se desta fração a hiperibona A, uma benzofenona prenilada, que apresentou atividade contra *Staphyloccus aureus* e *S. mutans* (CASTRO et al., 2009). Castro et al. (2009) obteve em suas pesquisas que a hiperibona A possui atividade contra esses mesmos patógenos e outros ligados a infecções orais como: *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*.

Marcucci et al. (2001), ao pesquisar uma própolis obtida no Paraná, mostraram que três dos quatro compostos isolados foram efetivos contra *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Ainda na região Sul do Brasil, o estudo de Vargas (2004) realizado com a própolis oriunda do estado Rio Grande do Sul, inibiu o crescimento de 92,6% dos isolados de bactérias gram-positivas e 42,5% de gram-negativas. Com própolis obtida da mesma região, Cardoso et al. (2010) demonstraram que o extrato hidroalcóolico foi capaz de inibir o crescimento de patógenos comumente associados a otite canina: *Staphylococcus* coagulase-positivo e o fungo *Malassezia pachydermatis*. Em 2012, Simionatto et al. obtiveram a partir de hidrodestilação de própolis do Rio Grande do Sul, um óleo essencial, rico em monoterpenos (α-pineno, β-pineno e limoneno) que foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Em ano anterior, Mantovani et al. (2008) compararam o potencial antimicrobiano da própolis obtida no sul e sudeste contra o crescimento de várias cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa (CNS). Os resultados mostraram que a própolis do sudeste possuiu maior atividade anti-CNS, enquanto que a própolis do sul possuiu maior raio de sinergismo com medicamentos antimicrobianos.

Algumas amostras de própolis marrom, coletadas na região Centro-oeste demonstraram efeito antibacteriano contra *Escherichia coli*. 42,9% dessas amostras apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) de 250mg/mL (BASTOS et al., 2011). Outras amostras dessa mesma região, apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina, mas quando a bactéria era ressuspendida do leite, a atividade bactericida foi diminuída consideravelmente (SANTANA et al., 2012).

No estado de Manaus, inserido na região Norte do Brasil, Ishida et al. (2011)

obtiveram como resultado de suas pesquisas com própolis, atividade antimicrobiana positiva contra bactérias de interesse odontológico ligadas à cariogênese: *Streptococcus mitis, Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*. As amostras com bioatividade eram ricas em benzofenonas preniladas.

A atividade antibacteriana também tem sido atribuída à própolis produzida por abelhas nativas. A própolis da abelha *Frieseomelitta varia* exibiu atividade antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Após isolação e identificação, descobriu-se que a artepilina C é o composto com maior atividade (CAMPOS et al., 2011). A própolis produzida por *Melipona fasciculata* exerceu atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans*, com significante atividade inibitória contra biofilmes de *S. mutans* (LIBERIO et al., 2011) e o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* e sua fração hexânica inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *S. mutans* (CUNHA et al., 2013).

3.2.4.3 Atividade cicatrizante

A própolis é amplamente usada como cicatrizante e agente regenerador de tecidos. Na dermatologia é empregada no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras. Vários estudos *in vitro, in vivo* e alguns estudos clínicos foram realizados com o intuito de demonstrar tal atividade. Apesar de diferentes modelos experimentais terem sidos relatados nesta revisão de literatura, grande parte dos estudos mostra diminuição do recrutamento de células inflamatórias após tratamento com própolis.

Nesse viés, Gregory et al. (2002) avaliaram a eficácia da própolis, sob a forma farmacêutica de creme, em queimaduras de 2º grau através de um estudo clínico, comparando a performance do creme de própolis com o tratamento padrão, a sulfadiazina de prata. Os pacientes tratados com o creme de própolis, apresentaram tempo de cicatrização menor e sinais de inflamação (calor, rubor e inchaço) mais brandos do que aqueles tratados com a sulfadiazina de prata. No entanto, o creme de própolis mostrou-se com menor potencial antimicrobiano quanto comparado ao tratamento padrão.

Neste sentido, Funari, Ferro e Mathor (2007), realizaram uma pesquisa com a própolis verde, avaliando a absorção de compostos fenólicos por um pó-de-pele e o efeito destes sobre fibroblastos de ratos; e demonstrou que 68% dos compostos fenólicos aderiram ao pó-de-pele, em concentrações iguais ou inferiores a 15,62 μg/ml, além disso, o extrato de própolis não foi capaz de alterar a viabilidade dessas células.

Santos, Carneiro e Vianna (2007) avaliaram a eficácia do tratamento com pomada de própolis em pacientes portadores de feridas crônicas (úlceras vasculares, diabéticas e por pressão). As feridas tiveram tempo médio de cicatrização de 13,10 semanas e apresentaram sinais de inflamação brandos, indicando que o tratamento com a pomada de própolis agiu estimulando a cicatrização. Também utilizando uma pomada de própolis, um estudo observou que sob essa forma farmacêutica, a própolis influenciou o processo de cicatrização através do estímulo na proliferação de queratinócitos, além de ter sido capaz de reduzir de forma significativa as áreas das feridas. Através da técnica de espectroscopia fotoacústica foi possível observar que a taxa de penetração da formulação variou de acordo com o estágio da cicatrização (SEHN et al., 2009).

Em 2011, Pessolato et al. avaliaram a capacidade reepitelizante de uma pomada de própolis 5% em queimaduras de 2º grau induzidas em ratos. O tratamento com a pomada de própolis promoveu um eficaz debridamento das lesões no período inicial e estimulou a produção de colágeno em todo o período de avaliação. Neste mesmo ano, Moura et al. (2011) avaliaram o reparo tecidual estimulado pela administração oral de um extrato aquoso de própolis verde (500mg/kg), através do modelo de implantação de matrizes esponjosas subcutâneas. O grupo que foi tratado com própolis apresentou processo inflamatório reduzido na matriz esponjosa nos primeiros dias pós-implante, quando comparado ao grupo controle - não tratado. Os autores concluíram que a própolis testada foi capaz de afetar a deposição de colágeno na fase inicial do processo cicatricial.

Outro estudo, comparou a eficácia de uma pomada de própolis verde e uma de própolis vermelha na reparação de tecidos *in vivo*, ambas na concentração de 20%, e tentaram correlacionar esses dados com o teor de flavonóides. Os resultados obtidos demonstraram que os animais tratados com a pomada de própolis verde mostraram evolução ligeiramente melhor, apesar da própolis vermelha possuir maior teor flavonóides. Com isso, não foi possível fazer correlação entre o teor de flavonóides e o potencial cicatrizante, demonstrando que flavonóides diferentes nos dois tipos de própolis podem estar envolvidos no processo cicatricial (BATISTA et al., 2012).

Sob a forma farmacêutica de gel, produzido a partir do polímero poloxamer e contendo variadas concentrações do extrato padronizado de própolis (EPP-AF®), Beretta et al. (2012) avaliaram o tratamento de feridas induzidas em ratos Wistar. Dentre as concentrações testadas, o gel contendo 3,6% (p/p) do EPP-AF® possuiu maior atividade cicatrizante, propiciando completa epitelização com 7 dias pós-injúria. Através da análise histológica dos

fragmentos das feridas, observou-se que o gel de própolis diminuiu a quantidade de leucócitos e estimulou a angiogênese e a produção de colágeno. Dentre os compostos químicos do EPP-AF® houve predominância de substâncias das classes dos flavonóides, compostos fenólicos prenilados e ácidos fenólicos. Corroborando com esses achados, um estudo avaliando o efeito da aplicação tópica de extrato de própolis 30% em feridas cutâneas em ratos, concluiu que o tratamento foi capaz de promover a fibroplasia e re-epitelização das feridas e acelerar a cicatrização quando comparado a um grupo controle (ABREU et al., 2012).

Barroso et al. (2012) também avaliaram o efeito de um extrato alcoólico de própolis 30% sob mastócitos, através da aplicação tópica em feridas orais induzidas em hamsters. Quando comparado a um creme de dexametasona, o tratamento com o extrato alcoólico de própolis acarretou redução significante do número de mastócitos, tanto na região central, quanto nos bordos das feridas durante a fase inflamatória de cicatrização, demonstrando potente ação anti-inflamatória.

Quadro 1 – Lista das pesquisas sobre as ativ. antioxidante, antibacteriana e cicatrizante da própolis brasileira.

Atividade biológica	*In vitro/ in vivo*	Origem/ tipo de própolis	Tipo de extrato	Autores
Antioxidante	*In vitro*	Sudeste e sul (Próp. verde e marrom)	Extrato metanólico e aquoso	(BANSKOTA et al., 2000)
	In vitro	ND*	Extrato aquoso	(NAGAI et al., 2003)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Compostos isolados	(SHIMIZU et al., 2004)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(SIMOES et al., 2004)
	In vitro	ND	Extrato etanólico e frações	(WANG, LIEN e YU, 2004)
	In vitro	Sudeste	Extrato etanólico, glicólico e formulação tópica	(MARQUELE et al., 2005)
	In vitro	ND	Extrato etanólico e éter de petróleo	(SHENG et al., 2007)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato hidroalcóolico	(CABRAL et al., 2009)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico e aquoso	(IZUTA et al., 2009)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010)
	In vitro	Sul (Próp. marrom)	Extrato hidroalcóolico	(SARTORI et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato metanolico	(RIGHI et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato hidroalcóolico e frações	(OLDONI et al., 2011)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(CAPUCHO et al., 2012)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde e outra) e Centro-oeste	Extrato etanólico	(FABRIS et al., 2013)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato hidroalcóolico	(FROZZA et al., 2013)
Antibacteriana	*In vitro*	Nordeste	Extrato etanólico	(KOO et al., 2000)
	In vitro	Sul	Extrato metanólico	(MARCUCCI et al., 2001)
	In vitro	Sul	Extrato etanólico	(VARGAS et al., 2004)
	In vitro	Nordeste, sudeste e sul	Extrato hidroalcóolico	(JÚNIOR et al., 2006)
	In vitro	Sudeste, Sul e Centro-oeste	Extrato hidroalcóolico	(GONSALES et al., 2006)
	In vitro	Sudeste	Extrato hidroalcóolico	(ORSI et al., 2006)
	In vitro	Nordeste	Extrato álcool de cereais	(SILVA et al., 2006)
	In vitro	Nordeste (tipo 6) e sudeste (tipo 12)	Extrato etanólico	(CASTRO et al., 2007)
	In vitro	Sudeste	Extrato hidroalcóolico	(ORSI et al., 2007)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato etanólico	(DAUGSCH et al., 2008)

ND = Não descrito.

Quadro 2 –Lista das pesquisas sobre as ativ. antioxidante, antibacteriana e cicatrizante da próp. brasileira (cont.).

Atividade biológica	*In vitro/ in vivo*	Origem/ tipo de própolis	Tipo de extrato	Autores
Antibacteriana	*In vitro*	Sudeste, sul, nordeste e centro-oeste	Extrato etanólico	(BASTOS et al., 2008)
	In vitro	Sudeste e sul	Extrato hidroalcóolico	(MANTOVANI et al., 2008)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato etanolico, frações e subfrações	(CABRAL et al., 2009)
	In vitro	Nordeste (tipo 6)	Extrato etanólico, fração hexânica e subfrações	(CASTRO et al., 2009)
	In vitro	Nordeste (tipo 6)	Extrato hidroalcóolico	(CASTRO et al., 2009)
	In vitro	Sul	Extrato hidroalcóolico	(CARDOSO et al., 2010)
	In vitro	Centro-oeste	Extrato hidroalcóolico	(BASTOS et al., 2011)
	In vitro	Sudeste	Extrato clorofórmico	(CAMPOS et al., 2011)
	In vitro	Norte	Extrato hidroalcóolico	(ISHIDA et al., 2011)
	In vitro	Nordeste	Extrato hidroalcóolico	(LIBERIO et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato hidroalcóolico e frações	(OLDONI et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato metanólico	(RIGHI et al., 2011)
	In vitro	Nordeste	Extrato etanólico e frações	(JUNIOR et al., 2012)
	In vitro	Centro-oeste	Extrato hidroalcóolico	(SANTANA et al., 2012)
	In vitro	Sul	Óleos essenciais	(SIMIONATTO et al., 2012)
	In vitro	Nordeste	Extrato etanólico e frações	(CUNHA et al., 2013)
Cicatrizante	*Clínico*	ND	Creme tópico de própolis	(GREGORY et al., 2002)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico e metanólico	(FUNARI, FERRO e MATHOR, 2007)
	Clínico	ND	Pomada de própolis	(SANTOS, CARNEIRO e GAMBA, 2007)
	In vivo	ND	Pomada de própolis	(SEHN et al., 2009)
	In vivo	ND	Pomada de própolis	(PESSOLATO et al., 2011)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(MOURA et al., 2011)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde) e nordeste (Próp. vermelha)	Pomada 20% próp̀olis	(BATISTA et al., 2012)
	In vitro e in vivo	ND	Extrato padronizado EPP-AF®	(BERRETTA et al., 2012)
	In vivo	Sudeste	Extrato etanólico 30%	(ABREU et al., 2012)
	In vivo	Sudeste	Extrato etanólico 30%	(BARROSO et al., 2012)

Fonte: dados da pesquisa, 2013.

3.2.4.4 Outras atividades biológicas

Os dados apresentados nesta seção estão sumarizados nos Quadros 3-7.

3.2.4.4.1 Imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica

As propriedades imunomoduladora e anti-inflamatória da própolis brasileira já têm sido demonstradas cientificamente (SFORCIN, 2007; SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011; SFORCIN e BANKOVA, 2011). Além destas atividades, ação antinoceptiva também tem sido atribuída à própolis, principalmente através de modelos por estímulo químico (CAMPOS et al., 1998). A própolis também tem exercido papel importante como adjuvante de vacinas (FISCHER et al., 2007; ASHRY e AHMAD, 2012).

Em relação à própolis verde, atividade anti-inflamatória tem sido constatada. A artepilina C, composto bioativo majoritário na própolis verde, apresentou efeitos anti-inflamatórios mediados, pelo menos em parte, pela inibição da prostaglandina E_2 e do óxido nítrico através da modulação do fator nuclear *kappa* B (NF-κB). A artepilina C exibiu ainda biodisponibilidade após administração oral (PAULINO et al., 2008). Na pesquisa realizada por Missima e Sforcin (2008), ratos estressados foram tratados com própolis verde e a quantidade de peróxido de hidrogênio produzida por macrófagos peritoniais foi potencializada, enquanto que a produção de óxido nítrico foi inibida por estas células. A análise histopatológica mostrou aumento no centro germinal do baço de ratos do grupo controle, mas esse evento não foi observado nos animais tratados com própolis. Em 2010, Missima et al. avaliaram a administração de um extrato etanólico de própolis verde frente à expressão de citocinas Th1 (T *helper* 1): interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN-γ), e Th2 (T *helper* 2): interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) em camundongos portadores de melanoma submetidos ou não ao estresse. Observou-se que os animais tratados com própolis que eram portadores de melanoma e que foram submetidos ao estresse, houve estímulo na expressão de IL-2, bem como na produção de citocinas do tipo Th1. A própolis verde também estimulou a produção e a expressão de IL-10.

A própolis obtida na região sudeste, foi capaz de diminuir a proliferação de esplenócitos na presença ou ausência de concanavalina A (Con A) e estimular a produção de IFN-γ por estas células (SÁ-NUNES, FACCIOLI e SFORCIN, 2003). Utilizando um extrato etanólico de própolis verde, Orsatti et al. (2010) observaram as respostas Th1 e Th2 a curto

prazo em ratos e concluíram que o tratamento não foi capaz de afetar a expressão e produção de IL-2, IL-4 e IL-10, no entanto, foi capaz de inibir a produção de IFN-γ em culturas de esplenócitos, estimuladas ou não com concanavalina A (Con A); esse último dado diverge com os apresentados anteriormente. Em outro estudo, demonstrou-se que compostos isolados da própolis verde ajudam na restauração da expressão de adiponectina – uma proteína com níveis diminuídos em casos de obesidade e resistência à insulina. O mecanismo de ação está relacionado à inibição da *down*-regulação mediada pelo fator de necrose tumoral alfa (mais conhecido por TNF-α ou caquexina) nos adipócitos (IKEDA et al., 2011).

Machado et al. (2012) analisaram um extrato padronizado, predominantemente de própolis verde, que apresentou propriedades anti-inflamatórias, tanto ao inibir citocinas proinflamatórias, quanto a aumentar citocinas anti-inflamatórias, demonstrando seu potencial imunomodulador. A administração de própolis da região sudeste em galinhas poedeiras, aumentou a produção de imunoglobulina G (IgG) específica para eritrócito de carneiro e a produção de anticorpos naturais, indicando potencial uso no aumento da resposta antígeno-específica em vacinas (FREITAS et al., 2011). A atividade anti-inflamatória também foi atribuída à própolis marrom em processos de lesões vaginais induzidas pelo vírus *Herpes simplex* tipo 2 *in vivo* (SARTORI et al., 2011).

No nordeste brasileiro, a geoprópolis da abelha nativa *Melipona scutellaris* apresentou atividade analgésica na dor inflamatória. O extrato etanólico e uma fração aquosa mostraram atividade antinoceptiva em ambas as fases, neurogênica e inflamatória da dor; enquanto que a fração hexânica mostrou atividade somente na fase neurogênica. O extrato etanólico e a fração aquosa demonstraram sua atividade através do mecanismo de hipernocicepção inflamatória induzido por carragenina, sendo este efeito mediado pela inibição das citocinas interleucina-1 β (IL-1β) e TNF-α (FRANCHIN et al., 2012).

3.2.4.4.2 Antialérgica

A própolis brasileira foi capaz de diminuir o "comportamento de coçar" em ratos, provocado pelo composto 48/80, com isso, os autores concluíram que o mecanismo de ação estava relacionado à modulação de mastócitos (SHINMEI et al., 2004).

O trabalho de Sforcin e Bankova (2011) aborda o efeito dos tratamentos de alergias respiratórias com própolis brasileira. Nesse sentido, a própolis verde foi avaliada na liberação de leucotrienos e histamina por leucócitos periféricos, induzida por antígeno de pólen de

cedro japonês (Cry j1). O extrato etanólico e alguns de seus constituintes, especialmente artepilina C, bacarina e canferide, inibiram de forma moderada a liberação de cisteinil-leucotrienos (Cys-LT). O fenetil éster da artepilina C apresentou potência comparada aos inibidores de leucotrienos sintéticos, como o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) e o zileuton, e também ao CAPE, um componente ativo da própolis européia e chinesa (TANI et al., 2010).

3.2.4.4.3 Antitumoral, citotóxica e antiproliferativa

Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm sido realizados com o intuito de demonstrar o potencial antiproliferativo da própolis brasileira e de seus constituintes isolados (CARVALHO et al., 2011; MIGUEL e ANTUNES, 2011; SALATINO et al., 2011; SFORCIN e BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX e DU SERT, 2012).

Dentre esses estudos, pode-se citar o de Li et al. (2008), no qual amostras de própolis oriundas do nordeste brasileiro exibiram potencial antitumoral. Em relação à própolis vermelha, a atividade citotóxica parece estar relacionada à presença de flavonóides e pterocarpanos. Dentre os compostos avaliados, a flavanona 7-hidroxi-6-methoxiflavanone e a isoflavana mucronulatol exibiram potente ação citotóxica contra as linhagens de melanoma (B16-BL6), carcinoma de pulmão de Lewis (LLC), adenocarcinoma pulmonar humano (A549), fibrocarcinoma metastático (HT-1080) e LLC, A549, respectivamente. Nas flavanonas, a ausência ou presença da hidroxila no carbono 3 (C-3) pode estar envolvida no potencial citotóxico desses compostos. Em relação às isoflavanas, o aumento no número de grupos metoxila na estrutura base das isoflavanas, necessariamente aumentou o potencial citotóxico.

Nesse mesmo viés, Awale et al. (2008) avaliaram a atividade citotóxica do extrato metanólico de própolis vermelha e alguns de seus compostos isolados revelando que, tanto o extrato total quanto um pterocarpano ((6aR,11aR)-3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano), mostraram alta citotoxicidade contra células humanas de câncer pancreático (PANC-1). O mecanismo de morte está associado a um processo tempo-dependente por via não-apoptótica, que não conduz a fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA), mas a alterações morfológicas do tipo necrótica. Outro extrato de própolis vermelha (hidroalcóolico), apresentou atividade citotóxica em células humanas de carcinoma epidermóide da laringe (Hep-2), adenocarcinoma cervical (HeLa) e células normais do epitélio de rins embrionário

(Hek-293) (FROZZA et al., 2013). Vale mencionar também que, de uma amostra de própolis oriunda do estado da Bahia (tipo 6) isolou-se uma benzofenona prenilada, a hiperibona A, que apresentou efeitos citotóxicos contra células tumorais HeLa (CASTRO et al., 2009).

Em estudos realizados com extratos metanólicos de própolis verde e marrom, foi demonstrada alta capacidade citotóxica destas própolis contra células de carcinoma de cólon murino (26-L5) e células humanas de fibrosarcoma (HT-1080), quando comparados aos seus respectivos extratos aquosos (BANSKOTA et al., 2000). Já compostos isolados da própolis verde, apresentaram capacidade moduladora sobre o fator indutor de hipóxia (HIF-1), desempenhando papel importante no microambiente tumoral (HATTORI et al., 2011). Na pesquisa de Endo et al. (2012), a bacarina, derivado do ácido cinâmico também isolado da própolis verde, demonstrou potente atividade antitumoral, ao inibir de forma seletiva a prostaglandina F sintase (AKR1C3, uma enzima que modula a fisiologia de hormônios esteróides e potencial marcador de câncer de próstata e mama).

Uma terapia realizada com extrato aquoso de própolis obtida na região sudeste, reduziu o número de metástases de mama no pulmão e inibiu o crescimento tumoral de forma significativa. O mecanismo de ação foi por imunomodulação (ORSOLIC e BASIC, 2003; ORSOLIC et al., 2003). Quando esse mesmo extrato aquoso foi administrado concomitantemente a um quimioterápico (epirrubicina), a inibição de metástases foi potencializada (ORSOLIC e BASIC, 2005). Outra própolis da região sudeste exibiu atividade citotóxica em células humanas de carcinoma epidermóide da laringe (Hep-2), de modo tempo-dependente e concentração-dependente (BÚFALO, CANDEIAS e SFORCIN, 2009). Nessa mesma região, uma própolis coletada no estado de São Paulo, exibiu ação citotóxica em células de osteosarcoma canino, um neoplasma de interesse veterinário e pediátrico (CINEGAGLIA et al., 2012).

Estudos comparativos também foram realizados. Em um deles, Moraes et al. (2010) comparou o potencial antiproliferativo de extratos etanólicos de dois tipos de própolis, frente às células derivadas de câncer de próstata primário. Os autores observaram que a própolis vermelha apresentou alto potencial citotóxico, em comparação a outro tipo de própolis obtido na região sudeste. Estes resultados estão de acordo com os achados de Franchi et al. (2012), que também compararam o comportamento da própolis verde e vermelha frente ao crescimento de células tumorais de leucemia, e concluíram que a própolis vermelha é mais citotóxica que a própolis verde.

A própolis da região sul também possui atividade antitumoral. Um extrato oleoso

produzido a partir da própolis do estado do Paraná, apresentou efeitos citotóxicos ao diminuir o crescimento das linhagens das células de leucemia (HL-60), melanoma (MDA-MB- 435) e glioblastoma (SF-295). *In vivo*, essa própolis inibiu o crescimento tumoral de Sarcoma 180 em ratos, apresentando moderada toxicidade (CARVALHO et al., 2011).

As próp olis de abelhas nativas também exibiram potencial citotóxico. Como exemplo, pode-se citar a próp olis da abelha *Scaptotrigona* sp., popularmente conhecida por "tubi", que demonstrou seu potencial antiproliferativo ao inibir o crescimento de células humanas de glioblastoma e fibroblastos. A combinação dessa próp olis com temozolomida, tratamento padrão para tumores cerebrais, gerou sinergismo (BORGES et al., 2011). O estudo com *Melipona scutellaris*, uma espécie de abelha nativa, demonstrou que sua geoprópolis possui citotoxicidade seletiva para linhagens tumorais, quando comparada às linhagens de células normais (CUNHA et al., 2013).

3.2.4.4.4 Quimiopreventiva

Em relação à próp olis verde, ação quimiopreventiva não foi atribuída a um extrato aquoso frente à hepatocarcinogênese induzida quimicamente em ratos, nos estágios de iniciação e promoção (SAID et al., 2010). Todavia, esses resultados não convergem com os achados de Dornelas et al. (2012), que avaliaram a quimioprevenção em ratos com câncer de bexiga induzido, que foram posteriormente tratados com próp olis verde extraída por uma solução de L-lisina 8%. O efeito quimiopreventivo foi visto, mas somente nos animais que receberam o tratamento antes e continuadamente à administração do carcinógeno. Nos animais que receberam somente o aminoácido L-lisina houve promoção da carcinogênese.

Em outra situação, um extrato hidroalcóolico de próp olis verde também preveniu a carcinogênese lingual quimicamente induzida em ratos (CAVALCANTE et al., 2011). Em contrapartida, um etanólico comercial não afetou a resposta tecidual à carcinogênese induzida por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) na língua de hamsters; pelo contrário, o tratamento com próp olis parece ter encurtado o período de latência, propiciando a carcinogênese (RICARDO et al., 2012).

3.2.4.4.5 Antigenotóxica e genotóxica

Há controvérsias sobre o potencial antigenotóxico da próp olis verde, porque alguns

estudos apresentam-na como agente genotóxico (TAVARES et al., 2006). Um desses estudos, demonstrou atividade antigenotóxica de um extrato aquoso de própolis verde, através do teste para detecção de mutação e recombinação (SMART) em células somáticas das asas de *Drosophila melanogaster*. Quando esse extrato foi administrado em simultâneo com doxorrubicina, diminuiu a frequência de recombinação, se comparado ao tratamento isolado com doxorrubicina. O efeito antirrecombinante foi dose-dependente e parece está associado ao potencial antioxidante da própolis verde (VALADARES, GRAF e SPANÓ, 2008).

Por outro lado, um extrato etanólico de própolis verde apresentou genotoxicidade *in vivo,* através do ensaio do cometa e teste do micronúcleo (PEREIRA et al., 2008). Utilizando parâmetros semelhantes, Monteiro Neto et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico da artepilina C (3,5-diprenil-ácido-p-cumárico), o composto encontrado em maior quantidade na própolis verde. Esse composto não se mostrou genotóxico no ensaio do cometa e no teste do micronúcleo. Nos animais tratados concomitantemente com artepilina C e doxorrubicina, o número de reticulócitos micronucleados foi significantemente menor em comparação ao grupo que recebeu apenas a doxorrubicina – o agente genotóxico. Em relação ao potencial antigenotóxico, a artepilina C nas doses testadas, diminuiu a extensão de danos no DNA de forma relevante, induzido por metanosulfonato de metila em células de fígado.

3.2.4.4.6 Antiaterogênica

Daleprane e colaboradores (2012) investigaram os efeitos dos polifenóis da própolis verde e vermelha em lesões ateroscleróticas e em fatores inflamatórios e angiogênicos ligados ao receptor de colesterol do tipo lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Todos os extratos de própolis testados promoveram uma diminuição na área de lesão aterosclerótica no grupo com lesão aterosclerótica inicial, quando comparados ao controle. Por outro lado, apenas os polifenóis da própolis vermelha atenuaram a progressão da aterosclerose e melhoraram o perfil lipídico dos camundongos pertencentes ao grupo com lesão aterosclerótica avançada. Ainda com este mesmo tipo de própolis, foi possível verificar sua capacidade reguladora do transportador tipo cassete ligado a adenosina trifosfato (ATP), responsável pelo efluxo de colesterol nos macrófagos, que por sua vez levam ao catabolismo no fígado (IIO et al., 2012).

3.2.4.4.7 Antiangiogênica

A própolis verde mostrou sua propriedade em inibir a angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Nesse sentido, pode-se citar um estudo que avaliou o extrato aquoso de própolis verde e seus constituintes (derivados do ác. cafeoilquínico) no processo de angiogênese em células endoteliais da veia umbilical humana (*in vitro*). Além disso, o efeito antiangiogênico desse mesmo extrato na neovascularização da retina no modelo de retinopatia induzido por oxigênio *in vivo* também foi avaliado. O extrato aquoso apresentou ação *in vitro* e *in vivo,* enquanto que os derivados do ác. cafeoilquínico apresentaram efeitos somente *in vitro*. Os efeitos angiostáticos do extrato aquoso e do ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico podem ser devidos, pelo menos em parte, aos seus efeitos inibitórios da via proteína cinase estimulada por mitógeno (MAPK) estimulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CHIKARAISHI et al., 2010).

Em outro estudo, esse mesmo extrato foi avaliado no modelo de murino de angiogênese inflamatória (pelo implante de esponja). Parâmetros como acumulação de células inflamatórias e produção endógena de citocinas foram monitorados. Dessa forma, o extrato aquoso de própolis verde foi capaz de diminuir o recrutamento de macrófagos, levando a uma baixa produção da enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase. O extrato foi capaz de modular ainda, a produção de citocinas por aumentar os níveis de VEGF e TNF-α e diminuir os níveis do fator transformador do crescimento beta (TGF-β1). Os resultados indicam que o extrato aquoso de própolis verde possui efeito anti-inflamatório e antiangiogênico associados à modulação de citocinas (MOURA et al., 2011).

Os polifenóis da própolis vermelha também mostraram efeitos anti-angiogênicos ao atenuar a sinalização e acumulação da proteína HIF-1α, o maior regulador da angiogênese em condições de hipóxia (DALEPRANE et al., 2012). A angiogênese tumoral também foi inibida pela própolis verde, especificamente pela artepilina C, através da supressão da formação de estruturas tubulares em células endoteliais de veia umbilical e inibição da proliferação de células endoteliais (AHN et al., 2007). Dornelas et al. (2012) mostraram que em ratos com carcinoma de bexiga induzido por N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN) e tratados com derivados de própolis solúveis em uma solução aquosa de L-lisina 8%, também houve inibição da angiogênese.

3.2.4.4.8 Anti-hipertensiva

Efeitos anti-hipertensivos também foram atribuídos à própolis verde e alguns de seus

flavonóides isolados, especialmente isosacuranetina, através do modelo de hipertensão espontânea em ratos. Os autores sugerem que a ação vasodilatadora pode estar parcialmente envolvida no mecanismo anti-hipertensivo (MARUYAMA et al., 2009).

3.2.4.4.9 Tratamento diabetes

Várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de averiguar o potencial da própolis brasileira no tratamento do diabetes. No entanto, outros estudos necessitam ser executados para esclarecer as concentrações ideais, tipos de extratos e intervalos de administração. A maioria dos autores utiliza o modelo experimental do diabetes induzido por estreptozotocina, uma toxina que age nas células beta do pâncreas, inibindo de forma irreversível a produção de insulina (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Em 2011, a própolis chinesa e a própolis verde foram utilizadas no tratamento contra lesões hepatorenais em ratos diabéticos. Os tratamentos foram capazes de prevenir injúria no fígado e rins, inibir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (ZHU et al., 2011).

3.2.4.4.10 Antiulcerosa e anti-Helicobacter pylori

Barros e colaboradores (2007) avaliaram a atividade protetora gástrica do extrato hidroalcoólico de própolis verde e de alguns de seus compostos isolados através de modelos de lesões gástricas agudas induzidas por etanol, indometacina e estresse. As propriedades antiulcerogênicas foram conferidas principalmente aos ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e cinâmico. Nesse contexto, a atividade de compostos isolados de um extrato metanólico de própolis brasileira foi testada frente a três diferentes estirpes da bactéria gram-negativa *Helicobacter pylori in vitro*. Os compostos testados, tanto os fenólicos, como os não fenólicos demonstraram fraca atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria (BANSKOTA et al., 2001). Um estudo clínico, corrobora com esses resultados, ao demonstrar atividade mínima de um extrato etanólico de própolis verde em pacientes *H. pylori* positivos (COELHO et al., 2007).

3.2.4.4.11 Hepatoprotetora

A atividade hepatoprotetora foi conferida à própolis brasileira através do modelo de

morte celular induzida por D-galactosamina e TNF-α em cultura primária de hepatócito (BANSKOTA et al., 2000; BANSKOTA et al., 2001).

3.2.4.4.12 Neuroprotetora

O efeito neuroprotetor tem sido atribuído à própolis verde, através de sua conhecida propriedade antioxidante, agindo contra peroxidação lipídica e produção de radicais livres (SHIMAZAWA et al., 2005; NAKAJIMA et al., 2007). De igual modo, efeitos neuroprotetores sobre a retina foram investigados, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (INOKUCHI et al., 2006). Nesse estudo foi possível observar que o mecanismo de ação também pode estar ligado à sua capacidade reguladora dos genes relacionados à apoptose (Bok) e à atividade antioxidante (CK2) (NAKAJIMA et al., 2009). O CAPE, encontrado em alguns tipos de própolis, também demonstrou seu potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas, ao proteger a perda de neurônios dopaminérgicos pela 6-hidroxidopamina – uma neurotoxina que induz a doença de Parkison em ratos (BARROS SILVA et al., 2013).

3.2.4.4.13 Laxativa

A propriedade laxante da própolis, especificamente da própolis verde, foi reportada pela primeira vez *in vivo* por Kakino et al. (2012). O efeito laxativo de um extrato aquoso foi observado tanto em ratos normais, como em ratos constipados, através do modelo clonidina-induzido. O mecanismo de ação pode estar relacionado à ativação dos receptores da acetilcolina, promovendo aumento da tensão de contração no íleo, sem provocar diarréia como efeito adverso.

3.2.4.4.14 Antiparasitária

A própolis também tem demonstrado atividade contra alguns parasitas *in vitro* e/ou *in vivo*, tais como: *Giardia duodenalis* (FREITAS et al., 2006), *Leishmania braziliensis* (PONTIN et al., 2008; AMARANTE et al., 2012), *Trypanosoma cruzi* (CASTRO E HIGASHI, 1995; MARCUCCI et al., 2001; SALOMÃO et al., 2008; SALOMÃO et al., 2011) e *Trypanosoma evansi* (GRESSLER et al., 2012).

3.2.4.4.15 Antifúngica

A ação antifúngica também tem sido reportada. O estudo de Siqueira et al. (2009) sobre vários tipos de própolis mostrou que o extrato da própolis verde, e principalmente o da vermelha, possuem potencial antifúngico, porque as amostras de *Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrohytes* foram sensíveis a esses extratos. Dalben-Dota et al. (2010) indicou que as estirpes de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* isoladas de exsudatos vaginais foram sensíveis ao extrato etanólico de própolis obtida na região sul do Brasil, mostrando-se como uma alternativa ao tratamento da candidíase vulvovaginal.

Em nível celular, a atividade antifúngica ocorre por mecanismos de morte celular com apoptose. Com a exposição prolongada, há aumento na resposta necrótica (CASTRO et al., 2011). Posteriormente, estudou-se o mecanismo de morte celular promovido pela própolis, que ocorre ao afetar várias vias celulares, sendo os mais importantes aqueles relacionados ao estresse oxidativo, à cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, à acidificação vacuolar, à regulamentação da macroautofagia associado às proteínas com alvo nos vacúolos, à resposta celular à privação de nutrientes e regulação negativa de transcrição do promotor da polimerase do ácido ribonucléico II (RNA II) (CASTRO et al., 2012).

3.2.4.4.16 Antiviral

A atividade antiviral tem sido atribuída à própolis verde contra o poliovírus tipo 1 (PV1) (BÚFALO et al., 2009) e o vírus da influenza A (IAV). Neste último caso, o composto bioativo foi o 3,4-ácido di-cafeoil quínico (3,4-diCQA), que através do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), aumentou a depuração viral (TAKEMURA et al., 2011).

3.2.4.4.17 Aprimoramento de tratamento odontológico

Atualmente as pesquisas envolvendo própolis em odontologia abrangem várias áreas e destacam suas atividades antimicrobianas (WATANABE et al., 2008; BERTOLINI et al., 2012) e anti-inflamatórias (SANTOS et al., 2008), particularmente em cariologia (LIBÉRIO et al., 2009; ISHIDA et al., 2011; TROCA et al., 2011), cirurgia oral (MORI et al., 2010),

periodontia (SANTOS et al., 2002) e endodontia (ANDRADE FERREIRA et al., 2007; REZENDE et al., 2008; VALERA et al., 2010; VICTORINO et al, 2010; MONTERO e MORI, 2012; RAMOS et al., 2012).

Quadro 3 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira.

Atividade biológica	***In vitro/ in vivo***	**Origem/ tipo de própolis**	**Tipo de extrato**	**Autores**
Imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica	*In vivo*	Sul	Extrato etanólico	(CAMPOS et al., 1998)
	In vitro e in vivo	Sudeste	Extrato hidroalcóolico	(SA-NUNES, FACCIOLI e SFORCIN, 2003)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(FISCHER et al., 2007)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(MISSIMA e SFORCIN, 2008)
	In vitro e in vivo	Sudeste (Próp. verde)	Artepilina C	(PAULINO et al., 2008)
	In vitro e vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(MISSIMA et al., 2010)
	In vitro e *vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(ORSATTI et al., 2010)
	In vivo	Sudeste	Extrato hidroalcóolico	(FREITAS et al., 2011)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(IKEDA et al., 2011)
	In vivo	Sul (Própolis marrom)	Extrato hidroalcóolico	(SARTORI et al., 2011)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(ASHRY e AHMAD, 2012)
	In vivo	Nordeste (Geoprópolis)	Extrato etanólico e frações hexânica e aquosa	(FRANCHIN et al., 2012)
	In vivo	Sudeste e sul	Extrato padronizado	(MACHADO et al., 2012)
Antialérgica	*In vivo*	ND	Extrato etanólico e própolis granulada	(SHINMEI et al., 2004)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico e constituintes isolados	(TANI et al., 2010)

ND = Não descrito.

Quadro 4 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.).

Atividade biológica	*In vitro/ in vivo*	Origem/ tipo de própolis	Tipo de extrato	Autores
Antitumoral, citotóxica e antiproliferativa	*In vitro*	Sudeste e sul (Próp. verde e marrom)	Extratos aquosos e metanólicos	(BANSKOTA et al., 2000)
	In vivo	Sudeste	Extrato aquoso	(ORSOLIC et al., 2003)
	In vivo	Sudeste	Extrato aquoso	(ORSOLIC e BASIC, 2003)
	In vivo	Sudeste	Extrato aquoso	(ORSOLIC e BASIC, 2005)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato metanólico e constituintes isolados	(AWALE et al., 2008)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Constituintes isolados	(LI et al., 2008)
	In vitro	Sudeste	Extrato etanólico	(BÚFALO, CANDEIAS e SFORCIN, 2009)
	In vitro	Nordeste	Hiperibona A	(CASTRO et al., 2009)
	In vitro	Sudeste e nordeste (Próp. vermelha)	Extrato etanólico	(MORAES et al., 2010)
	In vitro	Nordeste	Extrato etanólico	(BORGES et al., 2011)
	In vitro/ in vivo	Sul	Extrato etanólico e oleoso	(CARVALHO et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Compostos isolados	(HATTORI et al., 2011)
	In vitro	Sudeste	Extrato hidroalcóolico	(CINEGAGLIA et al., 2012)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Ácidos cinâmicos prenilados	(ENDO et al., 2012)
	In vitro	Sudeste/ Nordeste (Próp. verde e vermelha)	Extrato etanólico	(FRANCHI et al., 2012)
	In vitro	Nordeste	Extrato etanólico e frações	(CUNHA et al., 2013)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato hidroalcóolico	(FROZZA et al., 2013)

ND = Não descrito.

Quadro 5 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.).

Atividade biológica	***In vitro/ in vivo***	**Origem/ tipo de própolis**	**Tipo de extrato**	**Autores**
Quimiopreventiva	*In vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(SAID et al., 2010)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(CAVALCANTE et al., 2011)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso em solução de L-lisina 8%	(DORNELAS et al., 2012)
	In vivo	Sudeste	Extrato aquoso e etanólico	(RICARDO et al., 2012)
Antigenotóxica e genotóxica	*In vitro*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroetanólico	(TAVARES et al., 2006)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(VALADARES, GRAF e SPANÓ, 2008)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(PEREIRA et al., 2008)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Artepilina C	(MONTEIRO NETO et al., 2011)
Antiaterogênica	*In vivo*	Sudeste/ Nordeste (Próp. verde e vermelha)	Extrato de polifenóis	(DALEPRANE et al., 2012)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato etanólico	(IIO et al., 2012)
Antiangiogênica	*In vitro*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(AHN et al., 2007)
	In vitro/ in vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(CHIKARAISHI et al., 2010)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(MOURA et al., 2011)
	In vitro/ ex vivo/ in vivo	Nordeste (Próp. vermelha)	Extrato de polifenóis	(DALEPRANE et al., 2012)
	In vivo	Sudeste	Extrato aquoso em solução de L-lisina 8%	(DORNELAS et al., 2012)
Anti-hipertensiva	*In vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico, frações e flavonóides isolados	(MARUYAMA et al., 2009)
Tratamento diabetes	*In vitro/ in vivo*	Sudeste (Próp. verde) e outros	Extrato etanólico e aquoso	(SFORCIN e BANKOVA, 2011)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(ZHU et al., 2011)
Antiulcerosa e Anti-*Helicobacter pylori*	*In vitro*	ND	Compostos isolados do extrato metanólico	(BANSKOTA et al., 2001)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(BARROS et al., 2007)
	Clínico	Sudeste (Próp. verde)	20 gotas de extrato etanólico 3x/dia por 7 dias	(COELHO et al., 2007)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Compostos isolados do extrato etanólico	(BARROS et al., 2008)
Hepatoprotetora	*In vitro*	Sudeste e sul (Próp. verde)	Extrato metanólico e aquoso	(BANSKOTA et al., 2000)
	In vitro	ND	Extrato metanólico	(BANSKOTA et al., 2001)
Neuroprotetora	*In vitro/ in vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico e aquoso	(SHIMAZAWA et al., 2005)

ND = Não descrito.

Quadro 6 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.).

Atividade biológica	***In vitro/ in vivo***	**Origem/ tipo de própolis**	**Tipo de extrato**	**Autores**
Neuroprotetora (cont.)	*In vitro/ in vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico e aquoso	(INOKUCHI et al., 2006)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(NAKAJIMA et al., 2007)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(NAKAJIMA et al., 2009)
	In vivo	CAPE	Solução CAPE 1mM	(BARROS SILVA et al., 2013)
Laxativa	*In vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso	(KAKINO et al., 2012)
Antileishmania	*In vitro/ in vivo*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcoólico	(PONTIN et al., 2008)
	In vitro	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(AMARANTE et al., 2012)
Antitripanossoma	*In vitro*	Sul	Extrato metanólico	(MARCUCCI et al., 2001)
	In vivo	ND	Extrato etanólico	(CASTRO e HIGASHI, 1995)
	In vitro	Sul, sudeste (verde) e nordeste (vermelha)	Extrato etanólico	(SALOMÃO et al., 2008)
	In vitro/ in vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato etanólico	(SALOMÃO et al., 2011)
	In vitro/ in vivo	Sul	Extrato etanólico	(GRESSLER et al., 2012)
Antigiardal	*In vitro*	Sudeste	Solução hidroalcoólica 125, 250 e 500mg/mL	(FREITAS et al., 2006)
Antifúngica	*In vitro*	Sul	Extrato etanólico	(DALBEN-DOTA et al., 2010)
	In vitro	Sudeste e sul	Extrato hidroalcóolico	(CASTRO et al., 2011)
	In vitro	Nordeste (Próp. vermelha) e sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso e etanolico	(SIQUEIRA et al., 2009)
	In vitro	Diversos	EPP-AF®	(CASTRO et al., 2012)
Antiviral	*In vitro*	Sudeste (Próp. verde)	Extrato hidroalcóolico	(BÚFALO et al., 2009)
	In vivo	Sudeste (Próp. verde)	Extrato aquoso e 3,4-diCQA	(TAKEMURA et al., 2011)
Aprimoramento de tratamento odontológico	*In vitro*	Sudeste	Solução etanólica 100mg/mL	(SANTOS et al., 2002)
	In vitro	Sul	Extrato etanólico	(ANDRADE FERREIRA et al., 2007)
	Clínico	Sudeste	Pasta extrato de própolis 11% + hidróxido de cálcio e pasta extrato etanólico de própolis 11% + hidróxido de cálcio	(REZENDE et al., 2008)
	In vitro	Sudeste	Enxaguante bucal a base de cloreto de cetilpiridínio + própolis	(WATANABE et al., 2008)
	Clínico	Sudeste	Gel de própolis	(SANTOS et al., 2008)
	In vitro	N/A	N/A	(LIBERIO et al., 2009)

ND = Não descrito. N/A = Não se aplica.

Quadro 7 – Pesquisas realizadas sobre outras atividades biológicas da própolis brasileira (cont.).

Atividade biológica	***In vitro/ in vivo***	**Origem/ tipo de própolis**	**Tipo de extrato**	**Autores**
Aprimoramento de tratamento odontológico (cont.)	*In vitro*	ND	Pasta própolis A70D® e D70D®	(VICTORINO et al., 2010)
	In vitro	Sudeste	Solução de própolis 20%	(MORI et al., 2010)
	In vitro	Sudeste	Extrato glicólico de própolis 12%	(VALERA et al., 2010)
	In vitro	Norte	Extrato etanólico	(ISHIDA et al., 2011)
	In vitro	Sudeste (Próp. Verde)	Liofilizado e extrato etanólico de própolis verde	(TROCA et al., 2011)
	In vitro	Sudeste	Pasta hidróxido de cálcio + própolis	(MONTERO e MORI, 2012)
	In vitro	ND	Dentífrico com Aloe vera e própolis	(BERTOLINI et al., 2012)
	In vitro	ND	Pasta com extrato de própolis 1%, dióxido de titânio e glicerina	(RAMOS et al., 2012)

ND = Não descrito.

Fonte: dados da pesquisa, 2013.

3.2.5 Estudos de avaliação da segurança

Poucos estudos de segurança foram realizados com os diversos tipos de própolis brasileira. Nos estudos realizados, a própolis tem demonstrado pouca toxicidade (CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012). Em relação à própolis verde, o consumo após 30, 90 e 150 dias de diversas concentrações, não induziu nenhuma alteração significante nos parâmetros séricos relacionadas à injúria cardíaca em ratos (MANI et al., 2006). Em contrapartida, o consumo agudo de própolis verde, foi capaz de causar alguns efeitos mutagênicos em células de sangue periféricas de ratos (PEREIRA et al., 2008). Em um ensaio de toxicidade aguda, própolis obtida no estado do Paraná exibiu alta dose letal 50% (DL50) em camundongos Swiss, com valores maiores que 5g/kg (ARAUJO et al., 2002; apud SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011).

Já as própolis obtidas por meliponíneos, foram testadas no ensaio de letalidade contra *Artemia salina* e algumas amostras mostraram-se muito citotóxicas – principalmente aquelas ricas em diterpenos, enquanto outras não (VELIKOVA et al., 2000; apud SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011). No estudo de Batista et al. (2012), não se observou nenhuma toxicidade hepática ou renal em ratos, após tratamento de feridas com própolis verde e vermelha por via tópica. Santos et al. (2008) validaram um método para análise de pesticidas em amostras de própolis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Estão apresentados nesta seção os principais materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Obtenção das amostras

As amostras da geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) foram obtidas na região do semi-árido norte-riograndense, Brasil. Uma amostra foi coletada na comunidade de Pedra Branca em maio de 2012 (A6), outra amostra foi coletada na zona metropolitana de Mossoró/RN em agosto de 2012 (A7) e mais cinco amostras foram obtidas no assentamento Boa Fé através de apicultores em abril de 2013 (A1-A5). Todas essas localidades fazem parte do município de Mossoró/RN (Latitude 05º11'15" Sul e Longitude 37º20'39" Oeste, altitude 16 metros) (Figura 7). Após a análise botânica de algumas amostras (A1-A5), diferentes extratos etanólicos foram produzidos com todas as amostras (os métodos de preparo serão apresentados adiante).



Figura 7 – Mapa indicando a localização do município de Mossoró e do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.
Fonte: http://www.achetudoeregiao.com.br/rn/mossoro/localizacao.htm

4.1.2 Formulação do creme de geoprópolis

A formulação de uso tópico a ser aplicada nos animais no ensaio de avaliação da atividade cicatrizante, foi feita utilizando o creme base Lanette® constituído de cera Lanete, palmitato de octila, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, ácido etileno diamino tetracético (EDTA) dissódico, água deionizada, butilhidroxitolueno, vaselina líquida e silicone volátil. O creme de geoprópolis de abelha jandaíra (*M. subnitida*) foi manipulado na concentração de 10% a partir da amostra 6 (A6).

4.1.3 Animais

Na avaliação da atividade cicatrizante foram empregados 24 ratos Wistar adultos machos. Os ratos foram divididos em dois grupos (n = 12 animais/grupo): um grupo controle e um grupo experimental. Os animais pertencentes ao grupo experimental (GE) foram tratados com aplicação tópica do creme base Lanette® com 10% do extrato de geoprópolis de jandaíra (ESC6), e os animais pertencentes ao grupo controle (GC) receberam a aplicação tópica somente do creme base Lanette®. Os animais foram obtidos no biotério da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e mantidos em gaiolas de polipropileno (40 x 50 x 20 cm) forradas com maravalha. As gaiolas foram mantidas em sala com temperatura constante (23 a 26º C), umidade relativa do ar controlada e com ciclo de luz claro/escuro de 12h. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

4.1.4 Substâncias de referência, solventes e reagentes

Foram utilizadas neste estudo as seguintes substâncias de referência: β-sitosterol, rutina, fridelina, quercetina, quercetrina, mericitrina, ácido clorogênico, ácido oleanólico, ác. gálico, ác. elágico, ác. cumárico, ác. cinâmico, canferol, apigenina, luteolina, etilgalhato e vitexina que foram fornecidas pela Extrasynthese®. Os solventes adquiridos junto à Fisher® e Merck® foram: metanol, ácido acético, ácido fórmico, acetato de etila, tolueno e hexano foram. Já os reagentes Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio anidro e DPPH foram obtidos pela Merck® e Sigma®. Todos esses materiais foram disponibilizados pelo Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa .

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização morfológica das amostras de geoprópolis por microscopia óptica

As cinco amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida*, A1-A5, coletadas na região do semi-árido em abril/2013, foram caracterizadas morfologicamente. Primeiramente, as amostras foram analisadas macroscopicamente a "olho nu" e em seguida, com o auxílio do microscópio estéreo Olympus SZ61. A análise organoléptica avaliou os seguintes parâmetros: aroma, cor, sabor e consistência (BRASIL, 2001).

A análise microscópica foi realizada com as amostras em pó, que para isso foram trituradas em moinho (A10 Janke & Kunkel IKA® Labortechnik), com prévio congelamento (-8ºC) por um período mínimo de 12h. A análise do pó (0,5g) foi realizada segundo metodologia oficial da Farmacopéia Portuguesa 9 (FP9) com adaptações e consistiu na observação de lâminas usando como meio de montagem o hidrato de cloral (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2008). Realizou-se a contagem dos grãos de pólen em 30 campos por lâmina, em microscópio óptico (Olympus BX40) em aumento de 200x (leitura em zigue-zague). Assim, foi anotada a frequência dos grãos de pólen em cada amostra. A análise qualitativa foi realizada também sob microscopia óptica em aumentos de 200 e 400x com registros fotográficos.

A terminologia descritiva seguiu, na medida do possível, Barth e Melhem (1988), sendo os grãos de pólen caracterizados segundo o tamanho, a forma, as aberturas e a ornamentação. Foram adotadas as abreviaturas: DP = diâmetro polar e DE = diâmetro equatorial. Sempre que possível, houve adição de dados botânicos ao término de cada descrição. Outras estruturas encontradas, como tricomas e vasos, também foram reportadas. As fotomicrografias da análise macroscópica e microscópica foram feitas com máquina digital Olympus ColorView IIIu acoplada aos microscópios citados. As imagens foram processadas no software Olympus Cell D 2006 e quando necessário, melhoradas através do Adobe Photoshop CS6.

4.2.2 Análise química

4.2.2.1 Obtenção do extrato etanólico de geoprópolis

4.2.2.1.1 Amostras coletadas no assentamento Boa Fé/RN (A1-A5)

Após serem retiradas as sujidades aparentes, as amostras foram trituradas em moinho (A10 Janke & Kunkel IKA® Labortechnik) e divididas em 2 porções. Com a primeira porção produziu-se um extrato etanólico na proporção de 1:10 sob agitação em mesa agitadora (Edmund Bühler 7400 Tübingen – agitação 150/minuto durante 60 minutos). O volume necessário de álcool etílico 70% foi divido em 3 partes e adicionado em etapas. Adicionou-se a primeira parte do álcool etílico 70% e após 24h a amostra foi submetida à agitação por 60 minutos. Após sedimentação, o sobrenadante foi filtrado e reservado. Na sequência, adicionou-se as outras duas partes do etanol 70% seguindo o mesmo procedimento, resultando em um extrato etanólico de 3 extrações subsequentes. Esses extratos foram chamados extratos com cera (EC): EC1, EC2, EC3, EC4 e EC5, de acordo com a amostra utilizada.

Com a segunda porção de cada amostra, produziu-se um extrato etanólico na proporção de 1:10 através de maceração por sete dias (sob abrigo da luz). Durante os sete dias, o macerado foi agitado vigorosamente por alguns segundos, uma vez ao dia. Após esse período, filtrou-se o sobrenadante e o mesmo foi levado à geladeira (4°C) por 24 h e posteriormente ao freezer (-20°C) por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente filtrado (com papel filtro previamente seco e pesado), para retirada da cera. O papel filtro com cera foi levado à capela de exaustão por 1 h, para eliminação do excesso de solvente e em seguida, pesado.

Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador (Büchi, modelo R110) e após, mantidos em exsicador com sílica até peso constante. Esses extratos foram denominados extratos sem cera (ESC): ESC1, ESC2, ESC3, ESC4 e ESC5. O rendimento de cada extração foi calculado em relação à massa inicial de geoprópolis e expresso em percentagem. O papel filtro com cera foi pesado e a partir da massa inicial utilizada para fazer o extrato, calculou-se a percentagem de cera em cada amostra.

4.2.2.1.2 Amostra coletada na comunidade Pedra Branca/RN (A6)

As sujidades aparentes foram retiradas e a geoprópolis foi triturada em liquidificador e macerada a frio em álcool etílico 70% na proporção de 3:7, por sete dias (sob abrigo da luz). Durante os sete dias, o macerado foi agitado vigorosamente por alguns segundos, uma vez ao dia. Após isso, filtrou-se o sobrenadante e o extrato obtido foi levado à geladeira (4°C) por 24h e posteriormente ao freezer (-20°C) por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante, foi filtrado novamente (com papel filtro previamente seco e pesado) para retirada da cera. O papel de filtro com cera foi levado à capela de exaustão por 1 h, para eliminação do excesso de solvente e em seguida, foi pesado.

Através da técnica de concentração sob pressão reduzida removeu-se o solvente do extrato (com o auxílio do rotaevaporador Fisatom, modelo 801), obtendo-se assim o extrato etanólico de geoprópolis. O rendimento da extração foi calculado em relação à massa inicial de geoprópolis e expresso em percentagem. Uma porção do extrato etanólico bruto foi submetido à liofilização (Liolab 3000 Heto) para análises químicas. Esta amostra foi chamada ESC6. O papel filtro com cera foi pesado e a partir da massa inicial utilizada para fazer o extrato, calculou-se a percentagem de cera nessa amostra.

4.2.2.1.3 Amostra coletada na zona metropolitana de Mossoró/RN (A7)

A amostra coletada na zona metropolitana de Mossoró sofreu o mesmo processo extrativo da amostra 6, com exceção do álcool utilizado, que foi o álcool de cereais. Esta amostra não foi submetida ao processo de retirada da cera e foi denominada, portanto, de EC7.

Através da figura a seguir é possível visualizar o esquema de preparo dos extratos e os demais ensaios realizados neste trabalho (Figura 8).

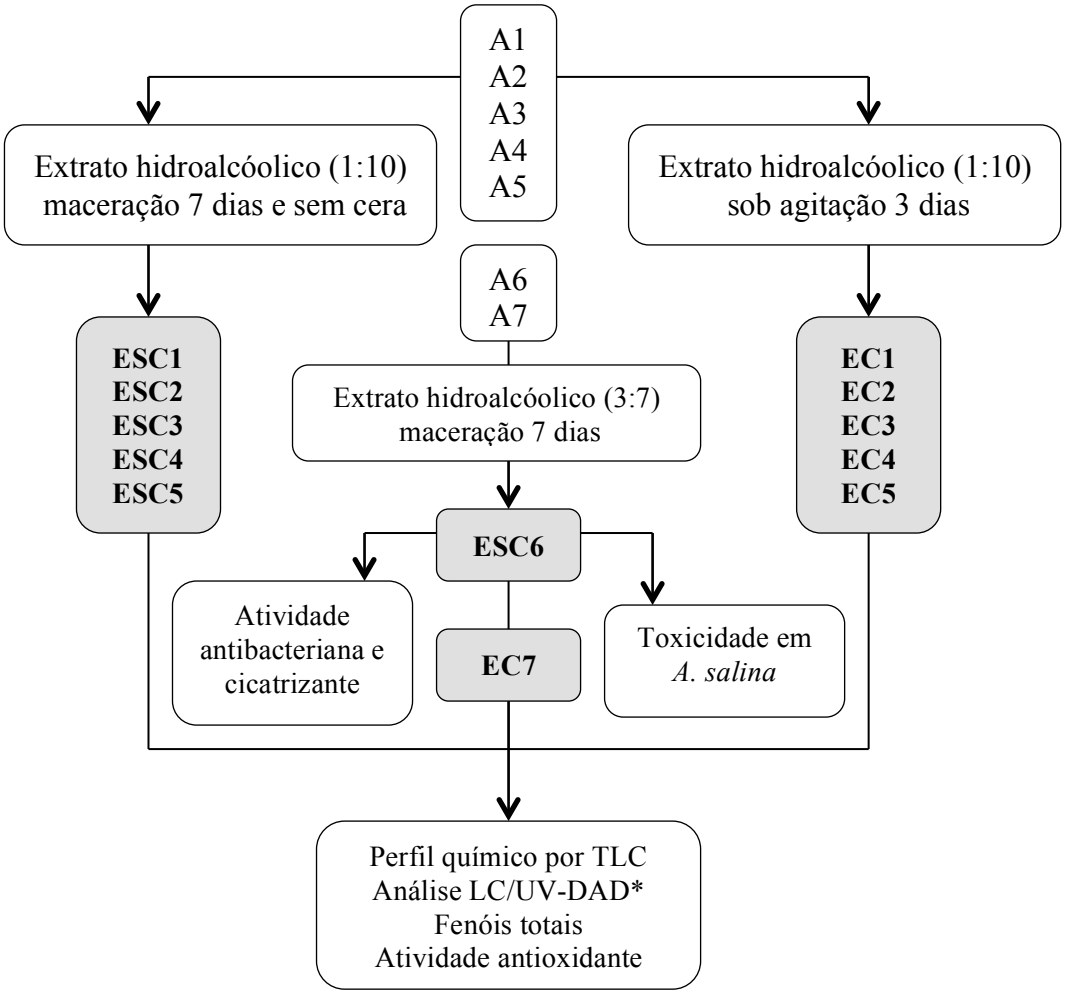


Figura 8 – Delineamento experimental, com preparo dos extratos e ensaios aplicados. *A análise através de LC/UV-DAD foi realizada somente com os extratos ESC1-6.

4.2.2.2 Caracterização fitoquímica preliminar por reação em tubo[3]

O extrato etanólico da geoprópolis de jandaíra (ESC6) foi submetido à prospecção fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (MATOS, 2009). Esta avaliação é útil para direcionar trabalhos posteriores de fracionamento, isolamento e caracterização de substâncias. Dessa forma, usou-se: A) cloreto férrico para fenóis simples e taninos; B) teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides; C) teste de acidulação e alcalinização com aquecimento para teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides; leucoantocianidinas, catequinas e

[3] Essa análise foi realizada apenas com o extrato ESC6.

flavonas; D) ácido clorídrico (HCl) com aquecimento para confirmação de catequinas; E) reagente de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado) para esteróides e triterpenóides e F) espuma persistente para saponinas. O grau de presença do grupo funcional no extrato foi estabelecido como forte (+++), médio (++), fraco (+) ou ausente (-) de acordo com a intensidade de coloração/outra reação visualizada (MATOS, 2009).

4.2.2.3 Estabelecimento do perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A caracterização das amostras foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (em inglês: *Thin Layer Chromatography* – TLC), utilizando para fins comparativos substâncias de referência. As amostras (10 μL/mL em metanol) e as substâncias de referência foram aplicadas em igual volume (10 μL), nas placas cromatográficas (Merck®). Cinco diferentes condições experimentais foram executadas afim de se obter a mais adequada para as amostras de geoprópolis (Tabela 1). As placas foram visualizadas no visível e sob luz UV 254 e 366 nm antes e após serem reveladas.

Utilizou-se, como parâmetros de avaliação, a comparação do fator de retenção (Rf) e a cor de fluorescência desenvolvida na sequência de reveladores empregados para a detecção do perfil cromatográfico dos extratos. Ao final, comparou-se os extratos das amostras com cera (EC) e sem cera (ESC) utilizando a condição experimental com melhor resolução e por fim, avaliou-se a presença das substâncias de referência: β-sitosterol, rutina, fridelina, quercetina, quercetrina, mericitrina, ácido clorogênico, ácido oleanólico, ác. gálico, ác. elágico, ác. cumárico, ác. cinâmico, canferol, apigenina, luteolina, etilgalhato e vitexina.

Tabela 1 – Diferentes condições cromatográficas testadas, com indicação do tipo de placa, sistema eluente, revelador e substância de referência.

Condição Cromatográfica	Placa	Fase móvel	Substâncias referência	Sistema revelador[4]
1	Sílica gel F254	Acetato de etila/ ác. fórmico/ água (60:10:10)	Quercetina	NEU
			β-sitosterol	Liebermann-Burchard
2	Celulose	Ácido acético 6%	Ác. gálico + ác. elágico	*Fast blue salt*
			Ác. clorogênico	Vanilica clorídrica
3	Celulose	Ác. acético 45%	Rutósido	NEU*
			Canferol	NEU
4	RP-18	Metanol/ água (80:20)	Ác. clorogênico	NEU
				Liebermann-Burchard
5	Sílica gel F254	Tolueno/ acetato de etilo (90:10)	Ác. oleanólico e β-sitosterol	Anisaldeído
			Fridelina	Dragendoff*

*Não intencionalmente, revelou-se a placa com rutósido (condição 3) com Dragendoff e a placa com fridelina com Liebermann-Burchard (condição 5). No entanto, estas trocas não impediram verificar a presença de alcalóides e compostos fenólicos nas amostras.

4.2.2.4 Caracterização das amostras de geoprópolis de jandaíra (LC/UV-DAD)

Todos os extratos etanólicos de geoprópolis, com exceção daqueles em que não retirou-se a cera (EC), foram caracterizados quimicamente por LC/UV-DAD usando um cromatógrafo líquido Waters 996, equipado com detector de matriz de díodos (DAD). O sistema foi controlado por computador, utilizando o *software* Millenium 32. Utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa (C_{18}) Waters Symmetry (com partículas de 5µm e dimensões de 3,9 x 20mm) e uma pré-coluna com a mesma fase estacionária, ambas mantidas à temperatura de 35º C. Como fase móvel utilizou-se a mistura dos solventes: A) metanol e B) água (0,1% ácido fórmico) e um gradiente de 35% de A em 0 min., 50% A em 6 min., 65% A em 33 min., 100% de A dos 38 aos 45 minutos de análise. O fluxo foi de 1 mL/min e o cromatograma *maxplot* de cada amostra foi registrado. As amostras foram diluídas em uma solução de metanol/água (80:20) na concentração de 2,5 mg/mL e o volume de injeção foi de 20µL. As substâncias de referência utilizadas foram ácido gálico, ácido elágico, apigenina, canferol, quercetina e etilgalhato, diluídas em metanol na concentração de 1mg/mL. Todas as soluções foram preparadas com metanol grau HPLC e água ultrapura e filtradas em algodão

[4] (Wagner e Bladt, 1996).

(previamente desengordurado com hexano) com auxílio de pipetas de Pasteur.

4.2.2.5 Quantificação dos fénois totais

A concentração de compostos fenólicos nos extratos de geoprópolis foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu modificado (SCALBERT, MONTIES e JANIN, 1989). O ácido gálico (Sigma-Aldrich) (0; 30; 60; 75; 90; 105; 120 mg/L) foi usado para construção da reta de calibração. 2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água 1:10 v/v) foram misturados com 1,6 mL de solução de carbonato de sódio (75 g/L) e 0,4 mL do extrato de geoprópolis (0,1 mg/mL em metanol). Após 2h de incubação a temperatura ambiente e sob abrigo da luz, mediu-se a absorvância das amostras a 765 nm, em triplicata, utilizando cubetas de quartzo, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, exceto a amostra. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE) e em seguida fez-se o cálculo em percentagem (teor de fenóis totais).

4.2.3 Atividades biológicas

4.2.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade sequestrante do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), Sigma-Aldrich, através do método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com adaptações. Adicionou-se 0,1 mL da solução metanólica de geoprópolis (concentrações testadas 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0 mg/mL) a 3,9 mL de uma solução de DPPH $6x10^{-5}$M e após 60 minutos, a absorvância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda 515nm. O mesmo procedimento foi realizado com solução padrão de ácido ascórbico nas concentrações: 0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0 µg/mL. As leituras foram realizadas em triplicata e o metanol foi utilizado como branco. Todos os extratos, com e sem cera, foram testados. Os resultados foram primeiramente expressos como curva do DPPH, concentrações testadas *versus* percentagem de inibição[I]. Após obtenção da equação da reta (y = ax + b) calculou-se a concentração da amostra/padrão capaz de inibir em 50% o radical DPPH ($IC_{50\%}$), substituindo o y da equação por 50.

$$^{I}\%\ \text{inibição} = \left(\frac{\text{Abs. branco - Abs. amostra}}{\text{Abs. branco}}\right) \times 100$$

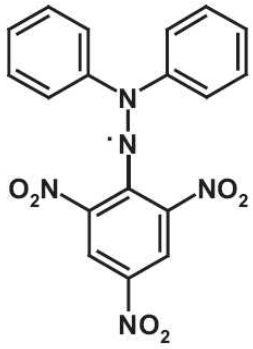


Figura 9 – Radical DPPH.

4.2.3.2 Atividade antibacteriana *in vitro*[5]

Para avaliação da atividade antibacteriana da amostra ESC6 utilizou-se o método de difusão em ágar Mueller Hinton (AMH) pela técnica de perfuração (OSTROSKY et al., 2008). A partir do ESC6, foram obtidas as seguintes diluições: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL e 1,5625 mg/mL, em álcool etílico 70%. As estirpes bacterianas utilizadas foram provenientes de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC), devidamente caracterizadas morfologicamente, fisiologicamente e bioquimicamente. São elas: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), após semeadura prévia em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*).

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes destes microrganismos (entre 18-24h a 37°C) e foram, posteriormente, suspensos em solução de salina peptonada estéril para obter turvação idêntica à do tubo número 0,5 da escala Mac Farland (6 x 10^8 microrganismos/mL) (KONEMAN e CURY, 2001). Com auxílio de *swabs* esterilizados, a suspensão foi inoculada nas placas de AMH, em três direções, como já padronizado (WAYNE, 2008). Após completa absorção do inóculo pelo ágar, este foi perfurado com ponteiras de 200µL, estéreis e invertidas, obtendo-se poços de 5mm. Aos poços, foi então adicionado 1 gota do AMH para cobrir o fundo destes e, após endurecimento do ágar, adicionou-se 40µL das diferentes concentrações do extrato. As placas foram deixadas em

[5] Realizada somente com o extrato ESC6.

repouso até a completa absorção do extrato pelo ágar. Em seguida, foram incubadas de forma invertida, a 37°C, por 24 horas.

O experimento foi realizado em triplicata e a atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando houve desenvolvimento de halo de inibição circundando os poços contendo as diferentes concentrações do extrato de geoprópolis. Como controle positivo empregou-se discos do antibiótico Gentamicina (10µg) e como negativo, 40µL de álcool etílico 70%. Os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro e expressos em milímetros (WAYNE, 2008) (Figura 10). Posteriormente, as medidas repetidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, já os dados não paramétricos, foram submetidos pelo teste de Friedman, considerando significância de 5%.

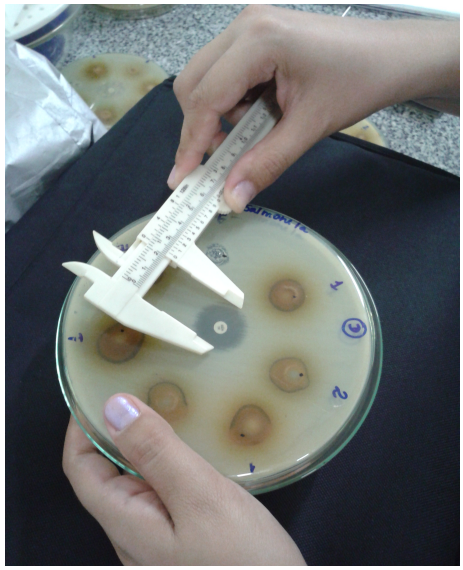


Figura 10 – Leitura dos halos de inibição com auxílio de um paquímetro.

4.2.3.3 Atividade cicatrizante *in vivo*[6]

O ESC6 de geoprópolis de jandaíra foi incorporado no creme base Lanette® na concentração de 10% para aplicação tópica nos animais do GE. Os animais pertencentes ao GC foram tratados somente com o creme base Lanette®.

No dia 0 realizou-se as feridas cutâneas. Para isso, os animais foram anestesiados com anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (8,0 mg/kg) e cloridrato de quetamina (140 mg/kg), administrada por via intramuscular. Após anestesia, foram feitas tricotomia,

[6] Realizada somente com o ESC6.

antisepsia com álcool iodado 2% no local cirúrgico e demarcação da área da ferida, com auxílio de um marcador vazado circular de 1 x 1 cm de diâmetro. A área da pele demarcada foi então incidida com lâmina de bisturi nº 15 e divulsionada da tela subcutânea com tesoura romba e pinça de dissecção, ficando exposta a fáscia muscular. O creme foi aplicado imediatamente após cirurgia e, posteriormente de 12/12h com auxílio de espátulas de madeiras estéreis e individuais, em quantidade suficiente para cobertura total das lesões (Figura 11).

Em todos os animais as lesões cutâneas foram observadas diariamente quanto à presença de hiperemia, edema, sangramento, secreção, odor e crostas (análise macroscópica). As áreas das feridas foram medidas nos diâmetros maior e menor empregando-se paquímetro no dia 0 (dia de produção das lesões cutâneas) e nos 3º, 7º e 14º dias pós-operatório. Concomitante à mensuração da área da lesão, os ratos (n=4, tanto do grupo experimental, como do grupo controle) foram anestesiados profundamente com cloridrato de xilazina (50mg/mL) e cloridrato de cetamina (200mg/mL) administrado por via intramuscular, e eutanasiados com a associação do cloreto de potássio (3mL) intracardíaco. Incisões abrangendo a área da lesão e pele íntegra foram realizadas em cada animal. Os fragmentos foram fixados em formalina a 10% e submetidos à inclusão em parafina, para obtenção de cortes de 5 μm de espessura e corados pelo método de hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

A quantificação dos componentes histológicos da cicatrização foi realizada através de microscopia óptica (microscópio Olympus modelo BX50 – aumento de 200x), na qual, para cada dia (3º, 7º e 14º), quatro imagens representativas e de mesmo tamanho foram captadas através de câmera digital e enviadas ao computador para estudo da densidade média das células inflamatórias (polimorfonucleares e macrófagos), vasos sanguíneos, fibroblastos e colágeno dos grupos GC e GE, através do programa Image Pro Plus, versão 6.0 para Windows. Visando à obtenção da área das feridas utilizou-se a equação formulada por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot R. r$, onde "A" representa a área (cm²); "R", o raio maior e "r", o raio menor. O grau de contração expresso em percentual foi mensurado pela equação proposta por Ramsey et al. (1995), onde Wo = área inicial da ferida e Wi = área da ferida no dia da biópsia:

$$\% \text{ contração} = \left[\frac{(Wo - Wi)}{Wo}\right] \times 100$$

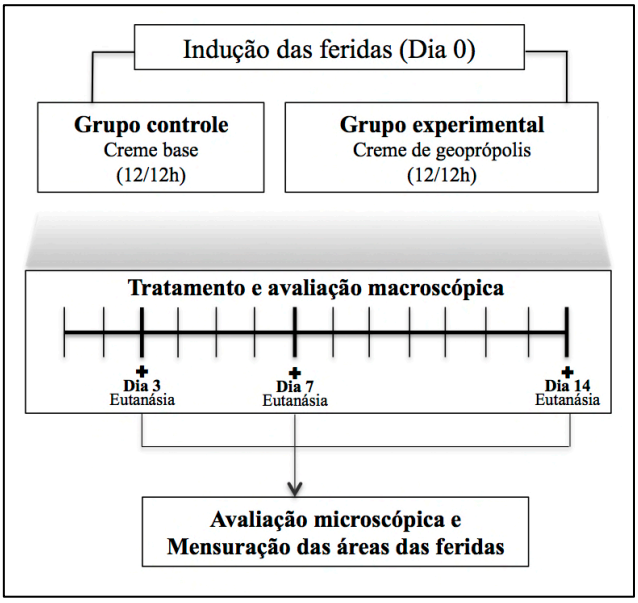


Figura 11 – Delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante.

Os dados da área da ferida, do grau de contração e os componentes histológicos foram expressos em média ± desvio padrão e avaliados pelo programa SigmaPlot for Windows SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.0. Todos os dados foram primariamente avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade da variância por Levene. As diferenças estatísticas entre os grupos experimental e controle quanto à contração, áreas das feridas e número de componentes histológicos no decorrer dos dias foram obtidas por Análise de variância (Two way ANOVA) seguido por Tukey. Quando necessário utilizou-se transformação logarítmica para garantir os pressupostos paramétricos. As variáveis percentuais, como contração da ferida, sofreram transformação arcoseno. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2.4. Ensaio toxicológico preliminar *in vitro*[7]

A atividade citotóxica do extrato etanólico ESC6 foi avaliada através do teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer et al. (1982), com algumas modificações. Ovos do microcrustáceo *Artemia salina* foram incubados em água do mar artificial[8] à temperatura ambiente por 48 horas. Com a ajuda de uma fonte de luz, as larvas foram atraídas e coletadas (Figura 12). As soluções de geoprópolis foram

[7] Realizado somente com o ESC6.

[8] A água do mar artificial é obtida através da dissolução dos seguintes sais em 1L de água destilada: 15,153g de NaCl; 1,398g de $MgCl_2$; 1,888g de $MgSO_4$; 0,652g de $CaCl_2$; 0,414g de KCl; 0,116g de $NaHCO_3$.

preparadas com a amostra (ESC6), solvente (metanol), dimetil sulfóxido (DMSO) e água do mar em concentrações variando de 20-1000µg/mL. Dez (10) metanáuplios foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5mL de cada uma das soluções a serem testadas. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas. Os ensaios foram realizados em triplicata e a contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas. Por fim, através da equação da reta de calibração: número de larvas mortas *versus* concentrações testadas, realizou-se o cálculo da concentração capaz de matar 50% das larvas (CL_{50}) utilizando o programa estatístico Statplus (2009) pelo método Probit.



Figura 12 – Atração das larvas de *Artemia salina* pela fonte de luz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

5.1.1 Análise macroscópica

Na condição de produto apícola, a identidade e qualidade da própolis é regulamentada pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001). Apesar da legislação vigente ser voltada para a própolis obtida pela abelha *Apis mellifera,* seguimos os parâmetros especificados. Em relação à análise organoléptica, as amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* apresentavam-se de acordo com a legislação. As cinco amostras (A1-A5) exibiam aspecto heterogêneo e consistência rígida à temperatura ambiente (Figura 13a-e). A amostra A3, no entanto, se apresentou como a "mais maleável". As amostras mostravam aroma característico, sabor suave balsâmico e coloração predominantemente marrom escura. As amostras A1, A4 e A5 apresentavam algumas áreas de coloração amarelo-esverdeada (Figura 14h).

5.1.2 Análise com o auxílio do microscópio estereoscópico Olympus SZ61

Uma análise macroscópica é sempre requerida com o intuito de eliminar eventuais impurezas das amostras de própolis, tais como pedaços de madeira, cera, pólen e partes de insetos (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Nesse sentido, um microscópio estéreo (Olympus SZ61) é um excelente aliado na revelação dessas impurezas. As Figuras 14a e 14b mostram detalhes da amostra A1. Na Figura 14a pode-se observar um fio de algodão agarrado à amostra (seta amarela) e na Figura 14b um pouco de cera adicionada à geoprópolis. As Figuras 14c e 14d mostram detalhes da amostra A2. Nesta amostra observam-se áreas com maior quantidade de cera (Figura 14c) e áreas com maior quantidade de resinas (Figura 14d).

As Figuras 14e e 14f mostram detalhes da amostra A3 e as Figuras 14g e 14h mostram detalhes da amostra A4. A Figura 14g mostra uma porção de terra adicionada à geoprópolis, já a Figura 14h mostra uma área com coloração amarelo-esverdeada. As Figuras 14i-l mostram detalhes da amostra A5. Alguns fragmentos de tecidos vegetais foram encontrados nessa amostra (Figura 14i – fragmento de madeira (seta amarela), j e k). A Figura 14l mostra porções de terra incluídas à geoprópolis. A amostra A5 estava infestada com algum micro-

organismo de coloração branca que não foi possível ser identificado.

Em relação a esses aspectos, a legislação brasileira prevê que a própolis não deve conter substâncias estranhas, com exceção de fragmentos, acidentalmente presentes de: abelhas, madeira, vegetais e outros, inerentes ao processo de obtenção da própolis pelas abelhas (BRASIL, 2001). Nesse sentido, a amostra A5 estaria inadequada para uso.

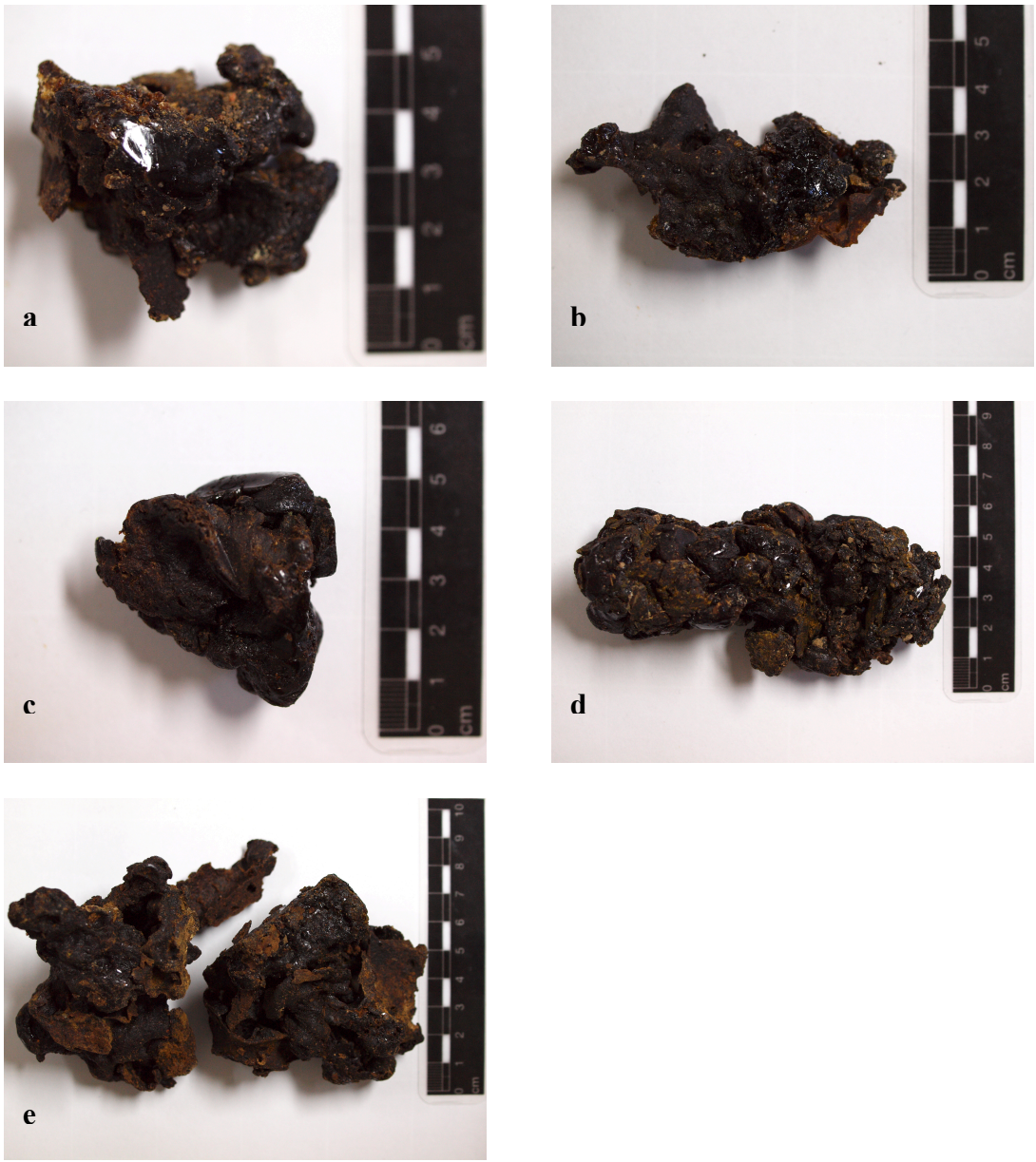
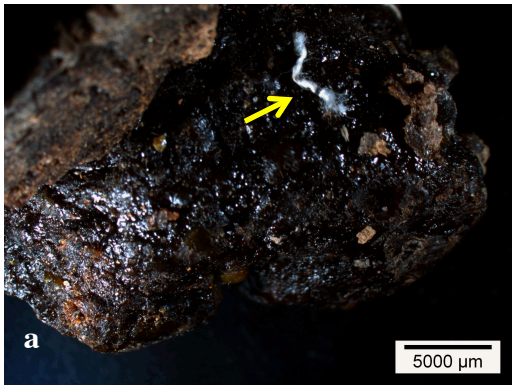
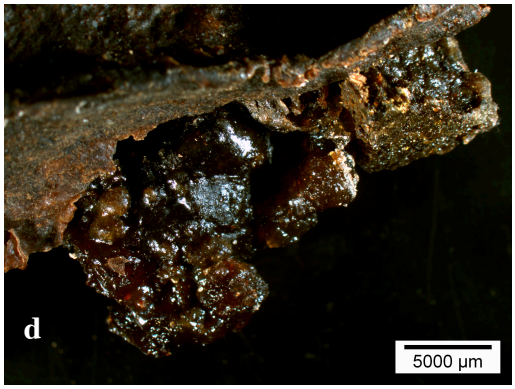


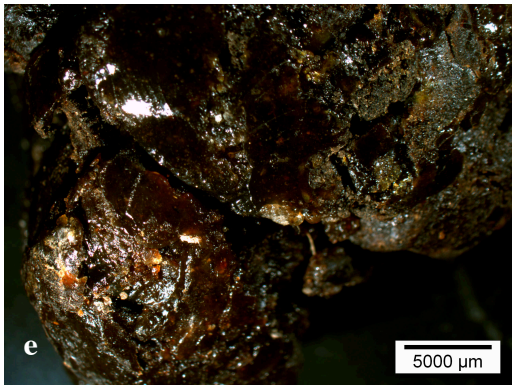
Figura 13 – Amostras A1 (a), A2 (b), A3 (c), A4 (d) e A5 (e).

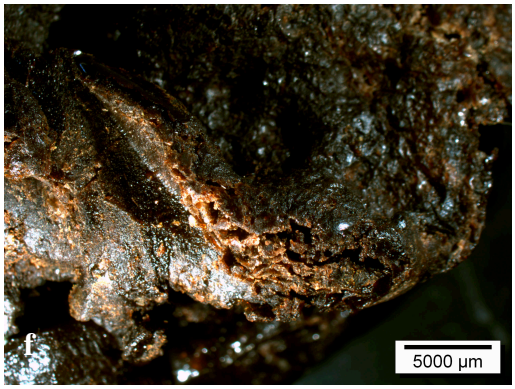

a
5000 µm

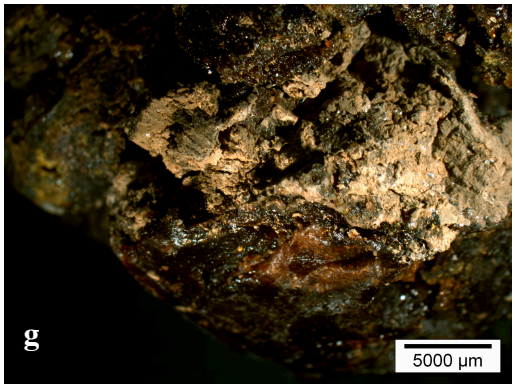

b
5000 µm

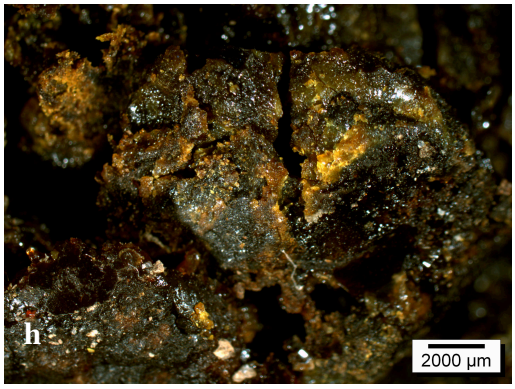

c
5000 µm


d
5000 µm


e
5000 µm


f
5000 µm


g
5000 µm


h
2000 µm

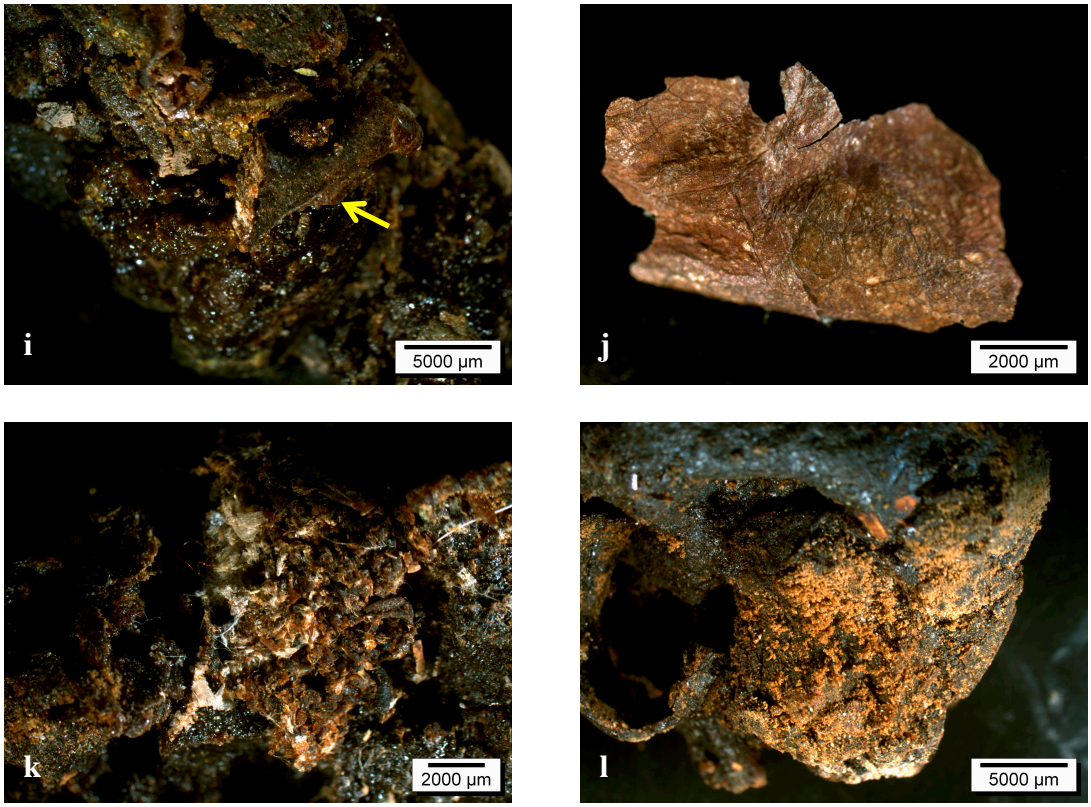


Figura 14 – Detalhes das amostras A1 (a, b), A2 (c, d), A3 (e, f), A4 (g, h) e A5 (i, j, k, l).

5.1.3 Análise microscópica

5.1.3.1 Análise qualitativa

São apresentados a seguir as descrições taxonômicas de 19 palinomorfos encontrados nas amostras A1-A5.

Figura 15a e Figura 15b:

Grãos de pólen tétrades (tetraédricas), compostos por grãos pequenos, heteropolares, radiossimétricos, subprolatos, circulares a elípticos, apresentando ornamentação psilada. Poros não evidenciados. Dimensões: DP = 23 μm e DE = 20 μm. Dados botânicos: Família Leguminosa Mimosoideae.

Figura 15c:

Grãos de pólen em políades, compostas por grãos muito pequenos (cerca de 8 grãos) dispostos irregularmente, heteropolares, radiossimétricos, subprolatos, elipsoidais e ornamentação psilada. Poros não evidenciados. Dimensões: DP = 23 μm e DE = 18 μm. Dados botânicos: Família Leguminosa Mimosoideae.

Figura 15d:

Grãos de pólen mônades, médios, apolares, radiossimétricos, circulares, esferoidais, tricolporados, exina espessa e ornamentação psilada a escabrada. Dimensões: DP = 46 μm e DE = 44 μm. Dados botânicos: Família Onagraceae.

Figura 15e e 15f:
Grãos de pólen mônades, pequenos, isopolares, radiossimétricos, prolato-esferoidais, circulares, biporados, exina tectada e ornamentação psilada a levemente escabrada. Dimensões: DP = 21-22 μm e DE = 19 μm. Dados botânicos: Família Ulmaceae.

Figura 15g:

Grãos de pólen mônades, pequenos, apolares, radiossimétricos, circulares, estefanocolporados (cerca de 9 cólporos), exina tectada e ornamentação escabrada. Dimensões: DP = 22 μm e DE = 23 μm. Dados botânicos: Família Euphorbiaceae.

Figura 15h:

Grãos de pólen mônades, médios, isopolares, radiossimétricos, prolato-esferoidais, tetracolporados e ornamentação levemente reticulada. Dimensões: DP = 50 μm e DE = 40 μm. Dados botânicos: Família Combretaceae.

Figura 15i:

Grãos de pólen mônades, médios, apolares, radiossimétricos, circulares, estefanocolporados (cerca de 9 cólporos), exina tectada e ornamentação microequinada. Dimensões: DP = 33-34

μm e DE = 33-34 μm. Dados botânicos: Tipo polínico *Borreria verticillata* (Família Rubiaceae).

Figura 15j:

Grãos de pólen mônades, médios, isopolares, radiossimétricos, circulares, prolato-esferoidais, pantoporados e ornamentação verrucata (levemente pontiaguda). Dimensões: DP = 49 μm e DE = 46 μm. Dados botânicos: Família Malvaceae.

Figura 15k:

Grãos de pólen mônades, pequenos, isopolares, subprolatos, circulares, poros não evidenciados e ornamentação psilada a levemente escabrada. Dimensões: DP = 16 μm e DE = 14 μm. Dados botânicos: Família Smilaceae.

Figura 15l:

Grãos de pólen mônades, pequenos, heteropolares, radiossimétricos, triangulares, tricolporados e ornamentação escabrada. Dimensões: DP = 16 μm e DE = 13 μm. Dados botânicos: Família Myrtaceae.

Figura 15m:

Grãos de pólen mônades, médios, apolares, radiossimétricos, circulares, esferoidais, poros equatoriais, tetracolpados, exina tectada e ornamentação psilada a levemente escabrada. Dimensões: DP = 28 μm e DE = 29 μm. Dados botânicos: Família Meliaceae.

Figura 15n:

Grãos de pólen mônades, médios, apolares, radiossimétricos, circulares, esferoidais, poros não evidenciados e ornamentação escabrada. Dimensões: DP = 31 μm e DE = 30 μm. Dados botânicos: Família Poaceae.

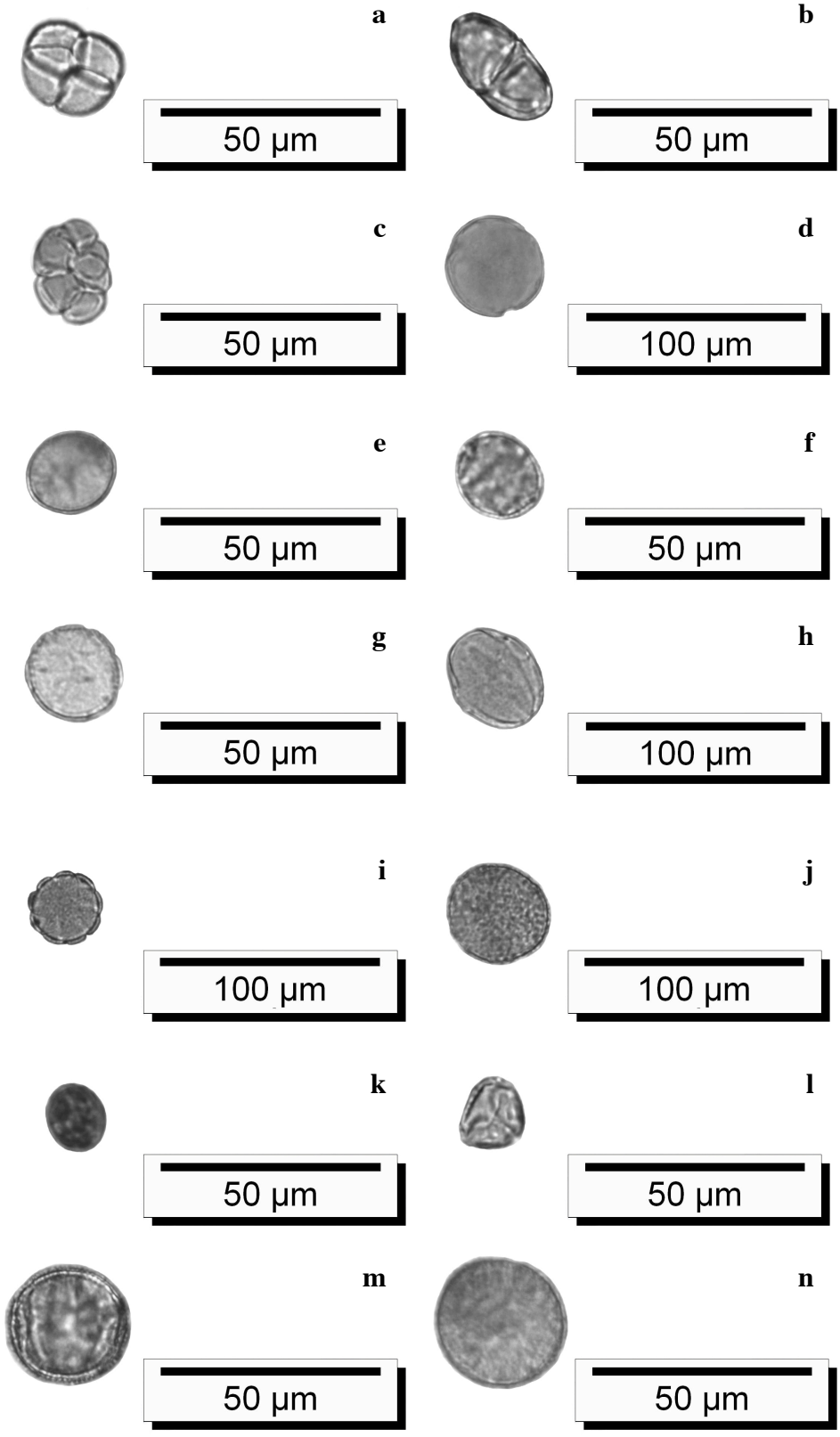


Figura 15 – Grãos de pólen encontrados em amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida*. Grãos de pólen das Famílias: Leguminosa Mimosoideae (a, c – vista equatorial e b – vista lateral), Onagraceae (d), Ulmaceae (e – superfície, foco baixo e f – superfície foco alto), Euphorbiaceae (g), Combretaceae (h), tipo polínico *Borreria verticillata* (i), Malvaceae (j), Smilaceae (k), Myrtaceae (l), Meliaceae (m) e Poaceae (n).

Figura 16a:

Grãos de pólen mônades, médios, isopolares, radiossimétricos, circulares, prolato-esferoidais, poros não evidenciados e ornamentação escabrada. Dimensões: DP = 35 μm e DE = 33 μm. Dados botânicos: Família Dilleniaceae.

Figura 16b:

Grãos de pólen mônades, médios, isopolares, radiossimétricos, circulares, prolato-esferoidais, poros não evidenciados e ornamentação escabrada a verrucata. Dimensões: DP = 31 μm e DE = 27 μm. Dados botânicos: Família Dilleniaceae.

Figura 16c:

Grãos de pólen mônades, médios, heteropolares, radiossimétricos, triangulares, tricolporados e ornamentação psilada a escabrada. Dimensões: DP = 32-33 μm e DE = 26-28 μm. Dados botânicos: Família Arecaceae.

Figura 16d:

Grãos de pólen mônades, médios, apolares, radiossimétricos, circulares, esferoidais, bicolpados, pantoporados, com ornamentação verrucata (levemente pontiaguda). Dimensões: DP = 47 μm e DE = 47-48 μm. Dados botânicos: Família Arecaceae.

Figura 16e e 16f:

Grãos de pólen mônades, médios, isopolares, radiossimétricos, circulares, subprolatos a prolatos, com seis cólporos, exina tectada e ornamentação escabrada a levemente verrucata. Dimensões: DP = 51 μm e DE = 37 μm. Dados botânicos: Família Lamiaceae.

Figura 16g e 16h:

Grãos de pólen mônades, grandes, apolares, radiossimétricos, circulares, pantoporados e ornamentação echinata (Espinhos de formato cônico, com a base columelada). Dimensões: DP = 69-70 μm e DE = 68-73 μm. Dados botânicos: Família Arecaceae.

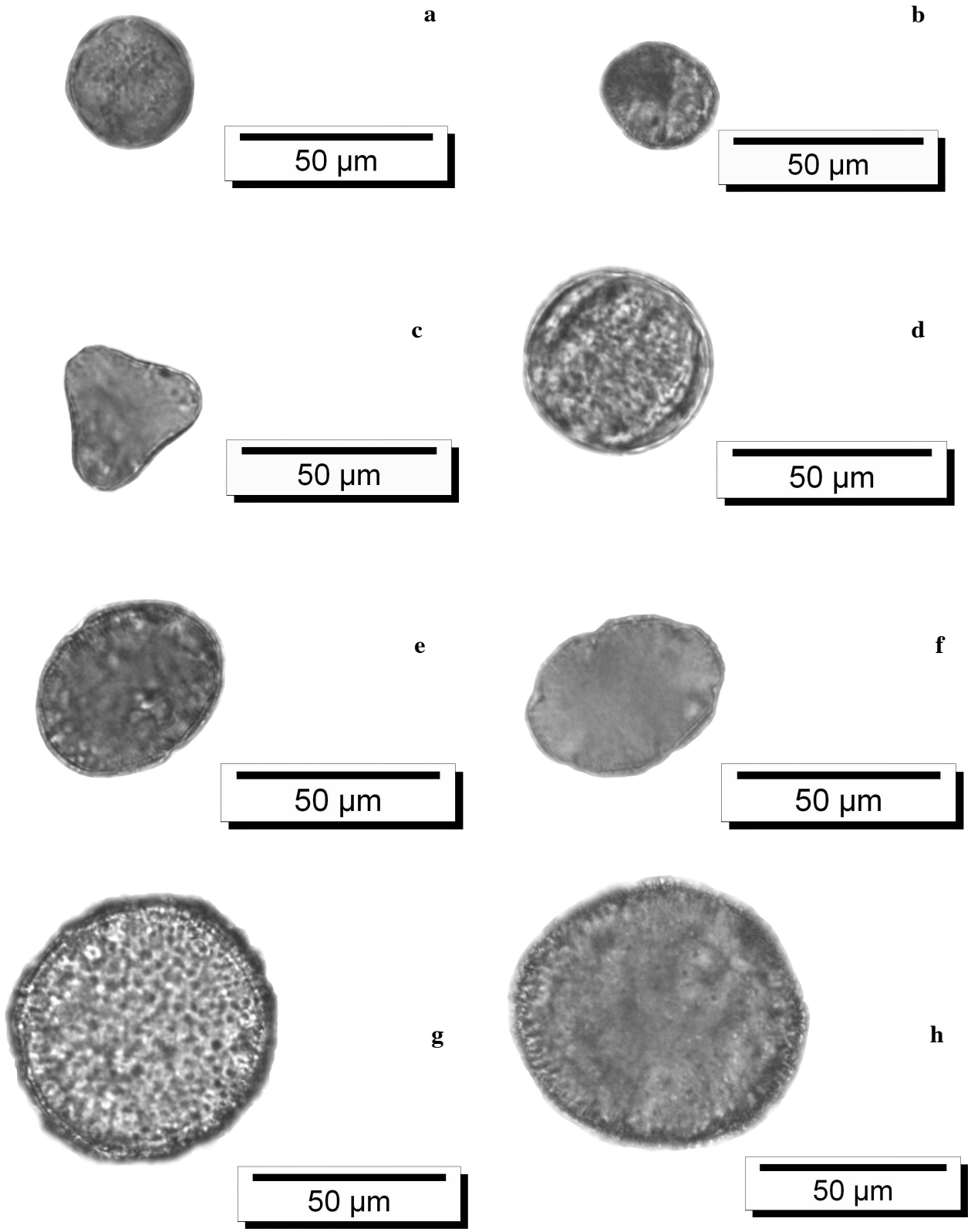
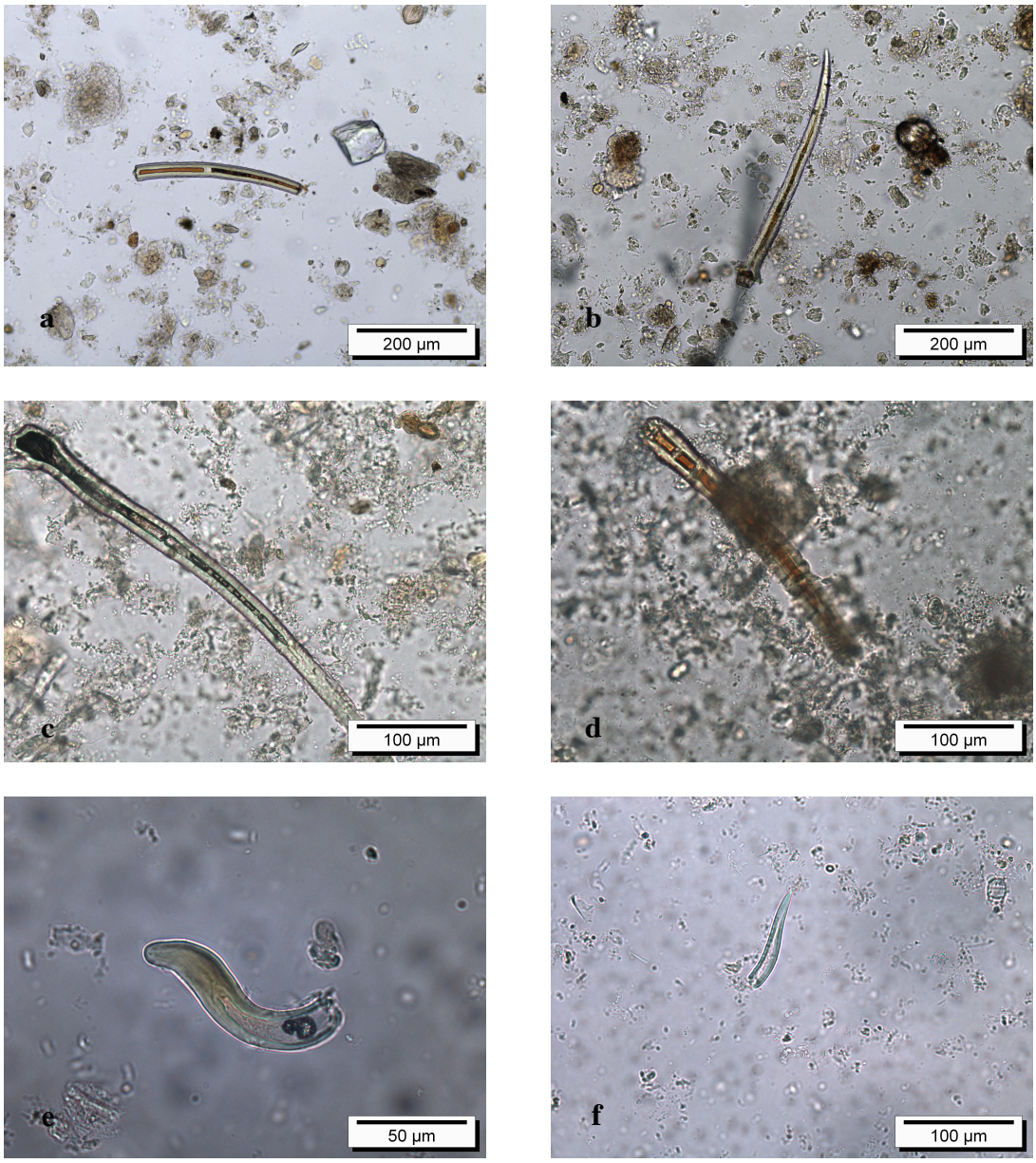


Figura 16 – Grãos de pólen encontrados nas amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida*. Famílias: Dilleniaceae (a, b), Arecaceae (c, d, g – superfície foco alto, h – superfície foco baixo), Lamiaceae (superfície, foco alto – e; foco baixo – f).

Todas as amostras de geoprópolis analisadas apresentavam tricomas (Figura 17b, c, d). Cristais de oxalato de cálcio foram observados apenas em uma amostra (Figura 17a) e material orgânico foi encontrado com pouca frequência (Figura 17h). Cabe aqui mencionar que hifas e esporos de fungos não foram encontrados.



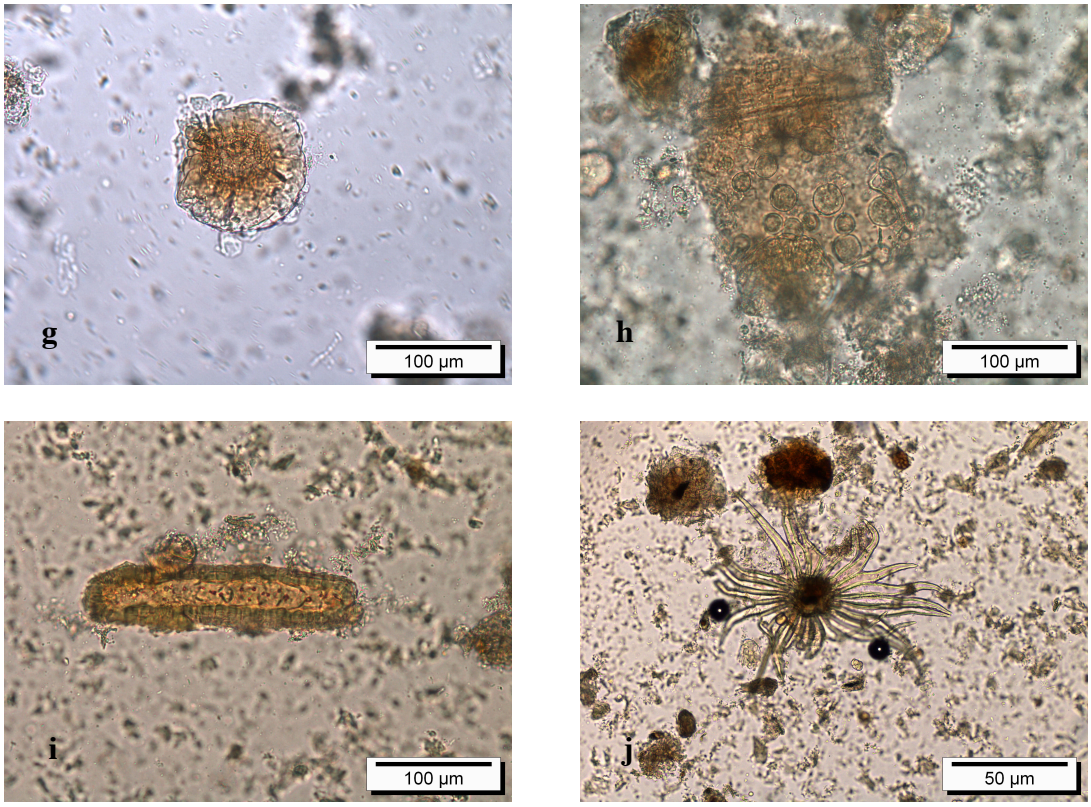


Figura 17 – Outras estruturas encontradas nas amostras de geopópolis de *Melipona subnitida*. Cristais de oxalato (a) e tricoma (b) encontrados em A1. Tricomas encontrados em A2 (c, d, e). Pequeno tricoma (f) em A3. Materiais orgânicos encontrados em A4 (g e h). Vaso (i) e conjunto de pequenos tricomas (j) encontrados em A5.

5.1.3.2 Análise quantitativa

A Tabela 2 mostra os resultados da análise quantitativa:

Tabela 2 – Frequência dos grãos de pólen: PI (Pólen isolado) 3–15%; PA (Pólen acessório) 15–45%; PD (Pólen dominante) > 45%.

Pólen	Amostra									
	A1		A2		A3		A4		A5	
	%	Classif.	%	Classif.	%	Classif.	%	Classif.	%	Classif.
15a/b	37,5	PA	14,42	PI	15,68	PA	22,83	PA	13,28	PI
15c	22,92	PA	58,65	PD	54,90	PD	38,89	PA	48,96	PA
15d	2,78		3,36	PI	4,90	PI	2,47		5,39	PI
15e/f	4,16	PI	7,69	PI	3,92	PI	19,75	PA	11,20	PI
15g	24,31	PA	4,81	PI	12,75	PI	5,56	PI	14,52	PI
15h	2,78		2,40		1,47		1,23		1,66	
15i	2,43		1,41		2,94		1,85		0,41	
15j	1,38		0,96		0,49		-		0,41	
15k	0,35		4,80	PI	-		-		-	
15l	0,69		-		1,47		1,23		0,41	
15m	-		-		0,49		-		-	
15n	-		-		-		3,09	PI	-	
16a	-		-		-		-		1,24	
16b	-		-		-		-		0,83	
16c	-		0,48		-		-		-	
16d	-		-		-		1,23		-	
16e/f	-		-		-		1,23		0,83	
16g	0,69		0,96		0,98		0,62		0,83	

Os grãos de pólen com frequência entre 3-15% são considerados pólen isolados (PI), os grãos de pólen com frequência entre 15-45% são considerados acessórios (PA) e aqueles com frequência superior a 45% são considerados dominantes (PD). Cerca de 19 grãos de pólen foram identificados e descritos nas amostras analisadas; destes, apenas sete foram encontrados com frequência igual ou superior a 3% em pelo menos uma amostra e cinco foram frequentes em três ou mais amostras. Pólen dominante ocorreu somente nas amostras A2 e A3; possuindo estes grãos características da família Leguminosa Mimosoideae (Figura 15c). Nas amostras A2, A3 e A5, os pólen isolados foram mais frequentes que os pólen acessórios e o inverso ocorreu nas amostras A1 e A4. Os grãos de pólen das famílias Dilleniaceae, Euphorbiaceae, Onagraceae, Lamiaceae, Ulmaceae, Combretaceae, Rubiaceae, Poaceae, Malvaceae, Smilaceae, Meliaceae, Myrtaceae e Arecaceae também foram encontrados.

O conhecimento da fonte botânica de amostras de própolis pode contribuir na padronização de extratos e ainda, pode fornecer informações sobre sua composição química e prováveis atividades biológicas (FUNARI e FERRO, 2006). Contudo, a determinação de uma principal fonte botânica, por vezes é complicada, já que para formar uma única amostra de própolis as abelhas visitam diversas plantas (SALATINO et al., 2011).

Nesse estudo, duas (A2 e A3) das cinco amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* investigadas, apresentaram grãos de pólen característicos da família Leguminosa, subfamília Mimosoideae como pólen dominante (PD). E as outras três amostras (A1, A4 e A5) apresentaram grãos de pólen da subfamília Mimosoideae como pólen acessório (PA). Os grãos de pólen de Mimosoideae destacam-se por apresentar políades como principal tipo de unidade de dispersão, sendo comum a heterogeneidade no tamanho dos grãos de pólen (BURIL, SANTOS e ALVES, 2010).

Os dados apresentados nesta pesquisa corroboram com outros estudos de amostras de mel e pólen, indicando o forrageamento específico de *M. subnitida* (SILVA et al., 2006). A espécie *Mimosa caesalpiniifolia* (nome vulgar: "sabiá") foi o tipo de pólen dominante em oito de nove amostras de mel de *Melipona subnitida* coletado na Paraíba (SILVA et al., 2012). Um estudo melissopalinológico comparativo entre amostras de méis de *Melipona subnitida* e *Apis melifera*, obtidos no município de Jandaíra/RN, revelou que as espécies botânicas visitadas pelas duas abelhas foram diferentes. Enquanto os polén dominantes das amostras de *M. subnitida* foram do gênero *Alternanthera* sp. e da espécie *Mimosa verrucosa* (nome vulgar: "jurema branca"); a abelha *A. melifera* visitou três importantes espécies da subfamília Mimosaceae: *Mimosa verrucosa*, *Mimosa caesalpiniaefolia* (nome vulgar: "Sansão-do-campo", "sabiá") e *Piptadenia moniliformis* (nome vulgar: "catanduva", "angico-de-bezerro") (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013).

Em amostras de pólen de *Melipona subnitida*, coletadas diretamente das colmeias, grãos de polén da espécie *Mimosa gemmulata* (nome vulgar: "angiquinho") foram predominantes no pólen amarelo (98,95%), já grãos de polén da família Fabaceae foram predominantes no pólen de coloração clara (89,84%). No pólen de cor marrom, cinco taxas florais diferentes foram identificadas (SILVA et al., 2006). A análise palinológica de amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* obtidas no sertão da Paraíba, mostrou *Senna* - uma Leguminosa - como tipo polínico dominante (SOUZA, 2012). A própolis vermelha, encontrada em vários estados do nordeste (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba), também tem como principal fonte botânica outra Leguminosa, a *Dalbergia ecastophyllum*

(SILVA et al., 2008).

Na região do semi-árido de Mossoró/RN – local de coleta das amostras – há predominância de caatinga arbórea e hiperxerófila (GIULIETTI, PAULA e BARBOSA, 2004). No bioma caatinga, a família Leguminosae desponta como uma das mais representativas, inclusive com o maior número de espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2004). De acordo com os dados obtidos nesse estudo e com a revisão de literatura, podemos concluir que mesmo em um ambiente de flora rica (caatinga), a abelha nativa *Melipona subnitida* parece visitar apenas algumas espécies vegetais, especialmente aquelas pertencentes à subfamília Mimosoideae e outras da família Leguminosae.

5.2 ANÁLISE QUÍMICA

5.2.1 Obtenção do extrato etanólico de geoprópolis

O estudo químico da geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) foi realizado com sete amostras coletadas no município de Mossoró/RN. Nesse sentido, Sforcin e Bankova (2011) recomendam que, devido a grande variedade da própolis, estudos de composição química devem utilizar um número razoável de amostras – pelo menos três – coletadas de locais diferentes de uma mesma região geográfica.

Diversos solventes têm sido usados na extração de própolis, como água, etanol, metanol, hexano, acetona e clorofórmio. Dentre estes, o etanol 70% é o solvente mais comumente usado e o que produz extratos com maior rendimento (CUNHA et al., 2004), e foi usado na extração das amostras de geoprópolis neste estudo. A amostra A7 foi extraída com álcool etílico de cereais, que é produzido a partir do milho, soja ou arroz. Hoje, o álcool de cereais vem sendo amplamente empregado no Brasil na indústria de cosméticos, alimentos e farmacêutica, e inclusive na produção de extratos comerciais de própolis (BRASIL, 2001). Extratos aquosos de própolis já podem ser encontrados no mercado, mas enquanto a água dissolve cerca de 10% dos constituintes da própolis, o etanol 70% dissolve 50-70% de seus constituintes (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Com o intuito de verificar se havia diferença no perfil químico de amostras com e sem cera fez-se dois tipos de extratos das amostras A1-A5. Ao fim de cada extração calculou-se o rendimento e a percentagem de cera, considerando a massa inicial utilizada de cada amostra (Tabela 3).

Tabela 3 – Extratos produzidos com cada amostra e suas respectivas massas iniciais, rendimentos e % cera.

Amostra		Massa inicial (g)	Rendimento (%)	Cera (%)
A1	EC1	12,41	26,15	1,83
	ESC1	1,41	12,61	
A2	EC2	8,40	34,18	2,18
	ESC2	1,76	14,84	
A3	EC3	0,37	44,73	4,84
	ESC3	0,19	3,57	
A4	EC4	17,64	42,61	3,61
	ESC4	1,50	19,03	
A5	EC5	6,11	32,22	3,13
	ESC5	1,79	6,19	
A6	ESC6	386,0	7,43	15,95
A7	EC7	270,0	-	-

Os extratos com cera (EC) tiveram rendimento cerca de duas vezes maior que os extratos sem cera (ESC), com exceção das amostras A3 e A5, na qual a proporção foi cerca de 11 e 5 vezes maior, respectivamente. A retirada da cera dos extratos tem influência direta nesses resultados, além disso a extração com auxílio de mesa de agitação por 1h (no caso dos EC) parece ter contribuído no aumento do rendimento.

Para confecção dos extratos ESC6 e EC7, as amostras A6 e A7 foram trituradas em liquidificador, enquanto que as demais amostras foram trituradas através de moinho. Como o moinho produziu partículas finamente divididas (de densidade menor e volume maior), comparadas às partículas produzidas pelo liquidificador, a proporção de solvente de 3:7, inicialmente utilizada nos extratos ESC6 e EC7, não foi suficiente para extrair as amostras trituradas em moinho (A1-A5), sendo necessário aumentar a proporção para 1:10. O maior e o menor rendimento das extrações foi da amostra A3, tendo o EC3, 44,73% de rendimento e o ESC3, 3,57% de rendimento.

A amostra A6 foi a que possuía maior massa (386g) e maior percentagem de cera. Como foi submetida a um processo de trituração em liquidificador, o extrato obtido teve baixo rendimento, apesar da grande quantidade de massa inicial utilizada. Essa trituração diferenciada pode ter influenciado também na percentagem de cera (15,95%) que se mostrou bastante elevada na A6, em relação às demais. A A3, que na análise macroscópica (realizada somente com as amostras A1-5) exibiu aspecto pegajoso, característico da grande quantidade de cera, apresentou de fato, maior teor de cera (4,84%) dentre essas amostras. Não houve correlação significativa entre a massa inicial utilizada e o rendimento, bem como entre a

massa inicial e a percentagem de cera nas amostras que sofreram o mesmo processo extrativo, evidenciando a heterogeneidade das amostras – observada previamente na análise macroscópica.

Comumente, própolis possui cerca de 30% de ceras, mas o etanol não é capaz de extrair toda a cera das amostras (BANKOVA et al., 1992 apud SFORCIN e BANKOVA, 2011). Nesse estudo, as amostras analisadas apresentaram valores de percentagem de cera entre 1,83 a 15,95%. Assim, apesar da grande variação no teor de ceras, todas obtiveram valores dentro dos limites permitidos pelo Ministério da Agricultura, que é de no máximo 25%. Nesse sentido, as amostras de própolis que apresentam consistência rígida na avaliação macroscópica, presumivelmente terão baixo teor de ceras, sendo portanto, desejáveis (FUNARI e FERRO, 2006).

Como as amostras foram obtidas em períodos diferentes, não foi possível realizar todas as análises com todas as amostras. A abordagem fitoquímica foi realizada somente com o ESC6 e a TLC com as amostras A1-A5, A6 e A7. A análise LC/UV-DAD foi realizada com todos os extratos sem cera (ESC), já que por TLC verificou-se que estes apresentaram perfil qualitativo semelhante aos extratos com cera (EC), além disso, os ESC mostraram maior solubilidade na solução de metanol/água (80:20).

5.2.2 Caracterização fitoquímica preliminar por reação em tubo

A amostra de geoprópolis de jandaíra analisada (ESC6) apresentou-se rica em substâncias fenólicas, tais como: taninos hidrolisáveis ou pirogálicos, flavonas e xantonas. Apresentou, ainda, triterpenos pentacíclicos. Estes resultados estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 4 – Registro dos resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcóolico de geoprópolis de jandaíra proveniente da comunidade Pedra Branca/RN (ESC6).

Classes de metabólitos	Extrato etanólico
Fenóis	-
Taninos condensados	-
Taninos hidrolisáveis	+++
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	++
Chaconas e auronas	-
Flavonóis	-
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	-
Flavononas	-
Confirmação catequinas	-
Esteróides livres	-
Triterpenóides pentacíclicos	+++
Saponinas	-

Estes resultados estão em concordância com outros estudos realizados com outras amostras de própolis. De fato, amostras de própolis de *Apis mellifera* obtidas no estado Ceará, também contemplado pela caatinga, mostraram-se ricas em triterpenóides pentacíclicos livres (LIBERATO et al., 2008). As amostras da geoprópolis de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith), cultivadas no estado do Maranhão, mostraram-se ricas em triterpenos e compostos fenólicos (CUNHA et al., 2010).

5.2.3 Caracterização química por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Nos parágrafos seguintes são apresentados os resultados obtidos usando diferentes sistemas cromatográficos. A seguir, serão apresentados os resultados obtidos em cada uma das condições de TLC experimentais testadas. As placas cromatográficas foram organizadas da seguinte forma: A, B e C – cromatogramas obtidos sem revelação e D, E e F – cromatogramas após revelação. As figuras A e D mostram a leitura no visível, B e E mostram leitura sob UV 254nm e C e F sob UV 365nm. Os valores do fator de retenção (Rf) obtidos serão apresentados na legenda de cada figura.

As Figura 18 e 19 – a seguir – referem-se ao experimento 1, que foi realizado com a fase móvel comumente usada para flavonóides, acetato de etila/ ác. fórmico/ água (60:10:10), em cromatoplacas de sílica gel F254. No entanto, estas condições cromatográficas não se

mostraram adequadas para os flavonóides presentes nas diferentes amostras (Figura 18 e 19). A maioria dos compostos alvo de cada amostra migraram para junto da linha de frente (Rf > 0,9) (Figura 19D). A substância de referência quercetina (Q) apresentou Rf de 0,84.

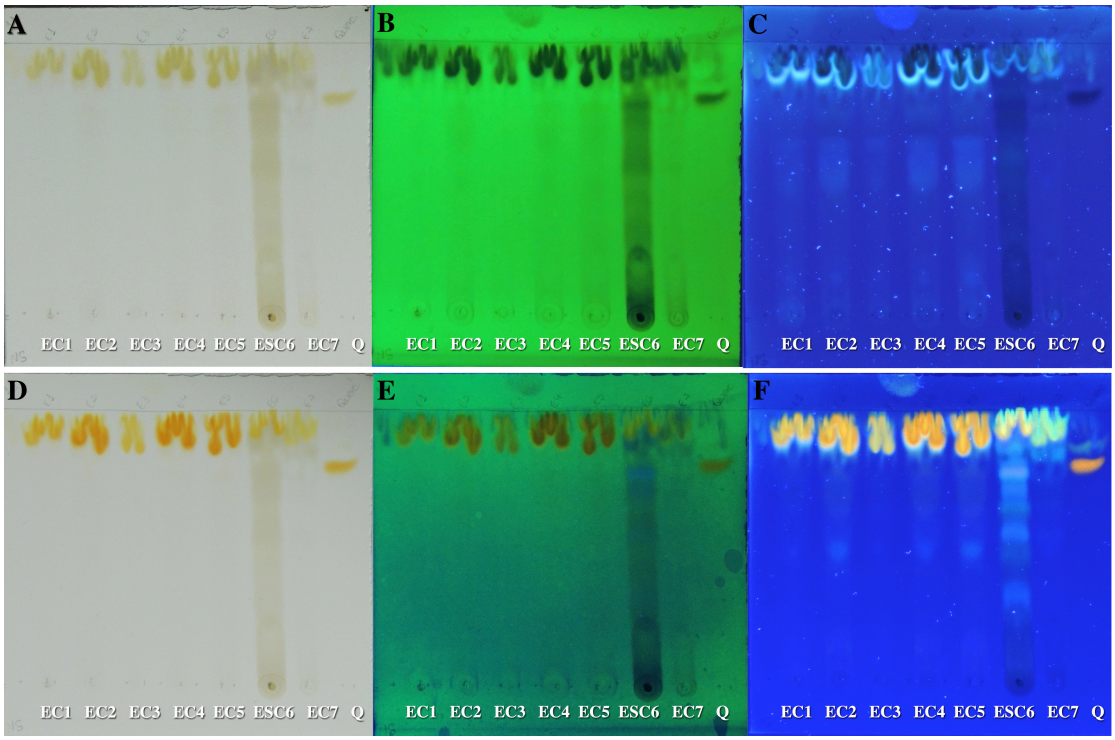


Figura 18 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 1: placa sílica gel F254, sistema acetato de etila/ácido fórmico/água (60:10:10) e revelador NEU. Substância de referência utilizada: quercetina (Q). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A) e B)** Q: Rf = 0,84. **C)** EC1-5: Rf = 0,15, 0,65; ESC6: Rf = 0,20, 0,60, 0,83; Q: Rf = 0,84. **D)** Q: Rf = 0,84. **E)** ESC6: Rf = 0,25, 0,60, 0,74, 0,77; Q: Rf = 0,84. **F)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,50; ESC6: Rf = 0,35, 0,60, 0,74, 0,77; Q: Rf = 0,84. Fonte: dados da pesquisa, 2013.

Na Figura 19, pode-se observar que a amostra ESC6 mostrou-se rica em flavonóides heterosídicos, relativamente às outras amostras em estudo. Apesar da sua estrutura triterpenóide, a substância de referência beta-sitosterol (BS) foi também aplicada neste sistema cromatográfico, tendo o respectivo cromatograma sido revelado o reagente adequado. Os resultados obtidos permitiram confirmar a presença deste tipo de composto em todas as amostras.

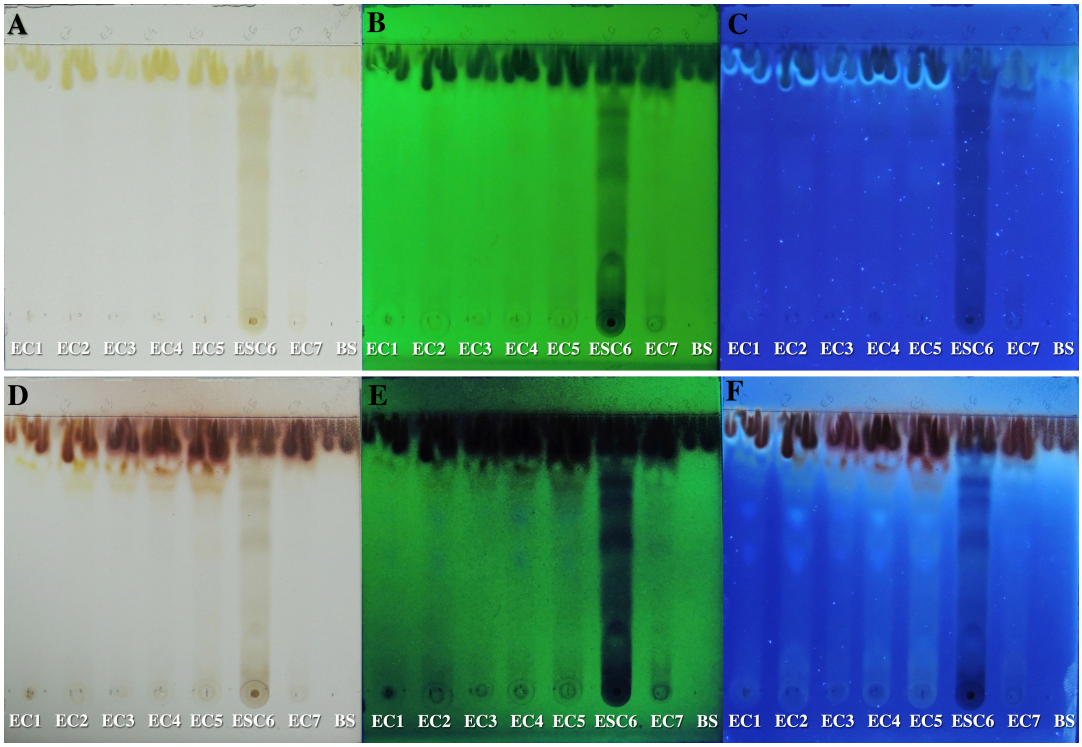


Figura 19 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 1: placa sílica gel F254, sistema acetato de etila/ácido fórmico/água (60:10:10) e revelador Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: β-sitosterol (BS). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** ESC6: Rf = 0,26, 0,60, 0,74, 0,77. **B)** EC 1-5: Rf = 0,65; ESC6: Rf = 0,26, 0,60, 0,74, 0,77; EC7: Rf = 0,77. **D)** EC2,3,4,5: Rf = 0,75, ESC6: Rf = 0,26, 0,60, 0,74, 0,77. **E)** EC2,4,5: Rf = 0,5, 0,65; ESC6: Rf = 0,26, 0,60, 0,74, 0,77. **F)** EC 1-5: Rf = 0,5, 0,65; ESC6: Rf = 0,26, 0,60, 0,74, 0,77.

A condição experimental 2 foi realizada com o intuito de visualizar possíveis taninos presentes nas amostras, portanto, revelou-se as placas separadamente com o *Fast blue salt,* específico para compostos fenólicos, incluindo taninos hidrolisáveis, e vanilica clorídrica, específica para taninos condensados (proantocianidinas e leucoantocianidinas). Após as revelações foi possível observar que o ESC6 mostrou-se como a amostra mais rica em compostos dessa natureza, confirmando o resultado obtido na triagem fitoquímica (Figura 20D). Em relação aos taninos de ácido elágico (elagitaninos), estes podem estar presentes nos extratos EC1 a EC5 (“meia-lua” azul próxima ao ponto de aplicação – sob luz UV) (Figura 20B, C, F).

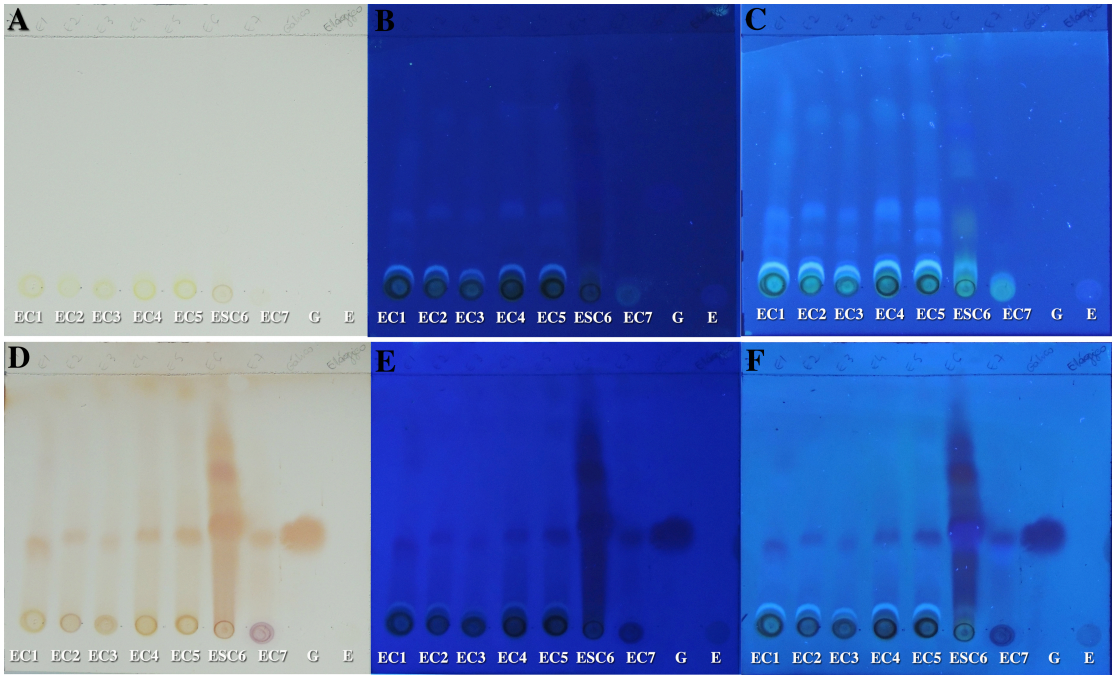


Figura 20 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 2: placa celulose alumínio, sistema ácido acético 6% e revelador *Fast blue salt*. Substâncias de referência utilizadas: ácido gálico (G) e ácido elágico (E). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **B)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,40, 0,74; ESC6: Rf = 0,45; G: Rf = 0,45. **C)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,25, 0,40, 0,74; ESC6: Rf = 0,35, 0,45, 0,65; EC7: Rf = 0,40. **D)** EC 1-5 e 7: Rf = 0,40; ESC6: Rf = 0,45, 0,65, 0,77; G: Rf = 0,45. **E)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,40; ESC6: Rf = 0,45, 0,65, 0,77. **F)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,40; ESC6: Rf = 0,45, 0,65, 0,77.

Os extratos EC1-5 e ESC6 apresentaram uma mancha de Rf 0,3, característica de compostos tânicos (Figura 21F) e sob luz UV os extratos EC1-5 apresentaram a "meia-lua" azul próxima ao ponto de aplicação, possivelmente de ácido elágico (Figura 20B, C, F).

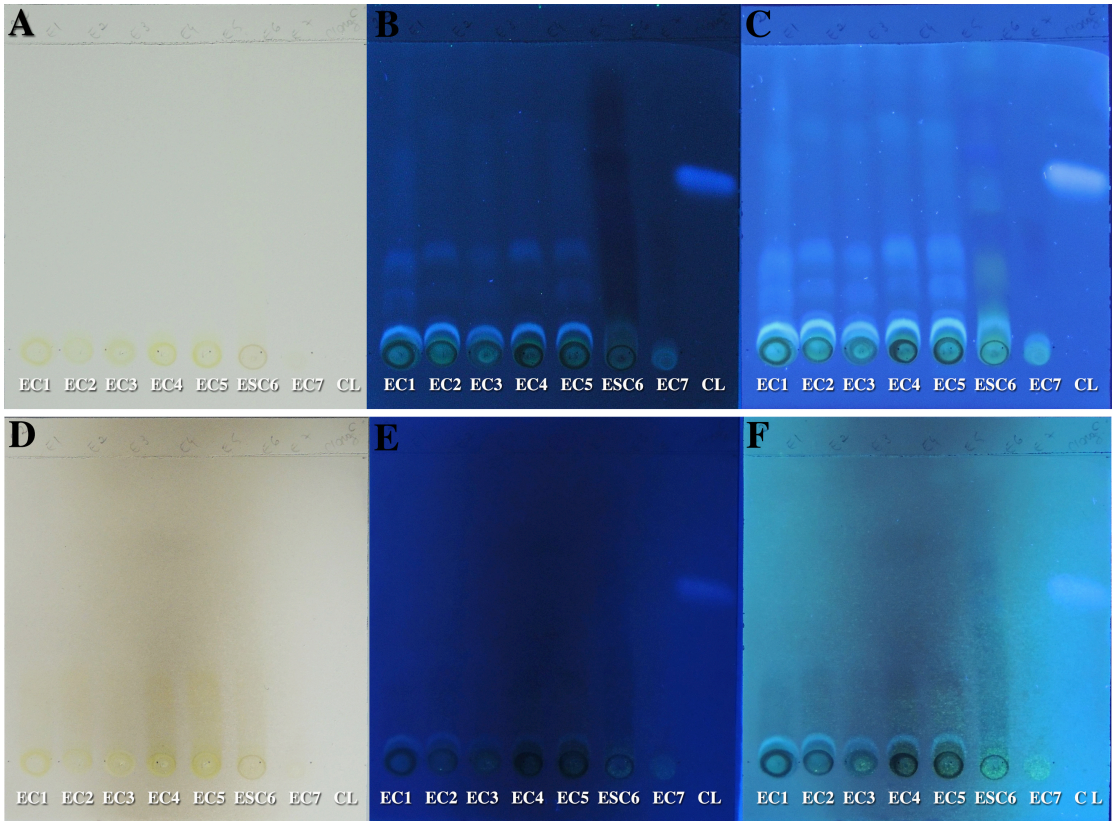


Figura 21 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 2: placa celulose alumínio, sistema: ácido acético 6% e revelador vanílica clorídrica. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (CL). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **B)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,40, 0,74; C: Rf = 0,64. **C)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,25, 0,40, 0,74; ESC6: Rf = 0,35, 0,45, 0,65; EC7: Rf = 0,40, C: Rf = 0,64. **D)** EC 1-5 e ESC6: Rf = 0,30. **E)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,30; ESC6: Rf = 0,30; C: Rf = 0,64. **F)** EC 1-5: Rf = 0,10, 0,30; ESC6: Rf = 0,30; C: Rf = 0,64.

O experimento 3 foi realizado com a fase móvel ácido acético 45% em cromatoplacas de celulose alumínio. De todas as condições experimentais utilizadas, esta foi a que proporcionou melhor separação dos componentes. Os flavonóides agliconas foram os compostos alvos nesta TLC, já que as abelhas, através da enzima 13-glicosidase presente em sua saliva, hidrolizam os flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas (PARK et al., 1998). Todos os flavonóides absorvem a λ = 254nm e 365nm, dependendo do tipo estrutural, após revelação com NEU, os flavonóides apresentam fluorescência amarela, verde ou azul. Os ácidos fenólicos e as cumarinas, apresentam fluorescência azul (WAGNER e BLADT, 1996). Dessa forma, antes da revelação, a visualização dos cromatogramas sob luz UV a 365nm mostrou presença de compostos de fluorescência azul e verde (Figura 22B, C e 22B, C), tendo os extratos EC1-5 perfis qualitativos semelhantes, assim como os extratos ESC6 e EC7, entre si. Após revelação com o reagente de Dragendorff observou-se a inexistência de bandas com coloração laranja-acastanhado, implicando na ausência de alcalóides em todas as

amostras (Figura 22D).

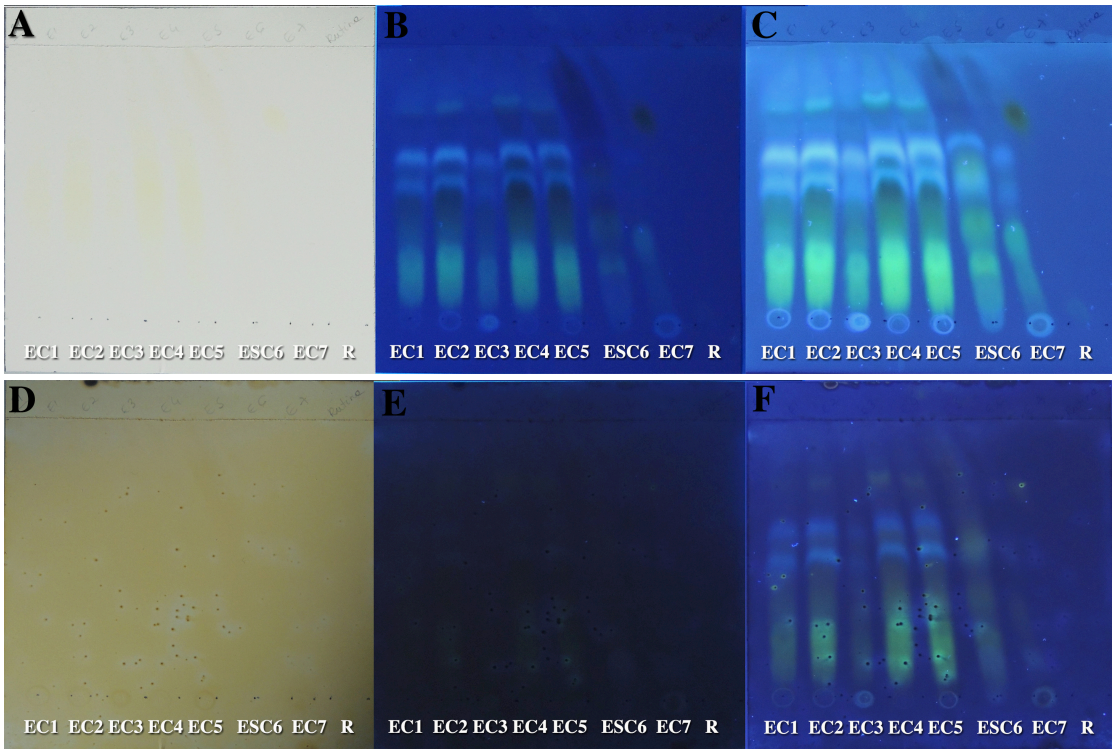


Figura 22 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 3: placa celulose alumínio, sistema: ácido acético 45% e revelador Dragendorff. Substância de referência utilizada: rutina (R). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,65; R: Rf = 0,76. **B)** EC 1-5: Rf = 0,27, 0,54, 0,65, 0,78; ESC6: Rf = 0,24, 0,37; EC7: Rf = 0,35, 0,64; R: Rf = 0,76. **C)** EC 1-5: Rf = 0,27, 0,54, 0,65, 0,78; ESC6: Rf = 0,26, 0,40, 0,60, 0,68; EC7: Rf = 0,35, 0,50, 0,62; R: Rf = 0,76. **F)** EC 1-5: Rf = 0,27, 0,54, 0,65, 0,78; ESC6: Rf = 0,26, 0,40, 0,60; EC7: Rf = 0,35; R: Rf = 0,76.

Após revelação com NEU, os extratos EC1-5 apresentaram bandas bem definidas de pelo menos 10 substâncias diferentes (UV 365nm), sendo seis de fluorescência alaranjada/esverdeada (Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58), duas de cor azul (Rf = 0,63, 0,81), uma vermelha (Rf = 0,73) e a última de coloração escura (Rf = 0,76) sob luz UV (Figura 23E, F). Os extratos ESC6 e EC7 apresentaram perfil qualitativo semelhante, no entanto o EC7 em termos quantitativos, possuía menor concentração. No caso do ESC6, oito bandas mostraram-se bem definidas após revelação com NEU: uma de fluorescência azul, característica do ácido elágico (Rf = 0,20), cinco de fluorescência verde/alaranjada (Rf = 0,26, 0,37, 0,46, 0,56, 0,84) e duas de fluorescência roxa (Rf = 0,65 e 0,78) sob luz UV 365nm (Figura 23F).

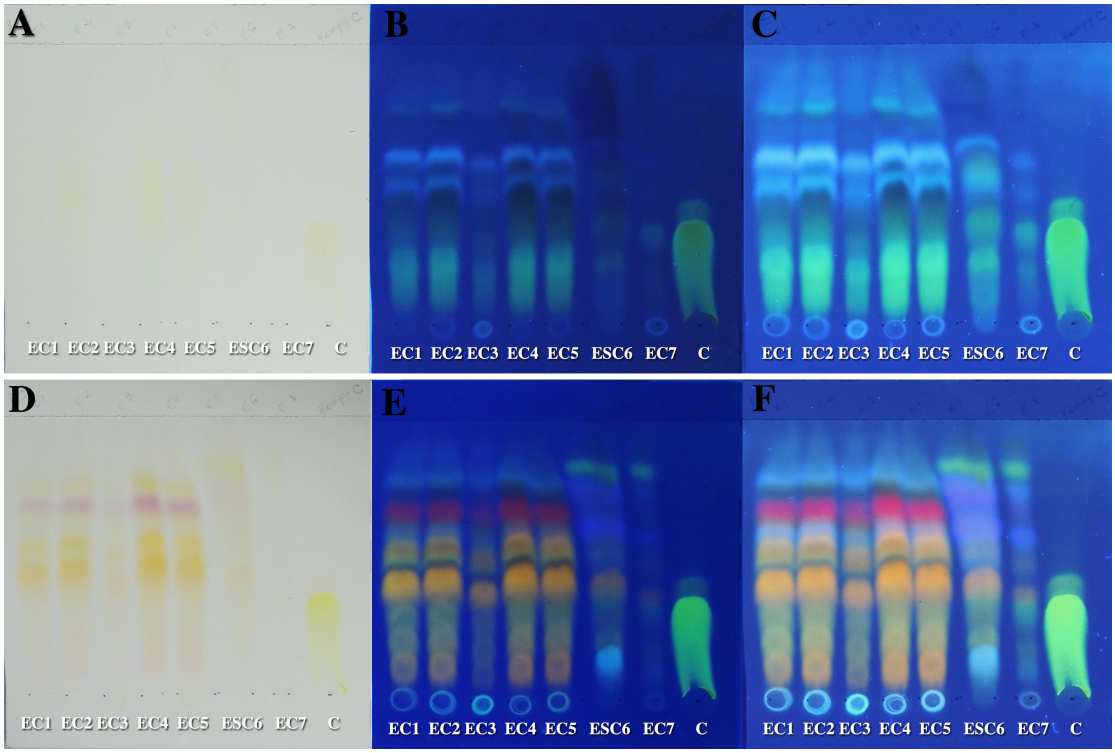


Figura 23 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 3: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45% e revelador NEU. Substância de referência utilizada: canferol (C). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,60; C: Rf = 0,37. **B)** EC 1-5: Rf = 0,27, 0,54, 0,65, 0,78; ESC6: Rf = 0,26, 0,40, 0,56, 0,67; EC7: Rf = 0,35; C: Rf = 0,37. **C)** EC 1-5: Rf = 0,27, 0,54, 0,65, 0,78; ESC6: Rf = 0,26, 0,40, 0,52, 0,60, 0,68; EC7: Rf = 0,24, 0,35, 0,50, 0,62; C: Rf = 0,37. **D)** EC 1-5: Rf = 0,25, 0,47, 0,57, 0,71, 0,78; ESC6: Rf = 0,45, 0,74, 0,84; EC7: Rf = 0,84; C: Rf = 0,37. **E)** EC 1-5: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: Rf = 0,20, 0,26, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; EC7: Rf = 0,36, 0,41, 0,61, 0,77, 0,84; C: Rf = 0,37. **F)** EC 1-5: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: Rf = 0,20, 0,26, 0,37, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; EC7: Rf = 0,16, 0,21, 0,36, 0,41, 0,53, 0,62, 0,78, 0,84; C: Rf = 0,37.

Na condição 4 foi utilizada como fase estacionária, a sílica em fase reversa (RP-18) e como fase móvel metanol/água (80:20). Em termos de resolução, esta se apresentou tão eficiente quanto à condição 3, no entanto por causa do alto custo, a condição 3 teve predileção. Após revelação com NEU (Figura 24F), nove bandas foram visualizadas sob luz UV 365 nm nos EC1, 2, 4 e 5 (Rf = A1,2,4,5: 0,14, 0,26, 0,33, 0,44, 0,46, 0,52, 0,58, 0,64, 0,66), enquanto que no EC3 apenas seis foram vistas (Rf = 0,14, 0,26, 0,33, 0,44, 0,46, 0,55). Os ESC6 e EC7 mantiveram semelhanças qualitativas, principalmente após a revelação (ESC6: Rf = 0,28, 0,41, 0,50, 0,58, 0,66 e EC7: Rf = 0,28, 0,41, 0,50, 0,66).

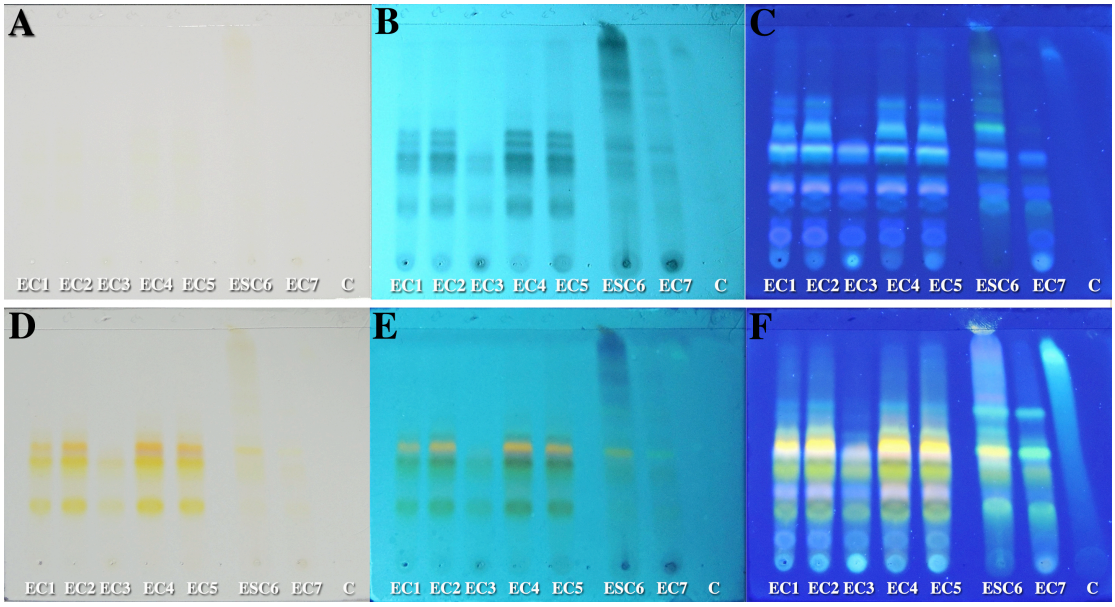


Figura 24 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 4: placa sílica RP (fase reversa), sistema eluente metanol/água (80:20) e revelador NEU. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (C). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,27, 0,41, 0,45, 0,51, 0,54; EC3: Rf = 0,27, 0,41, 0,45; ESC6: Rf = 0,27, 0,41, 0,43, 0,49, 0,68, 0,71, 0,81, 0,94; EC7: Rf = 0,25, 0,42, 0,49, 0,67, 0,72, 0,81, 0,94; C: Rf = 0,90. **B)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,27, 0,41, 0,45, 0,51, 0,54; EC3: Rf = 0,27, 0,41, 0,45; ESC6: Rf = 0,27, 0,41, 0,43, 0,49, 0,68, 0,71, 0,81, 0,94; EC7: Rf = 0,25, 0,42, 0,49, 0,67, 0,72, 0,81, 0,94; C: Rf = 0,90. **C)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,14, 0,17, 0,26, 0,33, 0,49, 0,58, 0,65, 0,68; EC3: Rf = 0,14, 0,17, 0,26, 0,33, 0,49; ESC6: Rf = 0,25, 0,32, 0,47, 0,58, 0,66; EC7: Rf = 0,14, 0,26, 0,32, 0,36, 0,46; C: Rf = 0,90. **D)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,28, 0,41, 0,46, 0,48, 0,51, 0,57; EC3: Rf = 0,28, 0,41, 0,46; ESC6: Rf = 0,27, 0,41, 0,45, 0,50; EC7: Rf = 0,27, 0,41, 0,50. **E)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,28, 0,41, 0,45, 0,48, 0,51, 0,56; EC3: Rf = 0,28, 0,41, 0,45; ESC6: Rf = 0,28, 0,41, 0,50, 0,66; EC7: Rf = 0,28, 0,41, 0,50; C: Rf = 0,90. **F)** EC1,2,4,5: Rf = 0,14, 0,26, 0,33, 0,44, 0,46, 0,52, 0,58, 0,64,0,66; EC3: Rf = 0,14, 0,26, 0,33, 0,44, 0,46, 0,55; ESC6: Rf = 0,28, 0,41, 0,50, 0,58, 0,66; EC7: Rf = 0,28, 0,41, 0,50, 0,66; C: Rf = 0,92.

Ainda na condição experimental 4, a revelação das placas com Liebermann-Burchard proporcionou a visualização de compostos terpenóides nas diferentes amostras, detectados pela aparecimento de cor violeta-castanho (com exceção do ESC6) no local da aplicação, refletindo a alta afinidade pela fase estacionária (Figura 25D). Esse resultado divergiu daquele obtido na triagem fitoquímica realizada com o ESC6.

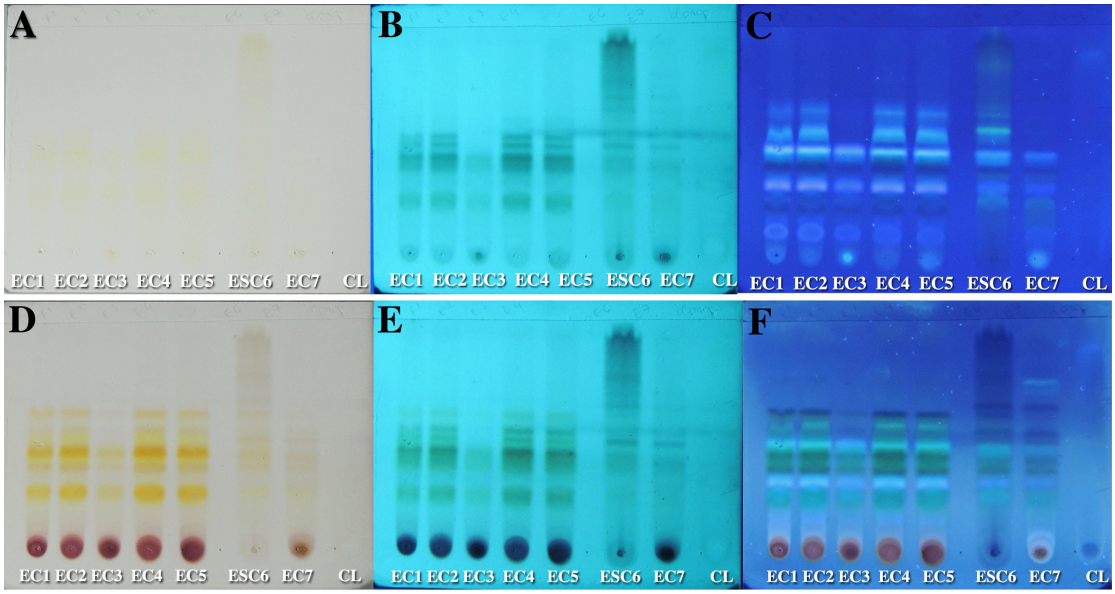


Figura 25 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 4: placa sílica RP (fase reversa), sistema eluente metanol/água (80:20) e revelador Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: ácido clorogênico (CL). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,28, 0,45. **B)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,28, 0,45, 0,49, 0,53; EC3: Rf = 0,28, 0,45; ESC6: Rf = 0,28, 0,45, 0,49; EC7: Rf = 0,28, 0,45, 0,49. **C)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,14, 0,28, 0,35, 0,41, 0,48, 0,57, 0,64; EC3: Rf = 0,14, 0,28, 0,35, 0,41, 0,48; ESC6: Rf = 0,28, 0,34, 0,40, 0,48, 0,58, 0,64; EC7: Rf = 0,14, 0,28, 0,34, 0,40, 0,48. **D)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,28, 0,37, 0,40, 0,45, 0,49, 0,53, 0,60; EC3: Rf = 0,28, 0,37, 0,40, 0,45; ESC6: Rf = 0,28, 0,37, 0,40, 0,43, 0,48, 0,59; EC7: Rf = 0,28, 0,37, 0,40, 0,43, 0,48. **E)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,28, 0,41, 0,43, 0,49, 0,52, 0,60; EC3: Rf = 0,28, 0,41, 0,43; ESC6: Rf = 0,28, 0,41, 0,43, 0,49, 0,64; EC7: Rf = 0,28, 0,40, 0,43, 0,49. **F)** EC 1,2,4,5: Rf = 0,19, 0,28, 0,31, 0,37, 0,41, 0,42, 0,48, 0,55, 0,60; EC3: Rf = 0,19, 0,28, 0,31, 0,37, 0,41, 0,42, 0,48; ESC6: Rf = 0,28, 0,31, 0,37, 0,41, 0,47, 0,52, 0,59, 0,62; EC7: Rf = 0,28, 0,31, 0,37, 0,39, 0,46, 0,52, 0,62, 0,72; C: Rf = 0,89.

O experimento 5 foi realizado com o intuito de comparar a reação dos compostos frente ao anisaldeído e ao Lieberman-Burchard, ambos específicos para compostos triterpenóides e esteróides. Neste caso, utilizou-se sílica gel F254 como fase estacionária e tolueno/acetato de etila (90:10), como fase móvel. A resolução poderia ter sido incrementada com o aumento da proporção de tolueno na fase móvel. Os compostos alvo, foram detectados nas amostras EC1-EC5 e EC7, exibindo um perfil caracterizado por uma banda de Rf = 0,63 de cor avermelhada após revelação (Figura 26D).

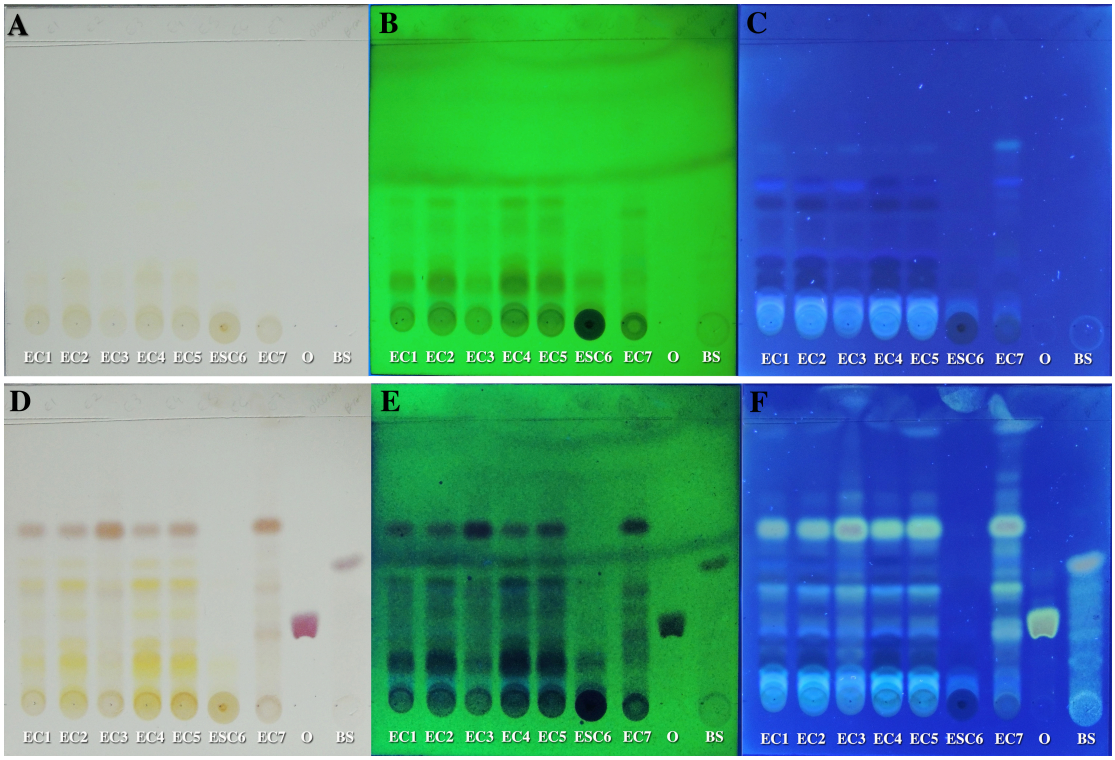


Figura 26 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa sílica gel F254, sistema eluente tolueno/acetato etila (90:10) e revelador anisaldeído. Substâncias de referência utilizadas: ácido oleanólico (O) e β-sitosterol (BS). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,2. **B)** EC 1-5: Rf = 0,19/0,37, 0,45, 0,51; ESC6: Rf = 0,19; EC7: Rf = 0,20, 0,42. **C)** EC 1-5: Rf = 0,13, 0,19, 0,24, 0,46, 0,50, 0,63; ESC6: Rf = 0,13; EC7: Rf = 0,13, 0,26, 0,51, 0,64. **D)** EC 1-5: Rf = 0,15, 0,18, 0,23, 0,33, 0,40, 0,44, 0,51, 0,63; ESC6: Rf = 0,15; EC7: Rf = 0,26, 0,41, 0,63; O: Rf = 0,32; BS: Rf = 0,51. **E)** EC 1-5: Rf = 0,18, 0,23, 0,40, 0,44, 0,51, 0,63; ESC6: Rf = 0,18; EC7: Rf = 0,19, 0,27, 0,42, 0,63; O: Rf = 0,32; BS: Rf = 0,51. **F)** EC 1-5: Rf = 0,13, 0,19, 0,24, 0,30, 0,42, 0,46, 0,52, 0,66, 0,74; ESC6: Rf = 0,13; EC7: Rf = 0,14, 0,26, 0,30, 0,43, 0,46, 0,49, 0,55, 0,66, 0,74, 0,81; O: Rf = 0,33; BS: Rf = 0,51.

A reação com o reagente de Lieberman-Burchard foi mais intensa do que a verificada com o reagente anisaldeído (Figura 27D). Os extratos EC1-5 e o EC7 mostraram, pelo menos, três bandas como os Rfs: EC1-5: Rf = 0,18, 0,41, 0,64 e EC7: Rf = 0,28, 0,41, 0,64 (Figura 27D) e EC1-5: Rf = 0,30, 0,41, 0,63 e EC7: 0,30, 0,41, 0,64 sob UV 366nm (Figura 27F). No extrato ESC6 não foram detectadas bandas com este sistema cromatográfico e reveladores (Figura 26 e 27D).

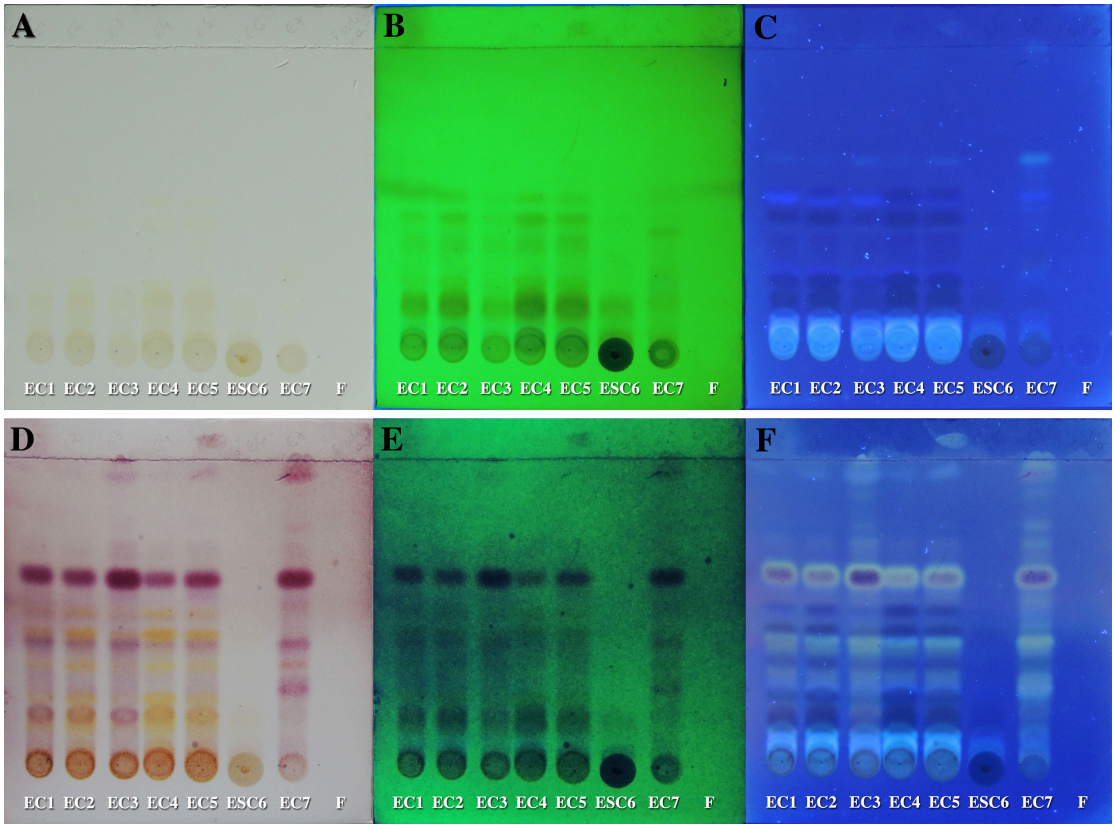


Figura 27 – Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa sílica gel F254, sistema eluente tolueno/acetato etila (90:10) e revelador Liebermann-Burchard. Substância de referência utilizada: fridelina (F). **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,2. **B)** EC 1-5: Rf = 0,19, 0,37, 0,45, 0,51; ESC6: Rf = 0,19; EC7: Rf = 0,20, 0,42. **C)** EC 1-5: Rf = 0,13, 0,19, 0,24, 0,46, 0,50, 0,63; ESC6: Rf = 0,13; EC7: Rf = 0,13, 0,26, 0,51, 0,64. **D)** EC 1-5: Rf = 0,18, 0,23, 0,34, 0,41, 0,44, 0,51, 0,64; EC7: Rf = 0,28, 0,35, 0,41, 0,64. **E)** EC 1-5: Rf = 0,15, 0,20, 0,44, 0,64; ESC6: Rf = 0,17; EC7: Rf = 0,19, 0,27, 0,42, 0,64. **F)** EC 1-5: Rf = 0,13, 0,19, 0,24, 0,30, 0,33, 0,41, 0,44, 0,51, 0,63; ESC6: Rf = 0,13; EC7: Rf = 0,14, 0,20, 0,30, 0,43, 0,46, 0,64, 0,74, 0,81.

Dentre os cinco sistemas cromatográficos testados, o sistema 2 foi o que se mostrou adequado para a investigação de taninos; o sistema 3 para compostos fenólicos (reagente NEU) e a condição 5, especialmente se revelada com Lieberman-Burchard, para pesquisa de triterpenos e esteróides. Já que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas atividades biológicas de amostras de própolis e geoprópolis, o sistema cromatográfico 3 foi eleito para avaliar a diferença entre as amostras com e sem cera e para realizar a pesquisa de compostos, através das substâncias de referência.

5.2.3.1 Comparação entre os EC e ESC[9]

Com o sistema cromatográfico utilizado não foi detectado diferença qualitativa entre

[9] Com as amostras A1-A5.

as amostras com e sem cera. A título exemplificativo, estão apresentados na Figura 28, os cromatogramas das amostras A1 e A2, com (EC1 e EC2) e sem cera (ESC1 e ESC2).

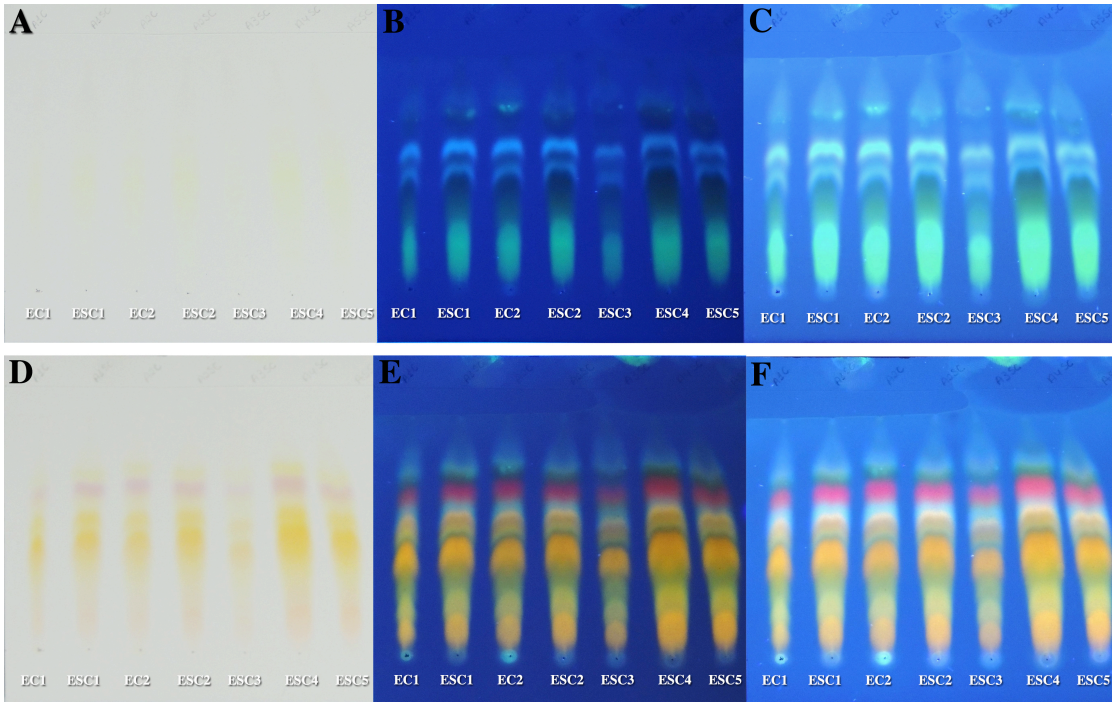


Figura 28 – Comparação entre os extratos com cera (EC) e os extratos sem cera (ESC) das amostras A1 e A2. Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45%, revelador NEU. **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm.

5.2.3.2 Tentativa de investigação de compostos por TLC

Os compostos investigados foram: β-sitosterol (BS), rutina (R), ácido clorogênico (CL), ácido oleanólico (O), fridelina (F), quercetina (Q), quercetrina (QR), mericitrina (M), ác. gálico (G), ác. elágico (E), canferol (C), apigenina (A), luteolina (L), etilgalhato (EG), ác. cumárico (CU), ác. cinâmico (CI) e vitexina (V). De acordo com as características cromatográficas das bandas correspondentes, Rf e fluorescência, antes e após revelação com reagente adequado, foram detectados: ácido gálico nos ESC6 e EC7 (Figura 29B), ácido elágico no ESC6 e EC7 (Figura 29B) e bandas com características cromatográficas semelhantes a apigenina, canferol, quercetina e etilgalhato (Figura 29E).

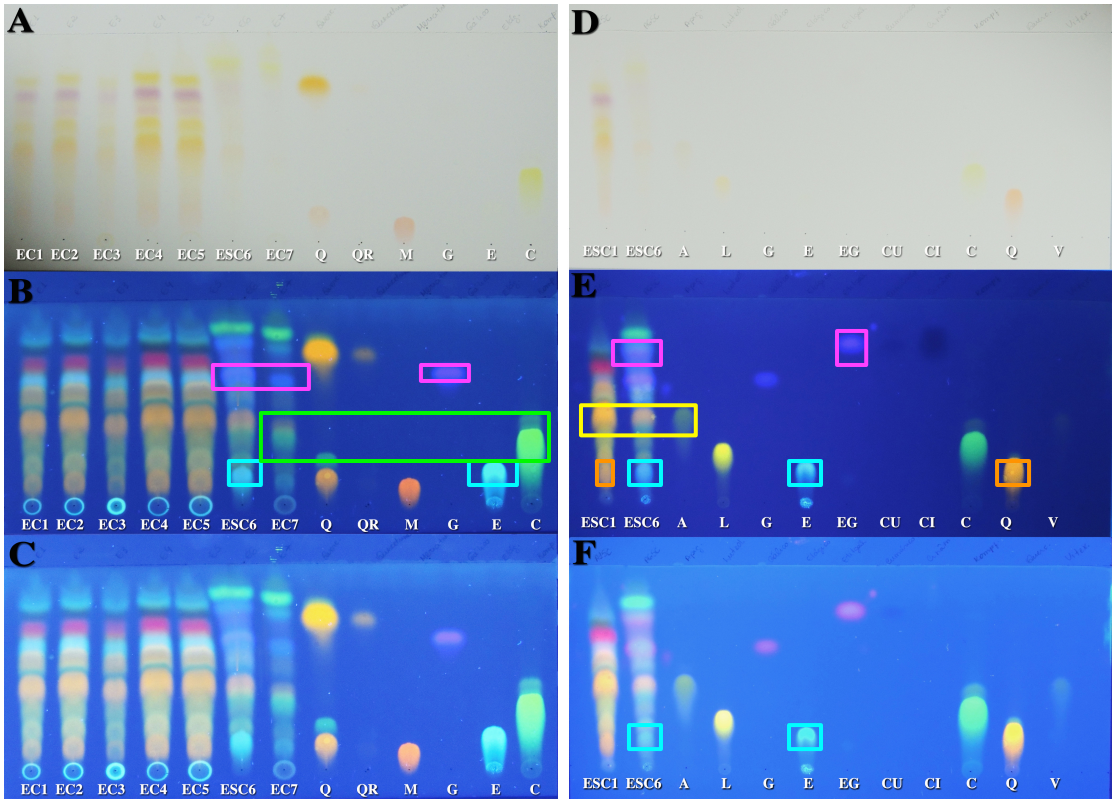


Figura 29 – Investigação de compostos por TLC. Comparação entre os extratos com cera (EC) e os extratos sem cera (ESC) das amostras A1 e A2. Cromatograma obtido a partir do sistema cromatográfico 5: placa celulose alumínio, sistema eluente ácido acético 45%, revelador NEU. **A, B, C** – placas sem revelação e **D, E, F** – placas com revelação. **B, E** – λ 254nm e **C, F** – λ 365nm. **A)** EC 1-5: Rf = 0,25, 0,47, 0,57, 0,71, 0,78; ESC6: Rf = 0,45, 0,74, 0,84; EC7: Rf = 0,84; Q: Rf = 0,17; M: Rf = 0,13; C: Rf = 0,36. **B)** EC 1-5: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: Rf = 0,20, 0,26, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; EC7: Rf = 0,36, 0,41, 0,61, 0,77, 0,84; Q: Rf = 0,17; QR: Rf = 0,76; M: Rf = 0,13; G: Rf = 0,87; E: Rf = 0,21; C: Rf = 0,36. **C)** EC 1-5: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: 0,20, 0,26, 0,37, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; EC7: 0,16, 0,21, 0,36, 0,41, 0,53, 0,62, 0,78, 0,84; Q: Rf = 0,17; QR: Rf = 0,76; M: Rf = 0,13; G: Rf = 0,87; E: Rf = 0,21; C: 0,36. **D)** ESC1: Rf = 0,25, 0,47, 0,57, 0,71, 0,78; ESC6: Rf = 0,45, 0,74, 0,84; A: 0,45; L: Rf = 0,29; C: Rf = 0,36; Q: Rf = 0,23. **E)** ESC1: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: Rf = 0,20, 0,26, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; A: Rf = 0,45; L: Rf = 0,29; G: Rf = 0,63; E: Rf = 0,21; EG: Rf = 0,82; CU: Rf = 0,80; CI: Rf = 0,87; C: Rf = 0,36; Q: Rf = 0,23. **F)** ESC1: Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47, 0,52, 0,58, 0,63, 0,73, 0,76, 0,81; ESC6: Rf = 0,20, 0,26, 0,46, 0,56, 0,65, 0,78, 0,84; A: Rf = 0,45; L: Rf = 0,29; G: Rf = 0,63; E: Rf = 0,21; EG: Rf = 0,82; CU: Rf = 0,80; C: Rf = 0,36; Q: Rf = 0,23; V: Rf = 0,45.

A TLC tem sido usada para comparar amostras de própolis ou diferentes extratos obtidos de uma mesma amostra. Como o número de compostos presentes em amostras de própolis é grande, uma separação adequada nem sempre é obtida, limitando o uso desta técnica para o efeito. Além disso, a identificação de componentes diretamente nas placas de TLC é restrita, já que nem todos os constituintes de uma amostras estão disponíveis a nível comercial (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011). Em relação à TLC, os resultados encontrados nesta pesquisa, corroboram com estas informações.

O sistema cromatográfico 3 foi, dentre os testados, o que se mostrou de maior

utilidade para comparação de perfil químico de amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida*. As amostras A1-5 apresentaram o mesmo perfil, tanto em extratos com cera, como nos extratos sem cera (Figura 28). Nessas amostras, os compostos majoritários foram os derivados de flavonol e flavonas – fluorescência alaranjada (λ 365nm, Rf = 0,14, 0,23, 0,34, 0,47 e 0,58). As xantonas também podem estar presentes nestas amostras – fluorescência vermelha (λ 365nm, Rf = 0,73) (Figura 29B). Adicionalmente, taninos hidrolisáveis – fluorescência salmão (Figura 20D) e triterpenos – coloração vermelha (Figura 27D) foram detectados.

As amostras A6 e A7 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes entre si, exceto no perfil de triterpenóides e esteróides, não detectados na amostra A6, apesar da reação positiva (reação +++) para triterpenóides pentacíclicos livres verificada na triagem fitoquímica. A amostra A6, em especial, mostrou-se rica em taninos hidrolisáveis (Figura 20D). Derivados de flavonol e flavonas foram também identificados (λ 254nm, Rf = 0,26, 0,46, 0,56), assim como bandas com as características dos ácidos gálico e elágico (Figura 29B).

Dentre as amostras analisadas, foram encontrados dois perfis cromatográficos (A1-5 e A6 e 7), este fato poderá estar relacionado a dois fatores: 1) Distinta fonte botânica principal para formação das geoprópolis (já que os trabalhos de caracterização botânica não foram realizados com as amostras A6 e A7). 2) Uso de temperatura excessiva durante a preparação dos extratos, tendo em conta que temperaturas acima de 40ºC degradam as principais classes de compostos identificados.

A identificação de compostos por comparação com substâncias de referência foi, de fato, bastante restrita através de TLC. Somente o ácido elágico e o ácido gálico foram identificados nas amostras ESC6 e ESC7. Nesse viés, LC/UV-DAD tem se tornado o método mais comum para análise de própolis, em conjunto com o acoplamento desta técnica à espectrometria de massa LC/UV-DAD-MS (FUNARI e FERRO, 2006).

5.2.4 Caracterização das amostras de geoprópolis por LC/UV-DAD

Dentre os seis extratos analisados através de LC/UV-DAD, cinco deles: ESC1, ESC2, ESC3, ESC4 e o ESC5 mostraram perfis químicos bastante similares entre si, confirmando os resultados obtidos por TLC (Figuras 30, 32, 34, 36 e 38). Nessas amostras foram identificadas 7 bandas majoritárias (bandas **1-7**, Figuras 31, 33, 35, 37 e 39), com tempos de retenção (t_R) e

espectros de absorção semelhantes (Tabela 5). O extrato ESC3 foi o que apresentou menor riqueza relativa destes compostos. Uma banda a t_R 1,38 min. correspondente ao ácido fórmico (F) presente na fase móvel, foi observada em todas as amostras e substâncias de referência, uma vez que o registro dos respectivos cromatogramas foi efetuado no máximo de absorvância de cada pico (cromatograma *maxplot*).

Tabela 5 – Tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção dos sete compostos majoritários encontrados nas amostras de geoprópolis: ESC1, ESC2, ESC3, ESC4 e ESC5.

Picos	ESC1		ESC2		ESC3		ESC4		ESC5	
	t_R	λ máx.	t_R	λ máx.	t_R	λ máx.	t_R	λ máx.	t_R	λ máx.
1	13,079	242,7 289,9	12,971	243,9 289,9	11,614	242,7 289,9	11,252	243,9 289,9	12,189	243,9 289,9
2	14,450	227,4 255,7 357,7	14,295	225,1 255,7 358,8	12,761	227,4 255,7 358,6	12,401	226,8 255,7 357,7	13,393	225,1 255,7 357,7
3	17,937	233,3 285,2 316,0	17,663	234,5 285,2 316,0	15,714	233,3 284,0 317,2	15,558	234,5 285,2 317,2	16,403	235,6 284 317,2
4	19,136	231,0 362,6	18,801	227,4 362,6	16,754	232,1 362,6	16,783	238,0 363,5	17,519	226,5 362,6
5	23,047	231,0 289,9	22,782	231,0 289,9	20,299	229,0 289,9	21,244	231,0 289,9	21,315	231 289,9
6	33,140	221,6 364,5	32,181	231,0 364,5	29,669	227,4 364,5	32,500	240,3 364,5	31,397	242,6 364,5
7	33,872	221,6 365,7	32,801	231,0 365,7	30,577	228,6 365,7	33,304	231,0 365,7	32,131	241,5 365,7

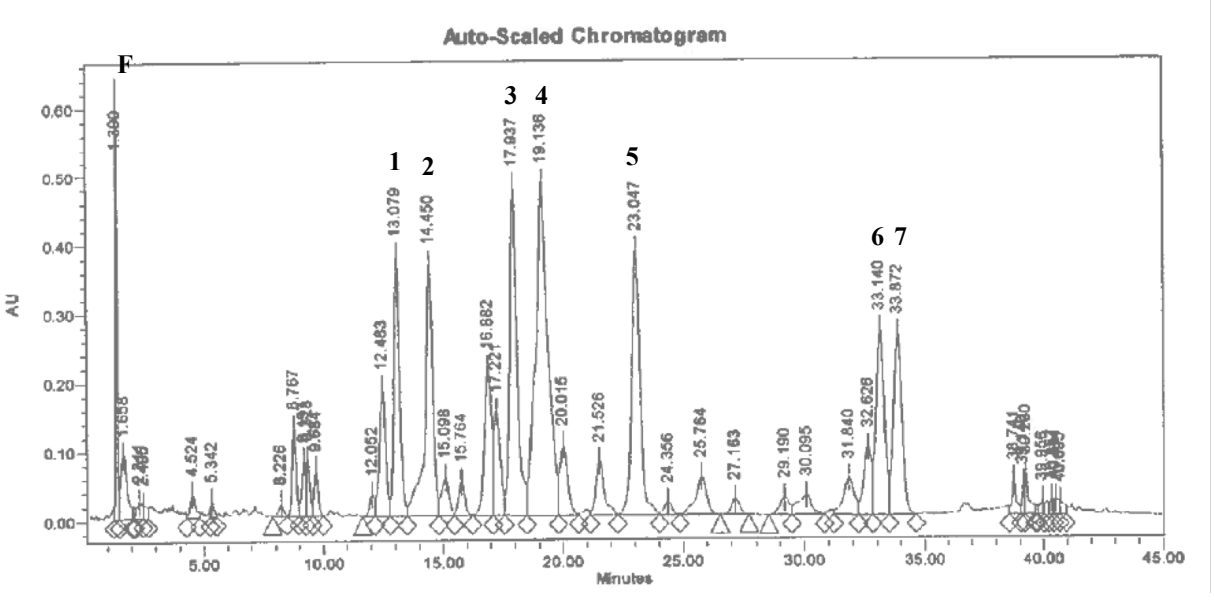


Figura 30 – Perfil químico do extrato ESC1 – cromatograma *maxplot*.

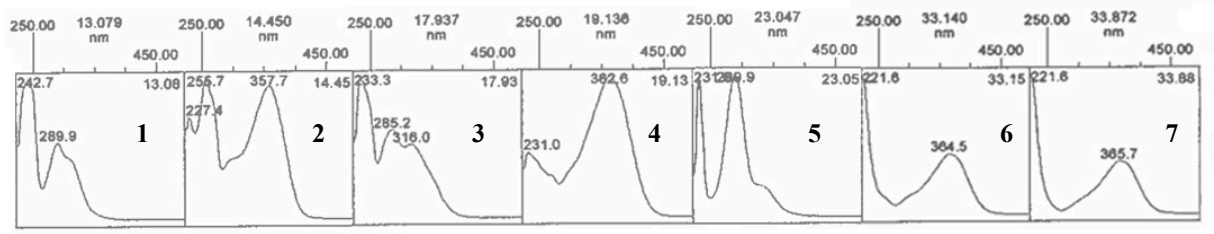


Figura 31 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC1.

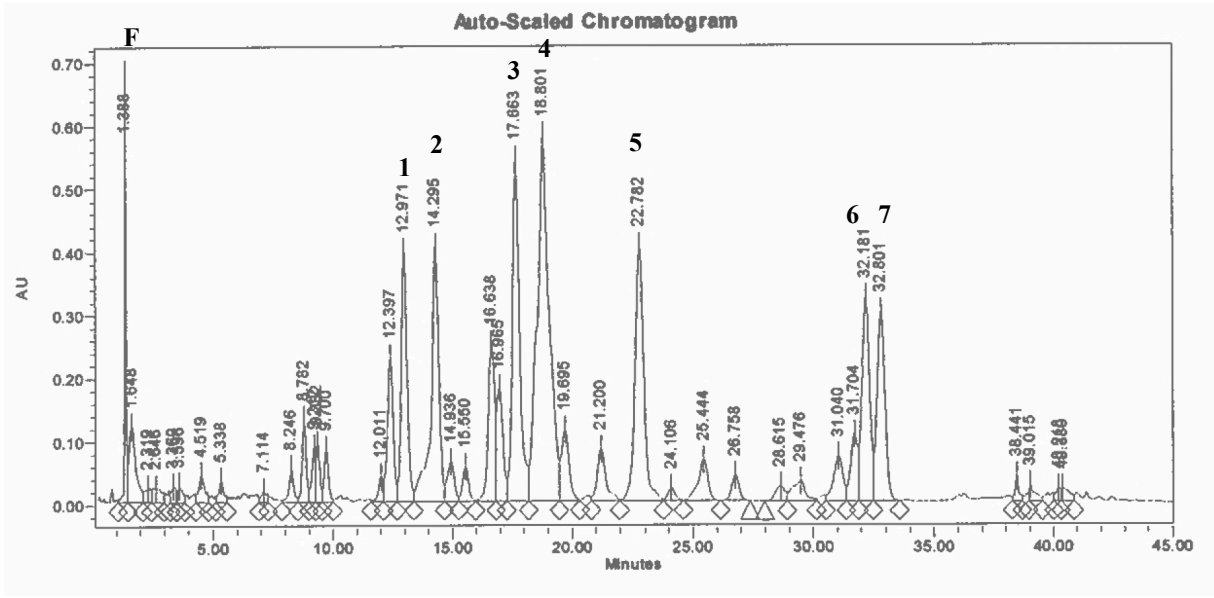


Figura 32 – Perfil químico do extrato ESC2 – cromatograma *maxplot*.

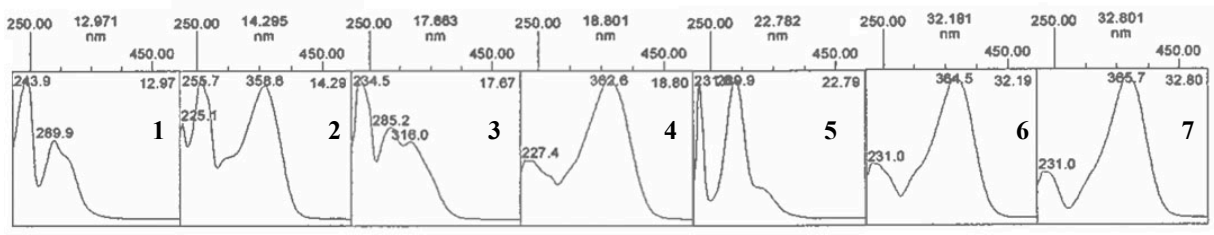


Figura 33 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC2.

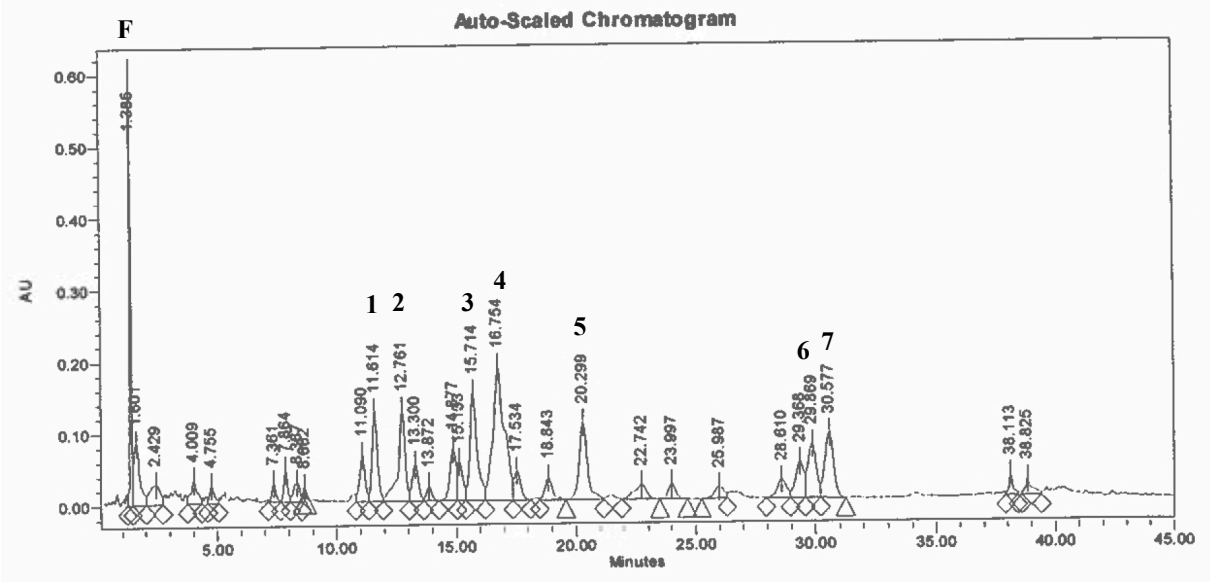


Figura 34 – Perfil químico do extrato ESC3 – cromatograma *maxplot*.

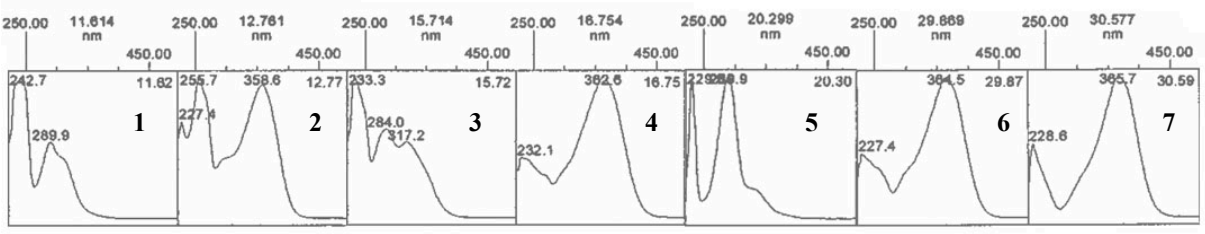


Figura 35 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC3.

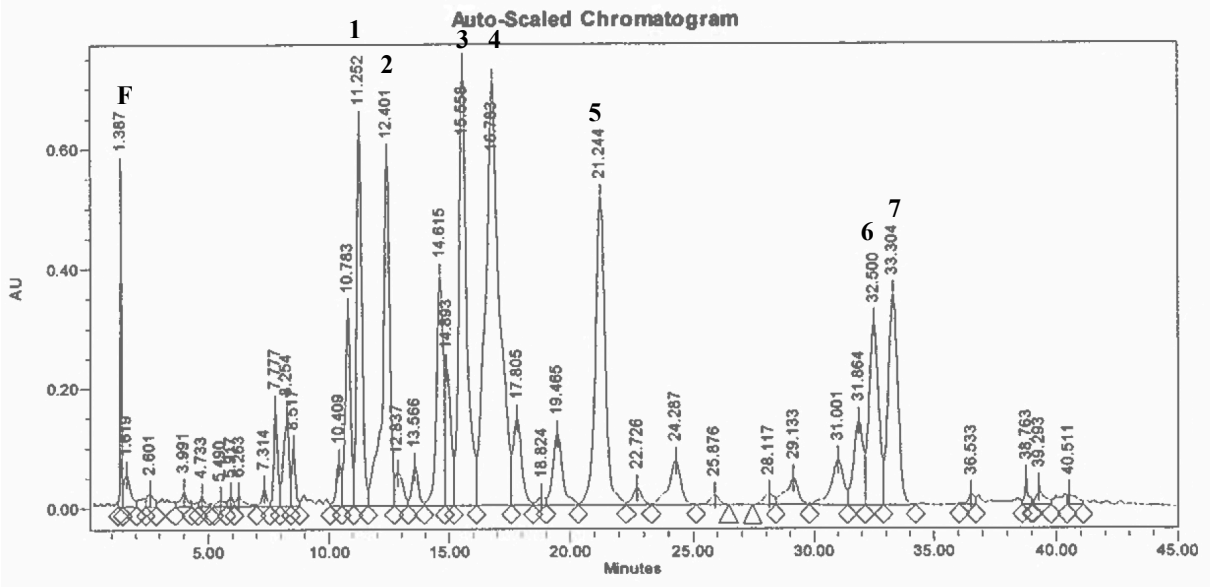


Figura 36 – Perfil químico do extrato ESC4 – cromatograma *maxplot*.

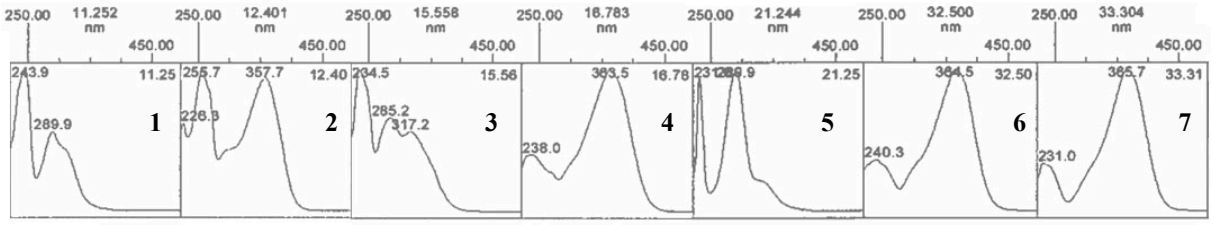


Figura 37 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC4.

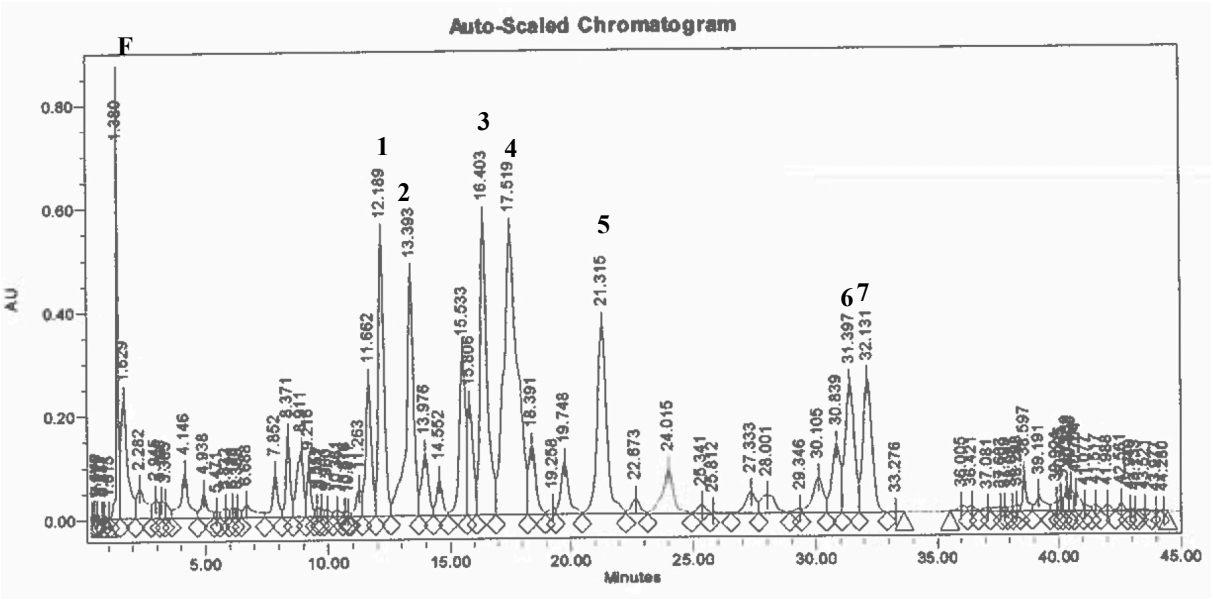


Figura 38 – Perfil químico do extrato ESC5 – cromatograma *maxplot*.

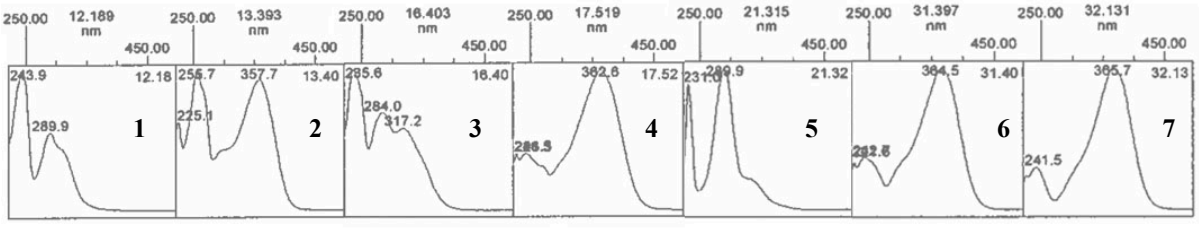


Figura 39 – Espectros de absorção dos sete compostos majoritários, encontrados no extrato ESC5.

É importante lembrar que os ácidos fenólicos apresentam no ultravioleta duas zonas de absorvância características: 225-235nm e 290-330nm. Já os flavonóides exibem duas zonas: a banda I (320-385nm) representando essencialmente a absorvância devida ao anel B e a banda II (250-285nm) representando essencialmente a absorção devida ao anel A (Figura 40). À medida que há aumento de oxigenação nos anéis, maior é o desvio batocrômico verificado em cada uma destas bandas características. Alterações no anel A refletem na banda II e alterações nos anéis B e C refletem na banda I. Com isso, metilações e glicosilações (principalmente nas hidroxilas dos carbonos 3, 5, 7 e 4') podem causar desvios para um menor comprimento de

onda.. A presença do sistema 3'-4'-diOH nas flavonas e flavonóis é geralmente evidenciada por um segundo pico (inflexão) na banda II (VALENTÃO, 2002).

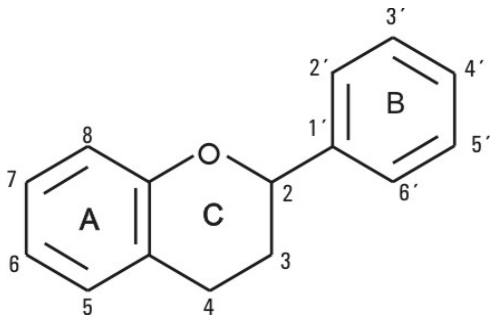
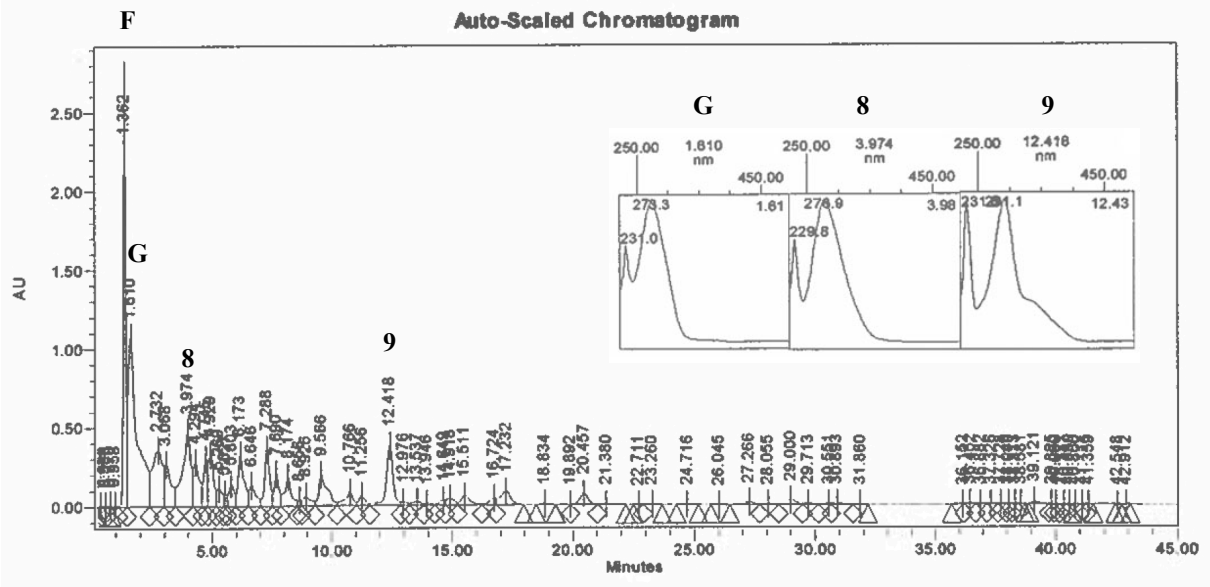


Figura 40 – Estrutura básica dos flavonóides. As diversas classes de flavonóides variam de acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado (anel C).

Desse modo, dentre os sete compostos majoritários, o composto **2** exibiu espectro de absorvância característico de flavonol (banda I: 350-385nm e banda II: 250-285nm[10]), enquanto que o composto **3** exibiu características de flavona (banda I: 310-350nm e banda II: 250-280nm[10]). Os compostos **4**, **6** e **7** são flavonóides que, provavelmente, sofreram alterações no anel A, mostrando desvio para um menor comprimento de onda na banda II. Os espectros de absorvância dos compostos **1** e **5** são compatíveis com uma estrutura de ácido fenólico. No extrato ESC1, os compostos **6** e **7** mostraram t_R e espectro diferenciado em relação aos extratos ESC2, ESC3, ESC4 e ESC5 (Figuras 32, 34, 36, 38 e 40).

O extrato ESC6 mostrou perfil químico diferenciado relativamente às outras amostras, fato esse, já evidendiado através da TLC (Figura 41). Nessa amostra, somente três compostos foram encontrados em maior concentração, apresentando, os seguintes tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção: t_r = 1,610 min., 3,974 min., 12,418 min. e λ máx. = 231,0, 273,3; 229,8, 278,9 e 225,1, 289,9. Esses três compostos exibiram características dos ácidos fenólicos, estando entre eles, e em maior concentração, o ácido gálico (**G**) – conforme comparação com a substância de referência (Figura 42).

[10] Marcucci, Woisky e Salatino, 1998.

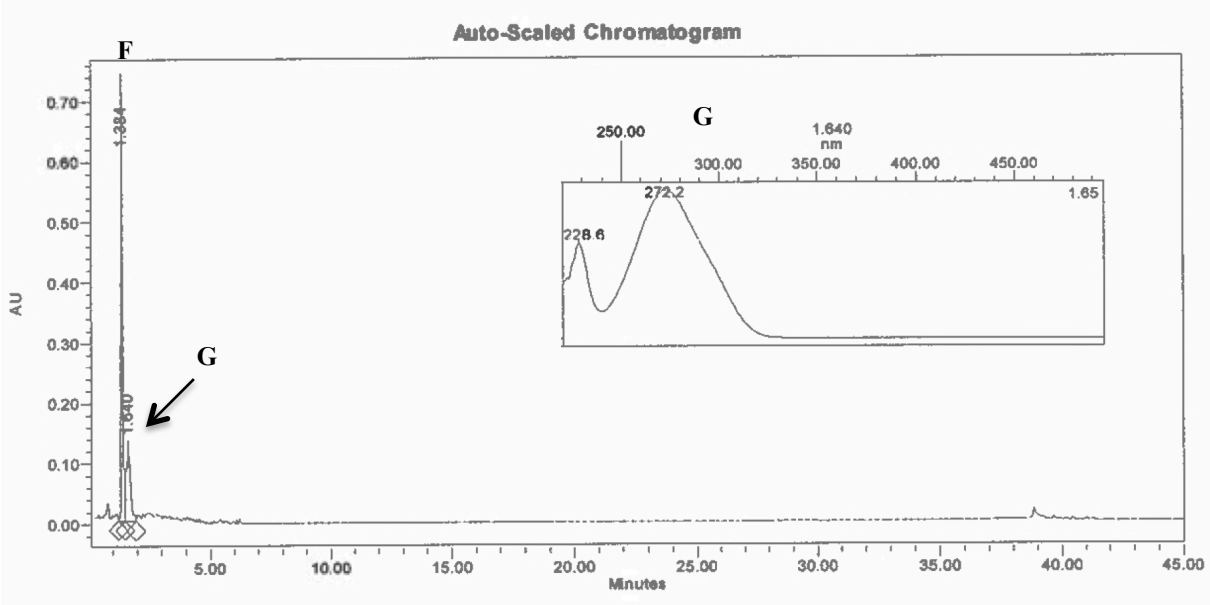


Figuras 41 – Perfil químico do extrato ESC6 e espectros de absorvência de 3 dos seus constituintes (G, 8 e 9)

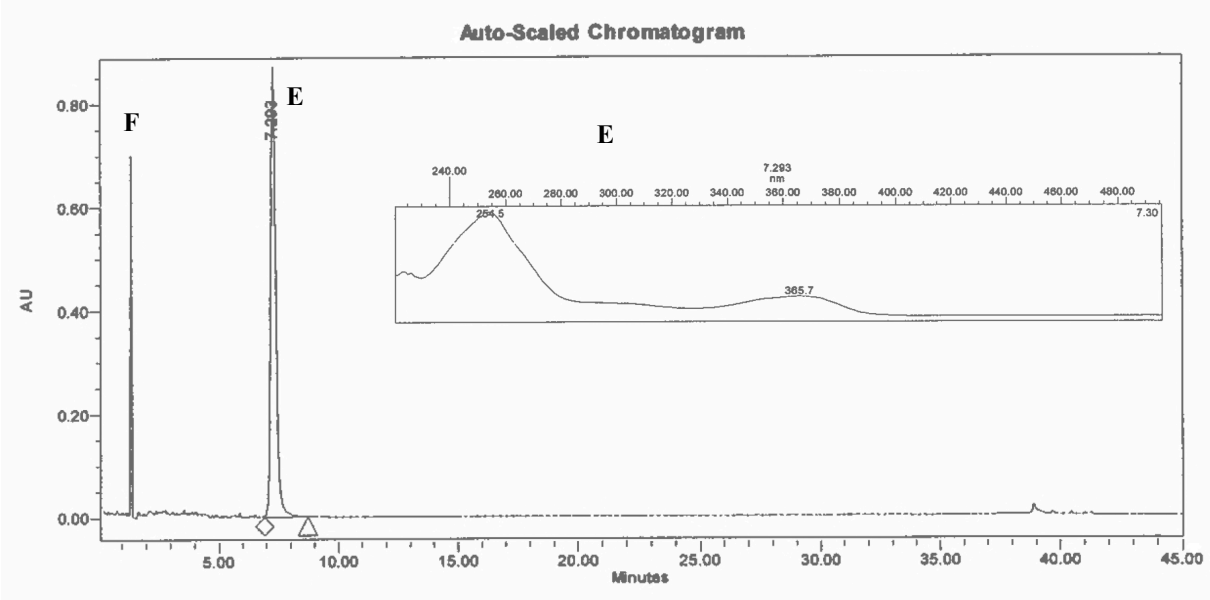
Nas Figuras 42, 43 e 44 são apresentados os cromatogramas e espectros de absorvância das subtâncias de referência investigadas, caraterísticas dos grupos químicos entretanto detectados: ácido gálico, ácido elágico e quercetina. Os tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção estão sumarizados na Tabela 6. Com exceção do ácido gálico, não foi possível identificar esses compostos nas amostras de geoprópolis analisadas.

Tabela 6 – Tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção das substâncias de referência: ácido gálico (G), ácido elágico (E) e quercetina (Q).

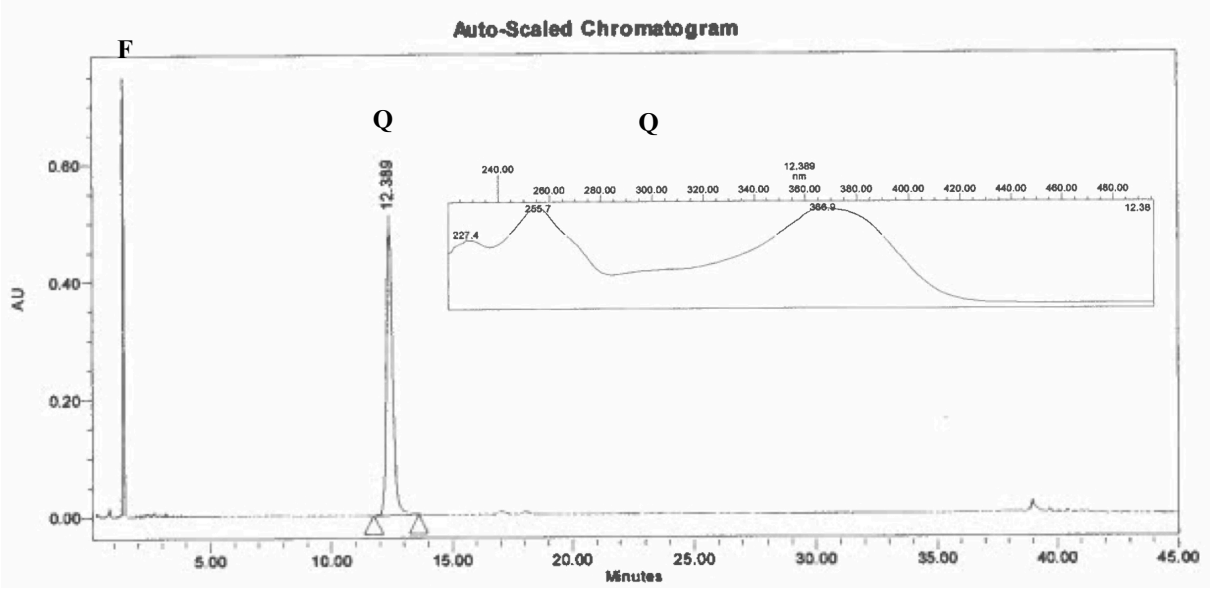
Substâncias de referência	t_R	λ máx.
Ácido gálico (G)	1,640	228,6 272,2
Ácido elágico (E)	7,293	254,5 365,7
Quercetina (Q)	12,389	227,4 255,7 386,9



Figuras 42 – Cromatograma e espectro de absorvância do ácido gálico (G).



Figuras 43 – Cromatograma e espectro de absorvância do ácido elágico (E).



Figuras 44 – Cromatograma e espectro de absorvância da quercetina (Q).

O método de LC/UV-DAD tem sido utilizado na tipificação da própolis brasileira, identificando e quantificando os diversos compostos fenólicos. A limitação desse método gira em torno dos terpenos, que absorvem pouco na luz UV-Visível e muitas vezes não são detectáveis. Esse fato é importante na investigação química de amostras de própolis de abelhas sem ferrão, que são sabidamente ricas em diterpenos e triterpenos. (SAWAYA, CUNHA E MARCUCCI, 2011).

No caso das amostras de geoprópolis de jandaíra analisadas, a LC/UV-DAD mostrou-se útil no estabelecimento do perfil químico, especialmente sob as condições cromatográficas utilizadas por este estudo. O trabalho realizado por Souza (2012) com amostras de geoprópolis de jandaíra obtidas no estado da Paraíba, resultou no isolamento e identificação de sete flavonóides: 7-metoxi-narigenina, 7-metoxi-aromadendrina, 5-metoxi-aromadendrina, 7,4'-dimetoxi-aromadendrina, 3-metoxi-quercetina, 4'-metoxi-canferol, 5-metoxi-canferol e dois fenilpropanóides glicosilados: 6-O-p-coumaroil-D-galactopiranose e 1-O-coumaroil 6-O-cinamoil-β-D-glicopiranosídeo, através de LC-ESI-MS e RNM. Estes resultados poderão ser úteis em estudos futuros a realizar sobre as amostras alvo do presente trabalho, uma vez que se trata do tipo de compostos por nós identificados nestas: flavonóis, flavonas e derivados de ácidos fenólicos.

5.2.5 Quantificação dos fenóis totais

Preparou-se uma reta de calibração a partir de três soluções estoques de ácido gálico (120mg/L) usando as seguintes diluições: 0; 30; 60; 75; 90 e 105 mg/L. A reta de calibração foi construída a partir das médias dos três valores de absorvância, usando o programa informático Microsoft Office Excel 2011 para Macintosh, relacionando as concentrações de ácido gálico com as absorvâncias obtidas a λ = 765 nm (Figura 45). Através dessa equação determinou-se indiretamente a concentração de fenóis totais em equivalentes de ácido gálico (GAE), em que y = média das absorvâncias e x = concentração da solução. Em seguida, os dados foram convertidos em percentagem, expressando o teor de fenóis totais. A reta de calibração do ácido gálico e sua respectiva equação: y = 0,0096x - 0,1748 são apresentadas a seguir. O coeficiente de correlação linear (R^2) foi igual a 0,98 demonstrando boa linearidade da reta.

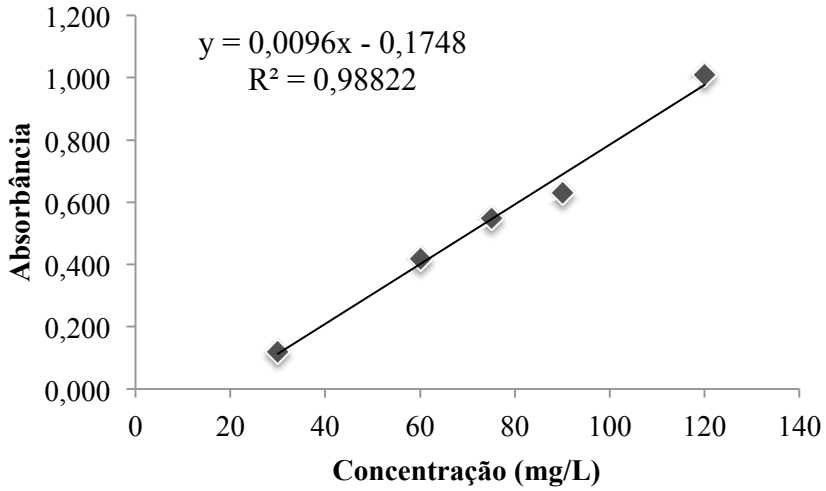


Figura 45 – Reta de calibração do ácido gálico.

O teor de fenóis totais variou entre 2,845 ± 0,059% (EC3) e 11,291 ± 0,262% (ESC6), seguindo a ordem crescente nas amostras: EC3 < EC7 < EC1 < ESC3 < EC5 < EC2 < EC4 < ESC1 < ESC5 < ESC2 < ESC4 < ESC6. Todos os extratos com cera mostraram menor teor de fenóis totais que seus respectivos extratos sem cera (Tabela 7). Desse modo, o elevado teor de fenóis totais em ESC6 pode ser devido a presença marcante de taninos hidrolisáveis, demonstrado por TLC – sistema cromatográfico 2 (Figura 20D). Uma boa correlação foi observada entre o teor de compostos fenólicos (%) de extratos com e sem cera (R^2=0,93).

Quanto ao teor de compostos fenólicos, a legislação brasileira atual prevê que amostras de própolis devem conter no mínimo 5,0% (m/m) de subtâncias dessas classes (Brasil, 2001). Entre as amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* analisadas, as amostras A1(EC), a A3 e A7, não cumpriram com os requisitos mínimos da lei.

Tabela 7 – Teor de fenóis totais (%) de extratos hidroalcóolicos da geoprópolis de *Melipona subnitida*.

	Teor de fenóis totais (%) (m/m)*	
Amostras	**EC**	**ESC**
A1	4,303 ± 0,097	7,170 ± 0,076
A2	5,661 ± 0,056	7,949 ± 0,132
A3	2,845 ± 0,059	4,368 ± 0,286
A4	6,472 ± 0,130	9,439 ± 0,313
A5	5,604 ± 0,123	7,613 ± 0,330
A6	-	11,291 ± 0,262
A7	3,613 ± 0,271	-

* Expresso como equivalente de ácido gálico – EAG.

O método de Folin-Ciocalteau baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolíbdico, presentes no reagente, pelos compostos fenólicos presentes na amostra, a óxido de tungstênio e óxido de molibdênio em meio alcalino (carbonato de sódio), formando um complexo azul. Valores semelhantes aos encontrados nas amostras analisadas nesta pesquisa foram obtidos em outros estudos.

Em relação à geoprópolis de *Melipona scutellaris* ("uruçu"), o teor de compostos fenólicos foi de 12,7% (FRANCHIN et al., 2012). Através do método Folin-Denis, uma amostra da própolis verde mostrou 7,39% de fenóis totais (FUNARI e FERRO, 2006). Já as amostras obtidas no estado de Santa Catarina apresentaram 4,7% de compostos fenólicos (MANTOVANI et al., 2008) e as amostras da própolis marrom, obtidas no estado do Mato Grosso, obtiveram valores compreendidos entre 0,1 e 5,0% (BASTOS et al., 2011). Dessa forma, percebe-se que o teor de fenóis totais pode variar de forma significativa em um mesmo tipo de amostra. No caso da própolis vermelha, os valores referidos na literatura de fenóis totais variam entre 15,15% e 41,63% (RIGHI et al., 2011; FROZZA et al., 2013).

No caso de amostras de própolis obtidas na região sudeste, Cunha et al. (2004) demonstraram ainda, que a extração por maceração ou Soxlet parece não interferir no conteúdo de fenóis totais, mas somente no rendimento.

5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*

A Tabela 8 apresenta os valores de $IC_{50\%}$ (mg/mL) das amostras de geoprópolis de jandaíra testadas. Neste sentido, vale lembrar que quanto menor o valor da $IC_{50\%}$, maior a capacidade sequestrante do radical e portanto, maior a atividade antioxidante. Como esperado, o ácido ascórbico, substância isolada usada como referência, obteve o valor de $IC_{50\%}$ (0,049mg/mL) mais elevado. Dentre as amostras A1 a A5, todos os extratos sem cera (ESC) apresentaram menor $IC_{50\%}$ quando comparados aos seus respectivos extratos com cera (EC). Em relação aos ESC, a amostra A3 apresentou menor capacidade antioxidante ($IC_{50\%}$ = 0,946), enquanto que a amostra A6, maior ($IC_{50\%}$ = 0,084). Já dentre os extratos com cera (EC), a amostra A7 apresentou melhor capacidade antioxidante ($IC_{50\%}$ = 0,36). Vale notar que a reta de calibração do ácido ascórbico obteve um valor de R^2 igual a 0,99 (Figura 46).

Tabela 8 – Valores de $IC_{50\%}$ das amostras de geoprópolis *M. subnitida* testadas.

	$IC_{50\%}$ (mg/mL)	
Ác. ascórbico	0,049	
Amostras	**EC**	**ESC**
A1	0,908	0,546
A2	0,616	0,392
A3	1,663	0,946
A4	0,514	0,340
A5	0,876	0,272
A6	-	0,084
A7	0,360	-

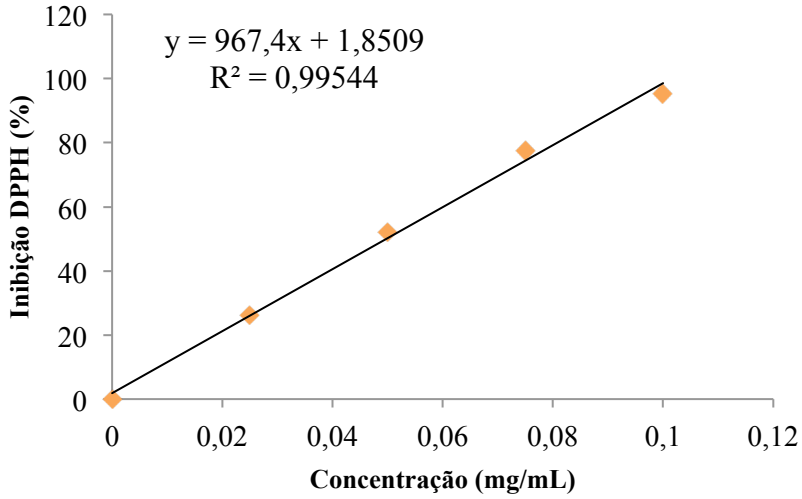


Figura 46 – Reta de calibração do ácido ascórbico.

Uma vez que a atividade antioxidante da própolis é atribuída aos compostos fenólicos, a constatação de uma boa correlação entre a $IC_{50\%}$ e o teor de fenóis totais dos extratos sem cera (ESC), indica que a atividade antioxidante está diretamente relacionada a esses compostos, o que foi verificado para os extratos ESC1 a ESC6 (R^2=0,86) (Figura 47). Entre os EC, esse valor foi de 0,31, apresentando baixa correlação. A exemplo disso, cita-se o extrato EC7 com baixo teor de fenóis totais (0,172%) e alta atividade antioxidante ($IC_{50\%}$ = 0,36), quando comparado aos extratos com cera das outras amostras. Diferentes teores de cera podem estar relacionados à baixa correlação observada para os EC. A correlação positiva verificada para os extratos sem cera, indica que os compostos fenólicos possuem importante função na atividade antioxidante apresentada pelos ESC, todavia, outros fatores também podem estar envolvidos.

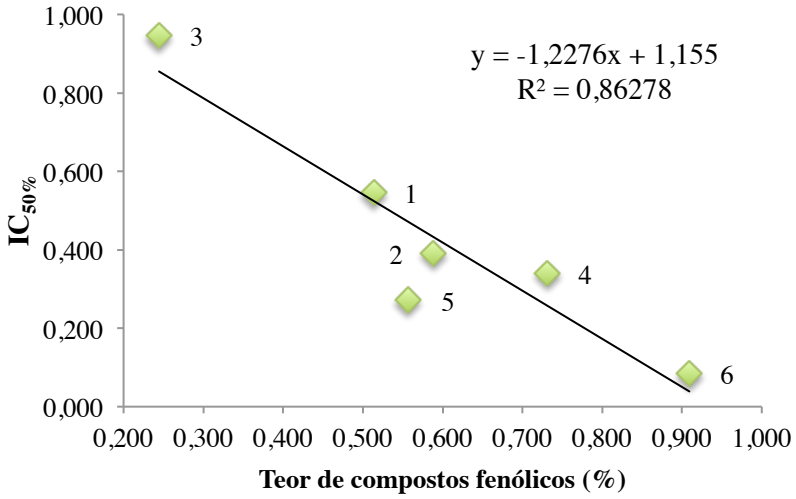


Figura 47 – Correlação entre $IC_{50\%}$ e teor de compostos fenólicos (%) nos extratos sem cera (ESC).

Os compostos fenólicos são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas fenólicas. O método de DPPH baseia-se na redução de soluções alcoólicas de DPPH e o excesso desse radical é medido a λ = 517nm, após um determinado período de tempo de reação; esta diferença corresponde inversamente à atividade anti-radicalar do antioxidante (RIGHI et al., 2011) (Figura 48).

Sob esta perspectiva, um extrato etanólico da geoprópolis de jandaíra obtido na Paraíba exibiu menor $IC_{50\%}$ que as amostras desta pesquisa: 0,027mg/mL (SOUZA, 2012), logo, maior potencial antioxidante. Já o mel puro de *Melipona subnitida* exibiu $IC_{50\%}$ entre 10,6 e 12,9 mg/mL (SILVA et al., 2012). Um extrato etanólico de própolis verde obteve $IC_{50\%}$ 0,052mg/mL, enquanto que extratos aquosos obtiveram valores entre 0,103 mg/mL (IZUTA et al., 2009) e 0,27mg/mL (ROCHA et al., 2012). Em relação à própolis vermelha, excelente $IC_{50\%}$ foi encontrada, de 0,027mg/mL (FROZZA et al., 2013).

Devido à sua potente atividade antioxidante, somente o extrato ESC6 foi avaliado quanto à sua atividade antibacteriana e cicatrizante.

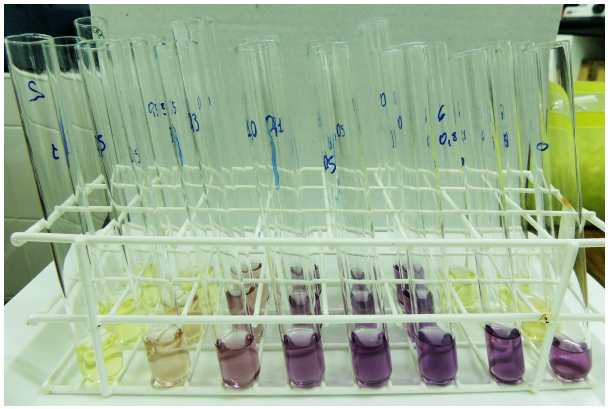


Figura 48 – Branqueamento da solução de DPPH por várias concentrações testadas dos extratos de geoprópolis.

5.3.2 Atividade antibacteriana *in vitro*

Através do método de difusão em ágar, a atividade antibacteriana foi determinada qualitativamente. À medida que a concentração do extrato hidroalcóolico de geoprópolis (ESC6) foi aumentando, houve ampliação dos halos de inibição, demonstrando ação concentração-dependente. As médias dos diâmetros de inibição (expressos em mm) das diferentes concentrações do ESC6 estão apresentados na Tabela 9. Como esperado, todas as bactérias demonstraram sensibilidade à Gentamicina 10µg e o etanol 70% (controle negativo) mostrou baixa atividade inibitória contra os micro-organismos testados.

Tabela 9 – Halos de inibição (mm) das diferentes soluções do extrato ESC6, através do método de difusão em ágar.

Bactérias	**Concentrações do ESC6 (mg/mL)**							**Contr. +**	**Contr. -**
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	Gentam. 10µg	álcool 70%
E. aerogenes	16,66 ± 1,15b	14,00 ± 2,0bc	12,33 ± 2,31c	6,66 ± 0,57d	5,0d	5,0d	5,0d	22,33 ± 2,89a	5,66 ± 0,57d
E. coli	16,33 ± 1,15b	12,66 ± 0,57c	13,66 ± 1,15bc	11cd	8,33 ± 2,31de	6,66 ± 0,57e	6,0e	25,67 ± 2,08a	6,33 ± 0,57e
S. typhimurium	16,00 ± 2,0ab	13,0 ± 2,0b	8,33 ± 2,31c	6,33 ± 0,57c	5,50 ± 0,50c	5,33± 0,57c	5,33 ± 0,57 c	17,33 ± 1,52a	5,33 ± 0,57c
S. aureus	12,66 ± 0,57b	10,33 ± 1,15bc	9,0 ±2,0cd	7,33 ±1,52 cde	6,0 ± 1,0de	5,66 ± 1,15e	5,0e	19,33 ± 0,57a	5,20 ± 0,34e

[a,b,c,d] Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

De um modo geral, o extrato ESC6 apresentou baixos efeitos inibitórios contra as quatro estirpes testadas, já que a concentração do controle positivo está na ordem de microgramas e a concentração dos extratos testados, na ordem de miligramas. Apesar disso, as maiores concentraçãoes testadas (100, 50 e 25mg/mL) foram capazes de inibir tanto bactérias gram-negativas, como a gram-positiva, já que a atividade de diversos tipos de própolis contra bacilos gram-negativos é sabidamente limitada (GONSALES et al., 2006). As bactérias gram-negativas *E. aerogenes* e *E. coli* e a bactéria gram-positiva *S. aureus* apresentaram crescimento inibido a partir do tratamento com 25mg/mL do ESC6, quando comparada ao controle negativo, álcool 70% ($p < 0,05$). Já a bactéria gram-negativa *Salmonella typhimurium*, teve seu crescimento inibido somente quando tratada com concentrações iguais ou superiores a 50mg/mL do ESC6, e a concentração de 100mg/mL formou halos de inibição com a mesma proporção da Gentamicina 10µg.

Os taninos hidrolisáveis podem ser os responsáveis pelo efeito inibitório produzido pela amostra. Nesse sentido, o mecanismo de ação dos taninos está relacionado à capacidade de precipitar proteínas, inibindo enzimas microbianas (SCALBERT, 1991).

Na própolis vermelha, a chalcona isoliquiritigenina foi o composto com maior potência antimicrobiana (OLDONI et al., 2011). Já da própolis obtida no estado da Bahia, isolou-se a hiperibona A, uma benzofenona prenilada, que exibiu atividade contra bactérias gram-positivas (CASTRO et al., 2009). Em relação à *Salmonella typhimurium* resistência dessa bactéria ao tratamento com própolis já tinha sido reportada (ORSI et al., 2007).

Para uma maior elucidação de seu potencial antibacteriano, a geoprópolis de jandaíra deve ser testada através do método de microdiluição, para determinação de sua Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Microbicida Mínima (MMC).

5.3.3 Atividade cicatrizante *in vivo*

Para avaliação da atividade cicatrizante, o extrato ESC6 foi incorporado em creme Lanette® na concentração de 10%.

Desse modo, no 3º dia de tratamento, as lesões dos animais pertencentes ao grupo experimental (GE) apresentavam feridas com bordos discretamente edemaciados e hiperêmicos (Figura 49A). Em quatro animais já havia, inclusive, iniciado o processo de formação de crosta, de aspecto granular e bastante espessa. Na avaliação microscópica dos cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina (HE) observou-se uma crosta serocelular,

com infiltrado neutrofílico moderado (Figura 50A). A derme apresentou neovascularização moderada.

Enquanto isso, os animais do grupo controle (GC) apresentavam feridas com os bordos moderadamente edemaciados e acentuada hiperemia (Figura 49B). Na microscopia havia presença de crosta sobre a ferida composta por hemácias, fibrina, detritos celulares e acentuado infiltrado inflamatório, com predomínio de polimorfonucleares (Figura 50B). Na contagem dos componentes histológicos, foi possível perceber a diferença estatística no número de células inflamatórias entre os grupos GC e GE, demonstrando ação anti-inflamatória do creme de geoprópolis de jandaíra 10% nos animais tratados (Tabela 10 – dia 3).

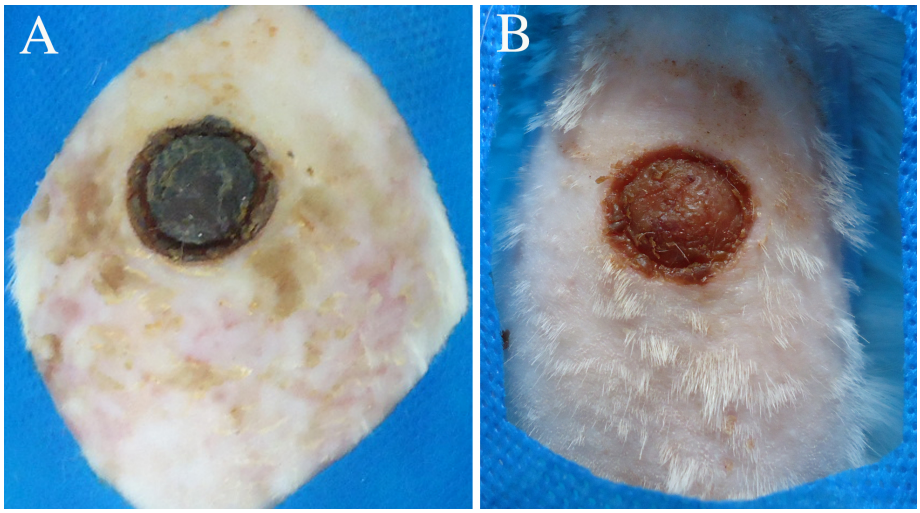


Figura 49 – Aspecto macroscópico de feridas cutâneas em ratos Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 3º dia pós-cirúrgico.

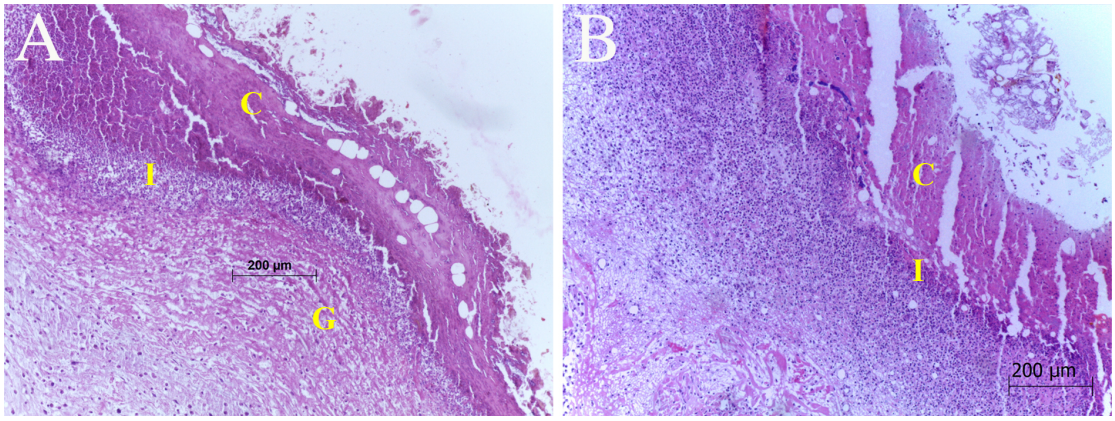


Figura 50 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se acentuada diferença no infiltrado inflamatório (I) de polimorfonucleares entre os grupos GE (A) e GC (B). Área correspondente à crosta espessa (C) e tecido de granulação (G). Obj. 20x. Barra de escala = 200µm.

Tabela 10 – Valores de média ± desvio padrão dos achados histológicos dos animais, pertencentes aos grupos controle (GC) e experimental (GE) nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório.

	Grupos	3 dias	7 dias	14 dias
Células Inflamatórias	GC	190,74 ± 27,90aA	216,96 ± 31,18aA	214,38 ± 52,52aA
	GE	39,25 ± 5,41aB	45,25 ± 11,41aB	20,74 ± 3,05bB
Vasos	GC	5,75 ± 3,34abA	6,25 ± 2,86aB	3,20 ± 1,09bB
	GE	6,50 ± 3,41bA	28,50 ± 6,55aA	7,25 ± 1,70bA
Fibroblastos	GC	0	0	29,70 ± 18,08A
	GE	0	0	34,75 ± 19,87A
Colágeno	GC	0	0	19,06 ± 2,67B
	GE	0	0	173,08 ± 15,38A

GC: Controle; GE- Experimental; [a,b] Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0,05); [A,B] Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0,05).

Durante o experimento, a re-epitelização das lesões do GE, iniciou-se no 6º dia. Até o 7º dia, a maioria dos animais desse grupo (exceto um), já havia desprendido a crosta de cicatrização (Figura 51A), com moderada formação de tecido de granulação e contração (grau de contração 36%) (Tabela 11 – dia 7). As lesões apresentavam redução do edema e discreta inflamação. A microscopia desse grupo, revelou acentuada reepitelização (Figura 52A) e quantidade moderada de células inflamatórias (45,25 ± 11,41), com predomínio de macrófagos. Além disso, acentuada angiogênese foi observada (28,50 ± 6,55) (Figura 53).

Nesse mesmo período, as lesões do GC permaneciam hiperêmicas, com bordos edemaciados (Figura 51B), e havia ainda, em dois animais, presença de exsudato purulento. A microscopia mostrou crosta de aspecto fibrinoleucocitária espessa, com presença de colônias de bactérias, acentuado infiltrado inflamatório (216,96 ± 31,1), com predomínio de macrófagos e re-epitelização apenas nas extremidades das feridas, além de tecido de granulação com padrão fibrovascular (Figura 52B). Uma diferença estatística foi observada na quantidade de células inflamatórias e vasos entre os grupos GE e GC (Tabela 10 – dia 7), mas não em relação ao grau de contração (Tabela 11 – dia 7).

Tabela 11 – Valores de média ± desvio padrão das áreas e grau de contração (%) das feridas em animais.

	Grupos	3 dias	7 dias	14 dias
Área da ferida	GC	3,14aA	2,00 ± 0,20bA	0,65 ± 0,23cA
	GE	3,31 ± 0,61aA	2,00 ± 0,20bA	0,27 ± 0,19cB
% contração	GC	0	36,25 ± 6,55bA	79,00 ± 7,57aB
	GE	0	36,00 ± 6,53bA	91,27 ± 6,16aA

GC – Controle; GE- Experimental; [a,b] Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0,05); [A,B] Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0,05).

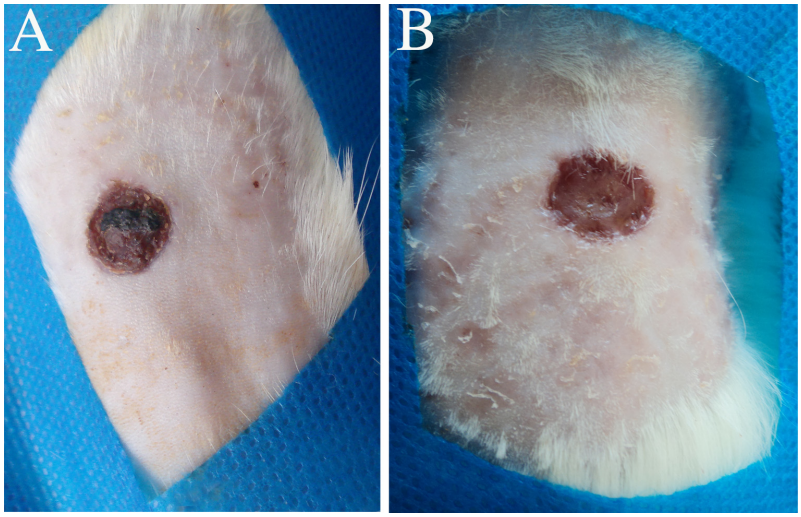


Figura 51 – Aspecto macroscópico de ferida cutânea em rato Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 7º dia pós-cirúrgico.

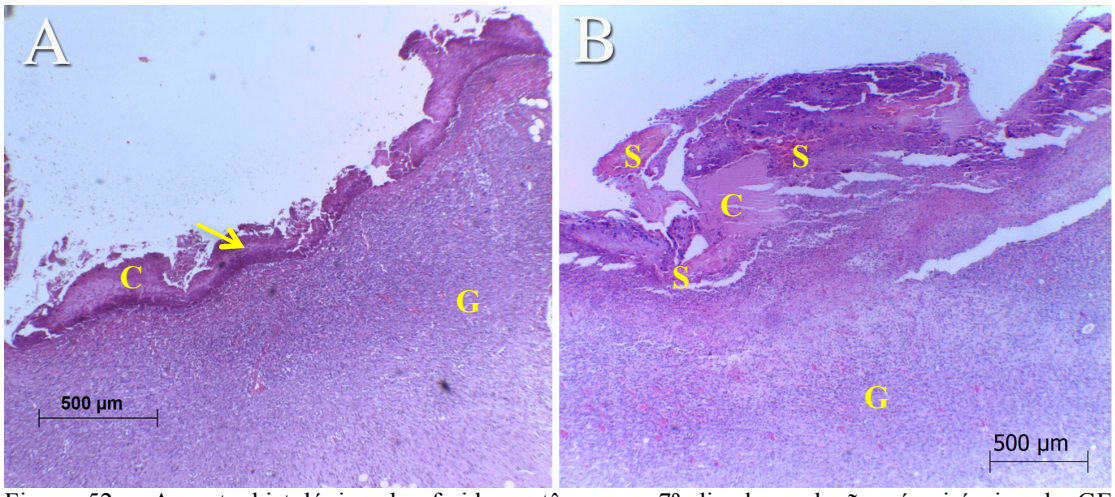


Figura 52 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se área correspondente à crosta (C), coágulos (S) e tecido de granulação (G). Camada basocelular (seta). Obj. 5x. Barra de escala = 500µm.

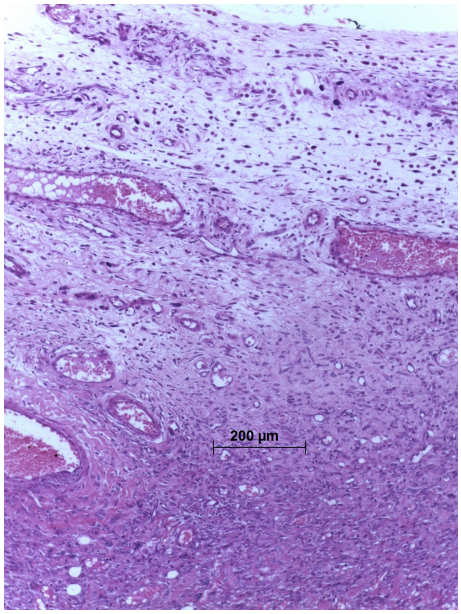


Figura 53 – Intensa angiogênese no GE – grupo experimental – no 7º dia pós-cirúrgico.

No 14º dia do experimento, três dos quatro animais do GE estavam com as feridas totalmente re-epitelizadas tanto na microscopia, quanto na macroscopia (Figura 54A), apresentando elevado grau de contração (91,27 ± 6,16) (Tabela 11 – dia 14). Na análise microscópica observou-se epiderme regenerada (E) e intensa contração do colágeno (F) – cicatriz permanente (Figura 55A). Cristas de cicatrização foram observadas nesse grupo (Figura 56).

Em contrapartida, somente a partir do 11º dia de tratamento, ocorreu o desprendimento das crostas do GC, além disso, estas exibiam bordos macroscopicamente não justapostos e grau de contração de 79 ± 7,57% (Figura 54B).

Na mesma ocasião, a microscopia do GC apresentou manutenção do padrão histológico similar ao descrito no período de sete dias pós-operatório (Figura 55B). Uma diferença estatística foi observada no número de células inflamatórias, vasos e colágeno ($p < 0,05$), mas não de fibroblastos, entre os grupos GC e GE (Tabela 10 – dia 14). Essas verificações sugerem que, o GC requereu mais tempo para cicatrizar.

Durante o tratamento das lesões, apesar de não ter sido demontrada diferença significativa no grau de contração das feridas, entre os grupos GE e GC no 3º e 7º dia pós-operatório, pôde-se observar que os animais que receberam o creme de geoprópolis de *Melipona subnitida* 10% tiveram uma melhor evolução nas lesões, com diminuição do recrutamento de células inflamatórias, ao longo de todo o período experimental, e aumento na angiogênese, bem como na produção de colágeno, nos 7º e 14º dias pós-operatório, respectivamente.

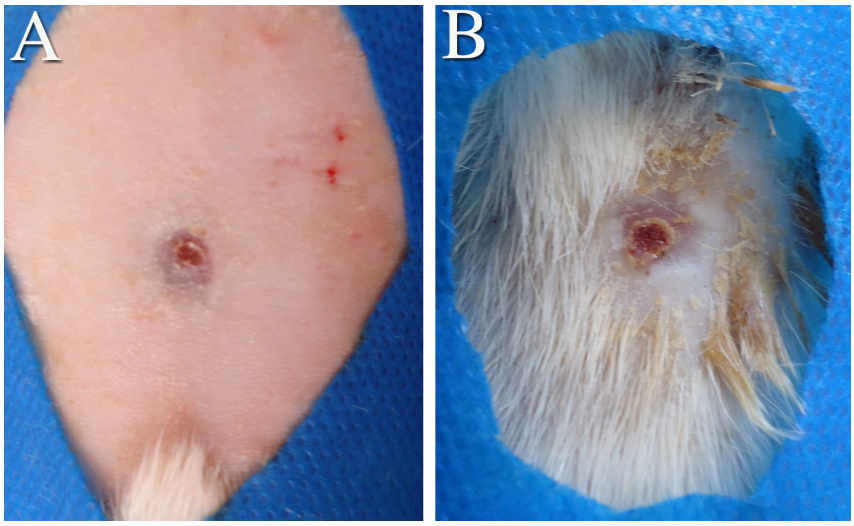


Figura 54 – Aspecto macroscópico de ferida cutânea em rato Wistar, grupo experimental (A) e controle (B), no 14º dia pós-cirúrgico.

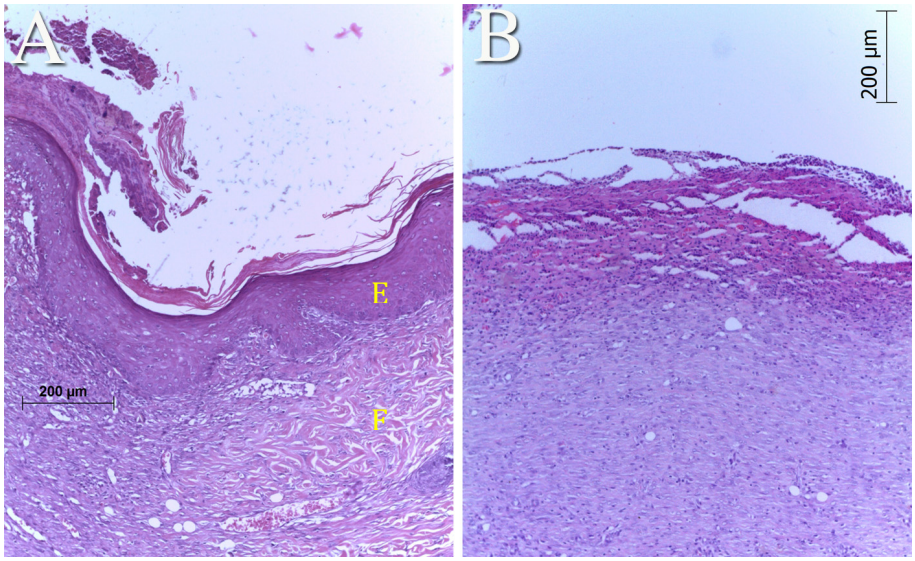


Figura 55 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução pós-cirúrgica do GE – grupo experimental (A) e GC – controle (B). Nota-se área correspondente à epiderme regenerada (E) e fibroblastos e fibras colágenas (F). Obj. 20x. Barra de escala = 200µm.

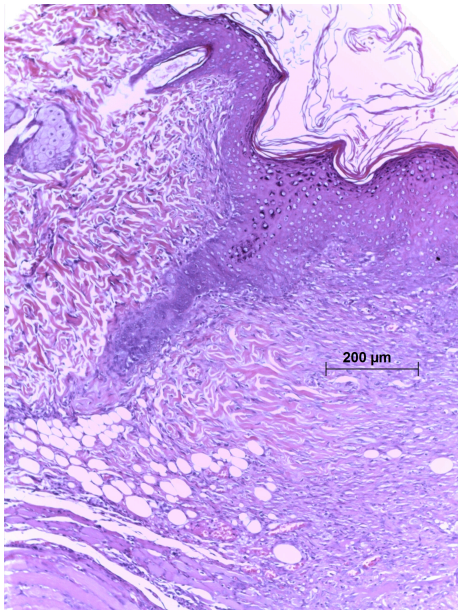


Figura 56 – Crista de cicatrização observada no GE – grupo experimental – no 14º dia pós-operatório.

Levando-se em consideração os resultados aqui apresentados, torna-se relevante lembrar que o processo de cicatrização é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Estas fases complexas e distintas, se sobrepõem afim de assegurar a reparação de tecidos. Essa série de eventos envolve vários tipos de células, que interagem entre si, proporcionando liberação de citocinas, fator de crescimento e outras moléculas bioativas, como radicais livres, culminando na restauração da integridade do tecido (BERRETTA et al., 2012). O processo inflamatório é importante na reparação tecidual, contudo inflamação exacerbada promove edema, quantidade excessiva de exsudato e adicionalmente a isto, mediadores químicos envolvidos na inflamação podem aumentar ainda mais a lesão tecidual, os quais favorecem deiscência e crescimento bacteriano (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 2009).

Nesse sentido, diversas substâncias podem modular as fases do processo cicatricial, incluindo a própolis. A propriedade cicatrizante da própolis está relacionada à presença de ácidos fenólicos e principalmente de flavonóides (ARVOUET-GRAND et al., 1994). No presente estudo, o teor de fenóis totais do extrato ESC6 (11,29 ± 0,26%) foi semelhante aos já descritos na literatura, como os reportados para a amostra de geoprópolis de *Melipona scutellaris* (12,7%) e para amostras de própolis verde (7,39%) (FUNARI e FERRO, 2006; FRANCHIN et al., 2012).

Em relação ao experimento de cicatrização, este estudo apresentou resultados similares a estudos anteriores. O mel de *Melipona subnitida* foi capaz de diminuir o tempo médio de cicatrização, a resposta inflamatória, através de estímulo imunológico, além de

reduzir bactérias gram-negativas e positivas em feridas infectadas de ratos (ALVES et al., 2008). No entanto, o uso tópico de própolis verde e vermelha (sob a forma de pomada 20%) na reparação de feridas em ratos, não diferenciou de forma estatística significante o diâmetro das lesões ao longo do período experimental, mas o grupo tratado com pomada de própolis verde a 20% demonstrou evolução ligeiramente melhor (BATISTA et al., 2012).

A análise histológica realizada neste estudo obteve resultados semelhantes aos de Berretta (2012), que através de modelo animal, mostrou diminuição do recrutamento de células inflamatórias, estimulação da angiogênese e produção de colágeno após tratamento com própolis. A atividade antioxidante da própolis também parece contribuir na regenação tecidual, através da minimização de mecanismos de peroxidação lipídica e atividade anti-radicalar (MARQUELE et al., 2005). Aliado a isso, a atividade antibacteriana age sinergicamente com a atividade anti-inflamatória, contribuindo ainda mais no processo cicatricial, mantendo as feridas limpas. Dessa forma, as promissoras atividades antioxidante e antibacteriana do extrato ESC6, também verificadas nesse estudo, podem ter contribuído para o processo cicatricial.

Nesta pesquisa, o parâmetro grau de contração foi obtido a partir da relação entre a área da lesão no dia da biópsia e a área inicial. Apesar de diferença estatística significativa ter sido observada somente no 14º dia pós-operatório, durante todo o período de tratamento, tanto na análise microscópica, como na macroscópica, percebeu-se melhor evolução nos animais pertencentes ao grupo experimental (GE). Assim, os animais que foram tratados com o creme de geoprópolis 10% apresentaram feridas com sinais discretos de inflamação. Além disso, iniciaram o processo de re-epitelização precocemente, quando comparados aos animais que receberam apenas o creme base Lanette®. Por fim, os dados obtidos nesse estudo abrem perspectivas ao uso de geoprópolis *Melipona subnitida* como agente colaborador da cicatrização na medicina não-convencional, especialmente na região do semi-árido nordestino brasileiro.

5.4 ENSAIO TOXICOLÓGICO PRELIMINAR *IN VITRO*

A análise dos resultados foi realizada através da relação entre a dose letal média (CL_{50}), considerando-se citotóxico os valores de $CL_{50} < 1000\mu g/mL$, que indicam potencial atividade antitumoral (McLAUGHLIN, CHANG e SMITH, 1993). Além da atividade antitumoral, a toxicidade contra *Artemia salina* mostra boa correlação com as atividades inseticida (MEYER et al., 1982) e anti-tripanossoma cruzi (ALVES et al., 2000). Por outro lado, uma baixa toxicidade ou ainda, a ausência desta, pode ser considerada uma propriedade importante no uso de extratos vegetais em ambientes naturais.

O extrato etanólico da geoprópolis de jandaíra (ESC6) apresentou valor médio da CL_{50} de 1282,61 μg/mL, demonstrando ausência de toxicidade ($CL_{50} > 1000$ μg/mL). Estudos de toxicidade contra *A. salina* com própolis de meliponíneos indicaram que algumas amostras não foram citotóxicas e outras, principalmente aquelas ricas em diterpenos, se mostraram tóxicas contra o microcrustáceo (VELIKOVA et al., 2000 apud SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011).

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que as amostras A1-A4 de geoprópolis de *Melipona subnitida* são de boa qualidade, pois atenderam aos requisitos do Ministério da Agricultura (com exceção da amostra A5 – que estava com infestação). Na caracterização botânica foi possível observar que, mesmo em um ambiente de flora rica (Caatinga), as abelhas jandaíra parecem visitar apenas algumas espécies vegetais, especialmente aquelas pertencentes à subfamília Mimosoideae.

A análise química, realizada através de TLC (condição cromatográfica 3 – placa celulose alumínio sem fluorescência, sistema eluente ácido acético 45% e revelador NEU), mostrou que as amostras A1, A2, A3, A4 e A5 apresentavam o mesmo perfil químico, tanto em extratos com cera (EC), como nos extratos sem cera (ESC), tendo como compostos majoritários derivados de flavonóis e flavonas. Compostos das classes das xantonas, taninos hidrolisáveis e triterpenos também foram detectados nessas amostras. Já as amostras A6 e A7 exibiram outro perfil químico, tendo o ácido gálico e taninos hidrolisáveis, como principais componentes. A análise em LC/UV-DAD confirmou os resultados obtidos na TLC, mostrando sete compostos majoritários nos extratos ESC 1, 2, 3, 4 e 5, estando entre eles, flavonóides e ácidos fenólicos. Enquanto isso, o extrato ESC6 exibiu abundância de ácidos fenólicos em sua composição, incluindo o ácido gálico.

O teor dos fenóis totais nas amostras de geoprópolis variou entre 2,845 ± 0,059% (EC3) e 11,291 ± 0,262 % (ESC6). Todos os extratos EC mostraram menor teor de fenóis totais que seus respectivos extratos ESC. Dentre as amostras testadas, as seguintes: A1 (EC), a A3 e A7, não cumpriram com o teor mínimo dos fenóis totais preconizado pelo Ministério da Agricultura. A atividade antioxidante também foi maior nos extratos ESC, tendo a amostra A6 maior capacidade antioxidante ($IC_{50\%}$ = 0,084). Boa correlação (R^2=0,86) entre a $IC_{50\%}$ e o teor de fenóis totais dos extratos sem cera (ESC) foi observada, permitindo atribuir a atividade antioxidante a esses compostos.

Em relação à atividade antibacteriana, o extrato ESC6 apresentou baixos efeitos inibitórios contra as quatro estirpes testadas, sendo *Salmonella typhimurium* a bactéria mais resistente. Já o tratamento com o creme de geoprópolis de *Melipona subnitida* 10% foi capaz de diminuir os sinais de inflamação, estimular a angiogênese e a produção de colágeno, adiantando o processo de re-epitelização nos animais tratados; entretanto, somente no 14º dia pós-operatório houve diferença estatisticamente significante no grau de contração. Esse

mesmo extrato mostrou ausência de toxicidade no ensaio preliminar contra *Artemia salina* apresentando valor médio de CL_{50} de 1282,61 μg/mL.

Por fim, estes resultados abrem perspectivas para o uso da geoprópolis de jandaíra na medicina não convencional, como antioxidante, antibacteriano e cicatrizante, considerando sua riqueza em compostos fenólicos. Pela primeira vez, os perfis morfológico e químico dessas amostras foram reportados. Esses dados ressaltam a importância do controle de qualidade e contribuem para a padronização desse tipo de própolis, já que a legislação brasileira está voltada para a própolis produzida pela abelha *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. M. et al. Effect of topical application of different substances on fibroplasia in cutaneous surgical wounds. **ISRN Dermatology**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

AHN, M. R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007.

ALBUQUERQUE, I. L. et al. Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. **Journal of Essential Oil Research,** v. 20, n. 5, p. 414-415, 2008.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1698-1706, 2013.

ALVES, D. F. S. et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A. Notas sobre a Bionomia de *Melipona mandacaia* (Apidae: Meliponina). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 204-212, 2007.

ALVES, T. M. D. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMARANTE, M. K. et al. The effect of propolis on CCL5 and IFN-γ expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 154-60, 2012.

ANDRADE FERREIRA, F. B. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.

ARAUJO, C. E. P. et al. Análise química, toxicológica e antiulcerogênica preliminar de uma amostra de própolis da região do Paraná. **Lecta-USF**, v. 20, n. 1, p. 47-52, 2002.

ARVOUET-GRAND, A. et al. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **Journal de Pharmacie de Belgique,** v. 49, n. 6, p. 462-468, 1994.

ASHRY, E. S.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2012.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition.

Bioorganic and Medical Chemistry, v. 16, n. 1, p. 181-9, 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. et al. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 607, n. 1, p. 150-153, 1992.

BANSKOTA, A. H. et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001.

_____. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.

_____. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products,** v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.

BARROS, M. P. et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 110, n. 3, p. 567-571, 2007.

BARROS, M. P. et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 120, n. 3, p. 372-7, 2008.

BARROS SILVA, R. et al. Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Neuroscience,** v. 233, p. 86-94, 2013.

BARROSO, P. R. et al. Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology,** v. 20, n. 5, p. 289-94, 2012.

BARTH, O. M.; MELHEM, T. S. **Glossário ilustrado de Palinologia**. Campinas: Editora Unicamp, 1988.

BASTOS, E. M. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 273-81, 2008.

BASTOS, E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.

BATISTA, L. L. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-20, 2012.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 512-21, 2012.

BERTOLINI, P. F. et al. Antimicrobial capacity of *Aloe vera* and propolis dentifrice against

Streptococcus mutans strains in toothbrushes: an *in vitro* study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 1, p. 32-7, 2012.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 51, n. 1, p. 17-23, 2009.

BORGES, K. S. et al. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 2, p. 310-4, 2011.

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

BRASIL. **Portaria nº 3.916/MS/GM, de 30 de outubro de 1998**. Brasília, 1998.

_____. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001.** Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

BRUENING, H. **Abelha jandaíra**. 2 ed. Mossoró: Coleção Mossoroense, 1990.

BURIL, M. T.; SANTOS, F. D. A. R. D.; ALVES, M. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** v. 24, n. 1, p. 53-64, 2010.

BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M.; SFORCIN, J. M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine,** v. 6, n. 4, p. 483-7, 2009.

BÚFALO, M. C. et al. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1669-80, Nov 2009.

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

CAMPOS, R. O. P. et al. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 50, n. 10, p. 1187-1193, 1998.

CAMPOS, V. A. C. et al. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. **Ciência e Agrotecnologia,** v. 35, n. 6, p. 1043-1049, 2011.

CAPUCHO, C. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. **Food Chemistry Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 3956-62, 2012.

CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.

CARDOSO, R. L. et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 432-4, 2010.

CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoral activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CASTRO, S. L.; HIGASHI, K. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 46, n. 1, p. 55-58, 1995.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512, 2007.

_____. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5332-5, 2009.

_____. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 9, p. 25, 2009.

CASTRO, V. F. et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 966-972, 2011.

CASTRO, P. A. et al. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell,** v. 10, n. 3, p. 398-411, 2011.

CASTRO, P. A. et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 12, p. 194, 2012.

CAVALCANTE, D. R. et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 3, p. 278-84, 2011.

CHANG, R. et al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n. 4, p. 549-556, 2008.

CHIKARAISHI, Y. et al. Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 4, p. 566-75, 2010.

CINEGAGLIA, N. C. et al. Cytotoxic Action of Brazilian Propolis in vitro on Canine Osteosarcoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 9, p. 1277-1281, 2012.

CLIFFORD, M. N. et al. Characterization by LC-MS of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4095-4101, 2006.

COELHO, L. G. V. et al. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study. **Helicobacter**, v. 12, n. 5, p. 572-574, 2007.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 23, 2013.

CUNHA, M. S. et al. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, n. 3, 2010.

CÁMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciência da Terra,** v. 4, n. 1, 2004.

DALBEN-DOTA, K. F. et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-90, 2010.

DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 557-66, 2012.

_____. Suppression of hypoxia-inducible factor-1α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 441-447, 2012.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DORNELAS, C. A. et al. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 529-536, 2012.

_____. Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 185-192, 2012.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Área de ocorrência do Bioma Caatinga e altimetria do Semiárido brasileiro**.
In: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html. Acesso em: 18 de out 2013, il. color. 2013.

ENDO, S. et al. Selective inhibition of human type-5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 716-721, 2012.

FABRIS, S. et al. Antioxidant properties and chemical composition relationship of europeans and brazilians propolis. **Pharmacology and Pharmacy**, v. 4, p. 46-51, 2013.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA 9. Edição Oficial: Portugal, 2008.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities

of propolis: a critical review. **Current Nutrition & Food Science,** v. 6, n. 3, p. 186-199, 2010.

FISCHER, G. et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 116, n. 1-2, p. 79-84, 2007.

FRANCHI, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine,** v. 2012, p. 918-956, 2012.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 beta and TNF-alpha. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 143, n. 2, p. 709-715, 2012.

FREITAS, B. M. **A vida das abelhas**. CD-ROM. Fortaleza: Craveiro & Craveiro,1999.

FREITAS, J. A. et al. The effects of propolis on antibody production by laying hens. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1227-1233, 2011.

FREITAS, S. F. et al. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine,** v. 13, n. 3, p. 170-175, 2006.

FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 206-212, 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. ANÁLISE DE PRÓPOLIS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

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

GIULIETTI, A. M. et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: Silva JMC, Tabarelli M & Fonseca MT (Orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p. 48-90, 2004.

GIULIETTI, A. M.; PAULA, A.; BARBOSA, D. **Vegetação: áreas e ações prioritárias para a conservação da Caatinga.** In: Silva JMC, Tabarelli M & Fonseca MT (Orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. v. 1, p. 113-131, 2004.

GONSALES, G. Z. et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases,** v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GREGORY, S. R. et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A

naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **Journal of Alternative and Complementary Medicine,** v. 8, n. 1, p. 77-83, 2002.

GRESSLER, L. T. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1314-1317, 2012.

HATTORI, H. et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5392-5401, 2011.

IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 383-388, 2012.

IKEDA, R. et al. Brazilian propolis-derived components inhibit TNF-α-mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 695-703, 2011.

INOKUCHI, Y. et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** v. 3, n. 1, p. 71-77, 2006.

ISHIDA, V. F. C. et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry,** v. 125, n. 3, p. 966-972, 2011.

IZUTA, H. et al. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 12, p. 1947-51, 2009.

JUNIOR, W. B. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

JÚNIOR, A. F. et al. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

KAKINO, M. et al. Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 192-200, 2012.

KONEMAN, E. W.; CURY, A. E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOO, H. et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *Mutans streptococci.* **Current Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-40, 2008.

LIBERATO, M. C. T. C. et al. Prospecção fitoquímica e caracterização de própolis do Ceará. In: 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2008, Rio de Janeiro. **Anais do 48º Congresso Brasileiro de Química**, trabalho nº 175.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-9, 2011.

LIBERIO, S. A. et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 1-9, 2009.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw-Hill, 1968.

MACHADO, J. L. et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

MAHYBE, M. **Abelha Jandaíra - *Melipona subnitida***. Nativa do Bioma Caatinga do Nordeste Brasileiro. Disponível em: < http://pt.treknature.com/gallery/South_America/Brazil/photo179688.htm>. Acesso em: 21 out. 2013, il. color. 2008.

MAIA-SILVA, C. et al. **Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga**. 1ª ed., Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, 2012.

MANI, F. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 95-98, 2006.

MANTOVANI, R. P. et al. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the E-test method. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases,** v. 14, n. 2, p. 357-365, 2008.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Ver. Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MARQUELE, F. D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 455-462, 2005.

MARUYAMA, H. et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R. et al. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 28, n. 1, p. 178-181, 2008.

MATOS, F. J. D. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: edições UFC, 2009.

McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Simple bench-top bioassays (BS e PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress. In: Kinghorn, A.D.; Balandrini, M.F. (Eds). **Human Medicinal Agents from Plants**, New York: Oxford University Press, 1993. p. 112-137.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982. ISSN 0032-0943.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. Is propolis safe as an alternative medicine? **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 479-495, 2011.

MISSIMA, F. et al. The effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1501-1507, 2010.

MISSIMA, F.; SFORCIN, J. M. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** v. 5, n. 1, p. 71-75, 2008.

MONTEIRO NETO, M. D. A. B. et al. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.

MONTERO, J. C.; MORI, G. G. Assessment of ion diffusion from a calcium hydroxide-propolis paste through dentin. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. 4, p. 318-322, 2012.

MORAES, C. S. et al. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos,** v. 30, n. 2, p. 539-543, 2010.

MORI, G. G. et al. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. **Dental Traumatology**, v. 26, n. 1, p. 80-85, 2010.

MOURA, S. A. et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

_____. Aqueous extract of brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NAKAJIMA, Y. et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Science**, v. 80, n. 4, p. 370-377, 2007.

_____. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1431-1438, 2009.

NIKOLAEV, A. B. **A Remarkable Hive Product, Propolis: scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics**. Bucharest: APIMONDIA Standing Commission on Beekeeping Technology and Equipment, 1978.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Tecnapis, 1997.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

ORSATTI, C. L. et al. Th1/Th2 cytokines expression and production by propolis-treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 314-318, 2010.

ORSI, R. D. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 108-112, 2006.

ORSI, R. O. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 748-757, 2007.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 265-273, 2003.

_____. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005.

ORSOLIC, N. et al. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: A possible mode of antitumor action. **Nutrition and Cancer**, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2003

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition

of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 296-301, 2008.

PEREIRA, A. D. et al. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2580-2584, 2008.

PESSOLATO, A. G. et al. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

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

PONTIN, K. et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitological Research**, v. 103, n. 3, p. 487-492, 2008.

PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

RAMOS, I. F. et al. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an in vivo study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 1, p. 50-56, 2012.

RAMSEY, D. T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

REZENDE, G. P. et al. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Brazilian Dental Jounal**, v. 19, n. 4, p. 301-305, 2008.

RICARDO, L. R. et al. Effects of propolis on lingual mucosa response of hamsters submitted to experimental carcinogenesis. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 10, n. 12, p. 1443-1450, 2012.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

ROCHA, B. A. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 87-94, 2012.

SA-NUNES, A.; FACCIOLI, L. H.; SFORCIN, J. M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93-97, 2003.

SAID, R. A. et al. Absence of chemopreventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 4, p. 405-412, 2010.

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

_____. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2008.

SANTANA, H. F. et al. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012.

SANTOS, F. A. et al. Susceptibility of *Prevotella intermedia*/*Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 9-15, 2002.

SANTOS, V. R. et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. **Phytotherapie Research**, v. 22, n. 11, p. 1544-1547, 2008.

SANTOS, C. G. et al. Age polyethism in *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera: Apidae) colonies related to propolis handling. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 691-696, 2010.

SANTOS, M. J.; DO AMARAL CARNEIRO, L.; VIANNA, M. A. G. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 199-204, 2007.

SANTOS, T. F. et al. MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 5, p. 1425-1430, 2008.

SARTORI, G. et al. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by *Herpes simplex* virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Cell Biochemistry & Function**, v. 30, p. 1-10, 2011.

SAWAYA, A. C. et al. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 81, n. 1-2, p. 100-108, 2010.

SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 1-10, 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; JANIN, G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1324-1329, 1989.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009.

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

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

SHENG, J. et al. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 249-253, 2007.

SHIMAZAWA, M. et al. Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 201-207, 2005.

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SHINMEI, Y. et al. Effect of Brazilian propolis on scratching behavior induced by compound 48/80 and histamine in mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 10-11, p. 1431-1436, 2004.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. A. D. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 6, p. 507-511, 2006.

_____. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and

antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2012.

SIMIONATTO, E. et al. Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 57, n. 3, p. 1240-1243, 2012.

SIMOES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 59-65, 2004.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102-1108, 2010.

SIQUEIRA, A. B. S. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 90-96, 2009.

SOUSA, J. P. B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 85-93, 2007.

SOUZA, B. D. A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

_____. **Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SOUZA, S. A. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Química de Compostos Bioativos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

TAKEMURA, T. et al. 3, 4-dicaffeoylquinic acid, a major constituent of brazilian propolis, increases TRAIL expression and extends the lifetimes of mice infected with the influenza A virus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2011.

TANI, H. et al. Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 151-157, 2010.

TAVARES, D. C. et al. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1154-1158, 2006.

TAVARES, L. C. et al. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2051-2054, 2010.

TEIXEIRA, T. W. et al. Bauer-7-en-3 beta-yl acetate: A major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 245-246, 2006.

TROCA, V. B. et al. Effect of green propolis addition to physical mechanical properties of glass ionomer cements. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 2, p. 100-105, 2011.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VALADARES, B. L.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1103-1110, 2008.

VALENTÃO, P. C. R. **Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra: Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica: Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora.** 2002. 316f. Tese (Doutorado em Farmacognosia) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2002.

VALERA, M. C. et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 110, n. 4, p. 70-74, 2010.

VARGAS, A. C. D. et al. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 9/10, p. 785-789, 2000.

_____. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693-696, 2000.

VICTORINO, F. R. et al. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 6, p. 621-624, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis:A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2ª ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation - study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 237-243, 2004.

WATANABE, E. et al. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 4, p. 275-9, 2008.

WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **In: Ninth informational supplement NCCLS document M100-S9**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.

ZANELLA, F. C. V. Apifauna da caatinga (NE do Brasil): biogeografia histórica, incluindo um estudo sobre a sistemática, filogenia e distribuição das espécies de Caenonomada ashmead, 1899 e Centris (paracentris) cameron, 1903 (Hymenoptera, apoidea, apidae). 1999. 162f. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, 1999.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. **Ecologia e conservação da Caatinga**, p. 75-134, 2003.

ZHU, W. et al. Protective effects of Chinese and Brazilian propolis treatment against hepatorenal lesion in diabetic rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1246-1255, 2011.