



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

**CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS, FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

MOSSORÓ-RN
2015

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

**CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS, FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Dejair Message –
UFERSA

MOSORÓ-RN
2015

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Ferreira, Joselena Mendonça.

Características sensoriais, físico-químicas e atividade biológica da própolis produzida no semiárido do estado do Rio Grande Do Norte, Brasil / Joselena Mendonça Ferreira. - Mossoró, 2015.

90f: il.

1. Abelha. 2. Própolis. 3. Antioxidante. 4. Características organolépticas. 5. Antimicrobiana. I. Título

RN/UFERSA/BCOT/434

CDD 638.1 F383c

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

**CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS, FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovação em 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Dejaif Message

Lionel Segui Gonçalves



Kátia Peres Gramacho

DADOS CURRICULARES DO(A) AUTOR(A)

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA nasceu em 04 de julho de 1991, na cidade de Natal no Estado do Rio Grande do Norte. Obteve diploma de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) pela Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) no ano de 2012. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica, atuando na área de Fisiologia e Ecologia Comportamental e também como bolsista pela 12ª DIREN, lecionando as disciplinas de Ciências e Biologia para alunos do ensino fundamental, médio e EJA. Após a graduação, atuou como estagiária voluntária no Centro Tecnológico de Apicultura e Meliponicultura do Rio Grande do Norte (CETAPIS), onde se envolveu com a pesquisa no campo da Apicultura. Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), aonde desenvolve trabalhos com qualidade de produtos apícolas, especificamente com avaliação da qualidade da própolis produzida por abelhas africanizadas da região.

Ao meu Senhor e Salvador

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ser quem Ele é antes de tudo. Pelo seu cuidado, amor, poder, paciência, bondade. Por ter sido misericordioso comigo e ter enviado o Seu Filho Amado para salvar pobres pecadores. Por ter me incluído e me feito participante da Sua Igreja. Pelo seu plano perfeito e amor infinito demonstrado, da forma mais sublime, no sacrifício de Jesus Cristo, para que seu nome fosse glorificado em toda a Terra. Por ser tudo aquilo que diz ser: Criador, Salvador, Pai, Amigo, Consolador, Fiel... Por estar me ensinando a viver. Por ter me feito enxergar a sua glória e majestade. Por me fazer entender que não há palavras suficientes no mundo que possam expressar tamanha gratidão pela sua graça sobre mim. E por ter me dado à esperança de estar ao seu lado eternamente, em sua presença, onde há delícias eternas e plenitude de alegria.

Aos **meus pais** por terem sido enviados por Deus para cuidarem de mim, me amarem e formarem o meu caráter. Por terem sido meus provedores, professores, me ensinando o significado de família e de como é importante honrá-la. Obrigada mainha e painho, por toda a dedicação e apoio, e por terem segurado a saudade da filha caçula por todos esses anos, para que ela pudesse correr atrás daquilo que gosta de fazer e que passou a achar importante graças aos seus ensinamentos.

A **minha irmã Edilena**, por todo o incentivo e amor. Por tudo que passamos juntas, muitas alegrias e muitos momentos de tristezas. Pela confiança mútua e cuidados constantes. Por estar ao meu lado mesmo quando nossas ideias se distanciam a ponto de ficarem opostas. Amo você e sou feliz em tê-la como irmã!

Ao meu único **irmão Daniel** (*in memoriam*), apesar de saber que não irá me ouvir mais e que não há esperança para aqueles que morreram sem Cristo... Gostaria de agradecer a Deus por ele em minha vida. Por que me ensinou a amá-lo, tendo-o criado em amor e a sua imagem. E por ter me ensinado muito sobre a sua soberania através de todo o sofrimento que passei por sua morte pouco antes da minha defesa.

Aos **demais familiares** que estiveram presentes em minha caminhada durante essa etapa. A minha querida tia Maria do Carmo, irmãs Débora e Daniely, sobrinho Darlan e primos. Obrigada por acreditarem em mim, me abrigarem e me amarem durante todos esses dias. Vocês são muito importantes para mim.

A **Igreja de Deus** por ter sido minha família em Cristo aqui na terra. Por me ensinar na prática o significado de ser cristã. Todos se tonaram meus irmãos em Cristo e isto é algo fantástico e sobrenatural. Apesar de serem muitos, lembro-me com carinho de cada um e agradeço imensamente pelas orações, ensinamentos da palavra e pelo amor bíblico que foi me dado de forma espontânea por intermédio do Espírito de Deus.

Ao meu irmão em Cristo e amigo **Gabriel** por todo apoio, leituras cansativas das versões do meu trabalho, paciência e amor. Sou grata ao Senhor Deus por tê-lo colocado em minha vida e por ter sido tão cuidadoso nos detalhes que há em você, incluindo a sua chatice e seu companheirismo.

Ao meu **querido orientador Dr. Dejair Message**, por ter se disposto a me orientar da melhor maneira possível. Ter me auxiliado e apoiado em todos os momentos. Me ensinado não somente a fazer pesquisa, mas a fazer pesquisa com alegria e interesse verdadeiro, apesar das dificuldades e desafios que enfrentamos. Ter contribuído na minha paixão pelas abelhas e no desenvolvimento do meu trabalho. Receba de coração minha sincera admiração pela sua pessoa e meu agradecimento por tudo que fez por mim.

Ao professor Dr. **Lionel Segui Gonçalves**, por ser alguém especial, que me fez entender o significado de perseverar naquilo que gostamos de fazer. Obrigada pelos ensinamentos iniciais sobre as abelhas, por ter me auxiliado no início de minha pesquisa e por ter me colocado em boas mãos quanto a minha orientação. Meu muito obrigado pelo cuidado que teve comigo.

Ao professor Dr. **Jean Berg Alves** pelo apoio no decorrer da minha caminhada. Pela sinceridade, caráter e pela coordenação cuidadosa, em se preocupar de verdade com seus alunos e não medir esforços para ajudá-los naquilo que esta ao seu alcance.

Aos **apicultores** Aldifran (Comunidade Canafístula) e Francisco (Assentamento Jurema), e aos representantes da Associação de Apicultores dos municípios de Areia Branca e Cerro Corá, que colaboraram e participaram ativamente desta pesquisa, sempre de bom grado e que se tornaram, ao longo de dois anos, mais que colaboradores. Espero, sinceramente, que o nosso objetivo maior em colaborar com vocês no auxílio e desenvolvimento da apicultura no RN seja bem sucedido.

Aos professores Dr. **Antonio Salatino** e Dra. **Maria Luiza Salatino** e a toda a equipe do Laboratório de Fitoquímica da USP, Instituto de Botânica, que me ajudaram durante boa parte da minha pesquisa. Pela forma acolhedora com que me receberam e me ensinaram. Meu obrigada de coração a todos vocês.

A **Carol** por ter me ajudado muito no ensino dos métodos, desenvolvimento da pesquisa e interpretação dos resultados que obtive no Laboratório de Fitoquímica – USP. Meu muito obrigado pela paciência e dedicação durante todo o tempo que passei aprendendo com você.

A toda a **equipe do CETAPIS**, pelo apoio e incentivo na minha pesquisa, em especial ao Ricardo Gonçalves, Hérica Tertulino e Dayana Sombra.

A **CAPES**, pelo suporte financeiro.

A **equipe do LIPOA**, em especial a Rociene e Carla por todo o ensino e colaboração nas análises microbiológicas deste trabalho.

As **amigas** de mestrado e companheiras de casa alugada, Geysa Viana e Ana Paula. Sou grata a Deus por ter colocado as duas em minha vida. Sei que ele nos uniu para que fosse possível obtermos um aprendizado que jamais conseguiríamos se estivéssemos morando sozinhas. Vocês são as minhas veterinárias preferidas!



*Rendei graças ao Senhor, porque Ele é bom,
porque a sua misericórdia dura para sempre. O
Senhor é a minha força e o meu cântico, porque
Ele me salvou.*

Salmo 118: 1, 14.

*Propolis made by bees, bee made by God ...
In everything give thanks, says Christian psalm!
Bee brings resin, resin good to take care of their offspring and also the offspring of men
and animals ... God brings its beauty and its healing through the workings of nature!*

(unknown author)

RESUMO

As pesquisas com a própolis têm demonstrado o quanto esse produto tem potencial para diversos fins terapêuticos. No entanto, já foi verificado que essa resina possui uma variabilidade de compostos e atividades biológicas dependendo do seu local de origem, devido a diferenças nas vegetações de um local para outro. O objetivo deste estudo foi verificar as características organolépticas, físico-químicas, e as atividades antimicrobiana e antioxidante da própolis produzida em diferentes cidades do estado do Rio Grande do Norte (Mossoró, Areia Branca, Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra e Cerro Corá). Foi identificado os meses de maior produção nos apiários de Mossoró e Alto do Rodrigues e as variações em suas propriedades ao serem avaliadas em dois períodos distintos do ano (pós-chuvoso e seco). As amostras de própolis foram coletadas nos cinco apiários, cada um com 9 colmeias do tipo Langstroth contendo colônias de abelhas *Apis mellifera*. O método de produção ocorreu a partir da introdução de uma barra de madeira com dimensões de 370 mm x 20 mm x 20 mm na parte frontal e outra na traseira, entre o ninho e a melgueira, criando um espaço de aproximadamente 20 mm nas duas laterais, onde a própolis produzida foi coletada. Após as coletas, as amostras de própolis foram pesadas, avaliadas quando as características organolépticas (cor e consistência) e armazenadas em freezer. Para a extração em etanol, foram feitos conjunto de amostras das própolis coletadas das colônias por apiário, sendo 4 para amostras de Mossoró, 2 de Alto do Rodrigues, 1 de Areia Branca e 1 de Afonso Bezerra e 1 de Cerro Corá, totalizando 9 conjuntos amostrais. Logo após, foram feitos extratos etanólicos destes para quantificação de fenóis, flavonóides, ceras totais, atividades antimicrobiana e antioxidante. Para a atividade antioxidante, foram realizados os testes do radical livre DPPH e o sistema β -caroteno/ácido linoleico. Na avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos foram testados frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A própolis do município de Alto do Rodrigues obteve maiores médias de produção quando comparada a do apiário em Mossoró. Os extratos apresentaram resultados significativos em todos os testes, com composição e atividade biológica diversificada. Sete das nove amostras avaliadas possuíram teores de ceras de acordo com o exigido pela legislação. Houve correlação significativa entre os níveis de ceras e os teores de fenóis totais ($R^2 > 0,5$). As amostras de própolis de Afonso Bezerra e Mossoró apresentaram níveis de flavonóides superior aos comumente encontrados em amostras de própolis brasileiras. Os extratos de Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra e Mossoró foram mais promissores na avaliação físico-química e atividade antioxidante e antimicrobiana. Na atividade antioxidante, a amostra de Alto do Rodrigues (52%), juntamente com a amostra de Areia Branca (75%) obtiveram os melhores percentuais pelos métodos do DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico, respectivamente. Nos testes de atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* e *E. coli*, as amostras de Alto do Rodrigues e Afonso Bezerra tiveram um melhor desempenho na atividade antimicrobiana, por terem formado halos de inibição em todas as concentrações testadas em ambas às cepas. Em geral, as amostras apresentaram atividade biológica e perfil físico-químico diversificado.

ABSTRACT

Surveys of propolis have shown how this product has the potential for various therapeutic purposes. However, it has been found that this resin has a variability of compounds and biological activities depending on their place of origin, due to differences in vegetation from one location to another. The objective of this study was to verify the organoleptic, physico-chemical, and antimicrobial and antioxidant activity of propolis produced in different cities in the state of Rio Grande do Norte (Mossoró, Areia Branca, Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra and Cerro Cora). Was identified the months of highest production in the apiaries of Mossoró and Alto do Rodrigues and variations in their properties to be assessed in two different periods of the year (post-rainy and dry). The propolis samples were collected in the five apiaries, each with 9 beehives of Langstroth type containing colonies of *Apis mellifera* bees. The method of production occurred after the introduction of a wooden bar with dimensions of 370 x 20 x 20 mm in the front and one at the rear, between the nest and the supers, creating a space of approximately 20 mm on each side where propolis produced was collected. After harvesting, the propolis samples were weighed, evaluated when the organoleptic characteristics (color and consistency) and stored in a freezer. For extraction in ethanol, were made set of propolis samples collected from colonies per apiary, 4 for sample Mossoró, 2 of Alto do Rodrigues, one of Areia Branca and 1 Afonso Bezerra and 1 Cerro Cora, totaling 9 sets sample. Thereupon, ethanolic extracts were made to quantify these phenols, flavonoids, total waxes, antimicrobial and antioxidant activities. For the antioxidant, free radical DPPH tests were performed and β -carotene system / linoleic acid. In the evaluation of the antimicrobial activity, the extracts were tested on the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Propolis of the county Alto do Rodrigues had the highest means of production compared to the apiary in Mossoró. The extracts showed significant results in all tests, with makeup and diverse biological activity. Seven of the nine samples analyzed possessed levels of waxes according to the required by law. There was a significant correlation between the levels of waxes and total phenolic content ($R^2 > 0.5$). Samples of propolis Afonso Bezerra and Mossoro had higher levels of flavonoids commonly found in the Brazilian propolis samples. The High extracts of Rodrigues, Afonso Bezerra and Mossoro were more promising in physical chemistry evaluation and antioxidant and antimicrobial activity. The antioxidant activity of the sample Alto do Rodrigues (52%) along with the sample Areia Branca (75%) had the highest percentage by methods DPPH system and β -carotene / Linoleic acid, respectively. The antimicrobial activity tests to *S. aureus* and *E. coli*, samples of Alto do Rodrigues and Afonso Bezerra performed better in antimicrobial activity, for having formed halos of inhibition at all concentrations tested in both the strains. In general, the samples had diverse biological activity and physical-chemical profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa do estado do Rio Grande do Norte, destacando as cidades de coleta de própolis e suas respectivas Mesorregiões.....	26
Figura 2 – Fresta criada entre o ninho e a melgueira (espaçamento de 20 mm nas laterais) para a produção de própolis pelas abelhas <i>Apis mellifera</i>	33
Figura 3 – Localização do apiário experimental do município de Areia Branca/RN, entre os ambientes de vegetação de Caatinga (A) e de Mangue (B).	34
Figura 4 – Áreas dos municípios onde os apiários experimentais foram inseridos demonstrando sua vegetação local de floresta de Caatinga. Apiário de Mossoró (A), Alto do Rodrigues (B), Afonso Bezerra (C) e Cerro Corá (D)	34
Figura 5 – Amostras de própolis dos cinco municípios trituradas em almofariz com nitrogênio líquido: Mossoró (A); Alto do Rodrigues (B); Afonso Bezerra (C); Areia Branca (D) e Cerro Corá (E)	44
Figura 6 – Deposição de própolis verde por abelha <i>Apis mellifera</i> na abertura lateral entre ninho e melgueira, no município de Afonso Bezerra, RN.....	47
Figura 7 – Amostras de própolis verde de Alto do Rodrigues/RN (A e B) e Minas Gerais* (C e D). Avaliação comparativa de cor, textura e aroma das duas amostras.	48
Figura 8 – Médias mensais da produção de própolis coletadas nos apiários de Mossoró e Alto do Rodrigues	49
Figura 9 – Duas diferentes colmeias (A e B) do apiário de Mossoró no mês de setembro, com abelhas adultas fechando as aberturas com um cluster	52
Figura 10 – Curva padrão de ácido <i>p</i> -cumárico obtida para determinação dos teores de fenóis totais de amostras de própolis do Rio Grande do Norte	54
Figura 11 – Curva padrão obtida a partir da quercetina para determinação dos teores de flavonóides totais das amostras de própolis do Rio Grande do Norte	57
Figura 12 – Relações entre o conteúdo de ceras nas amostras de própolis e os teores de fenóis (A) e flavonóides totais (B) dos extratos etanólicos, obtidas pela análise de regressão linear..	61
Figura 13 – Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina, pelo método de sequestro de radicais livres DPPH.	63
Figura 14 – Atividade antioxidante, pelo método do DPPH, dos extratos etanólicos brutos de amostras de própolis do RN, em comparação com a quercetina	64

Figura 15 – Atividade antioxidante da quercetina em diferentes concentrações, no sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	66
Figura 16 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de amostras de própolis do RN pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização organoléptica das amostras de própolis do Rio Grande do Norte por município em seus respectivos períodos e datas de coletas	45
Tabela 2 – Produção de própolis por colônias de abelhas africanizadas em Mossoró e Alto do Rodrigues no período de Julho de 2013 a Janeiro de 2014	49
Tabela 3 – Solúveis em etanol (sem conteúdo de ceras) das amostras de própolis do RN.	53
Tabela 4 – Teores de fenóis totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN	54
Tabela 5 – Teores de flavonóides totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN	57
Tabela 6 – Teores de ceras totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN	59
Tabela 7 – Porcentagem de atividade Antioxidante dos extratos etanólicos de própolis do RN pelo método de sequestro de radicais livres DPPH em diferentes concentrações.	64
Tabela 8 – Atividade Antioxidante dos extratos de própolis do RN pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico	67
Tabela 9 – Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes antimicrobianos de uso farmacêuticos	70
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente à <i>S. aureus</i> em três concentrações distintas	71
Tabela 11 – Dados transformados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de própolis do RN frente à <i>S. aureus</i> em três concentrações distintas	71
Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente à <i>E. coli</i> em três concentrações distintas.....	73
Tabela 13 – Dados transformados da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente à <i>E. coli</i> em três concentrações distintas	73
Tabela 14 (Apêndice A) – Plantas da Caatinga brasileira visitadas por abelhas	90

LISTA DE SIGLAS

(pc)	Amostras de própolis coletadas em período pós-chuvoso
(sc)	Amostras de própolis coletadas em período de seca prolongada
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butilidroxitolueno
CETAPIS	Centro Tecnológico de Apicultura e Meliponicultura do Rio Grande do Norte
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrasila
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MG	Minas Gerais
NE	Nordeste
RN	Rio Grande do Norte
RTFIQP	Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi Árido
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 GERAL	21
2.2 ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 DEFINIÇÃO E USO DA PRÓPOLIS	22
3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DA PRÓPOLIS E A REGULAMENTAÇÃO TÉCNICA DO BRASIL	23
3.3 PRODUÇÃO DA PRÓPOLIS NO BRASIL	24
3.4 REGIÃO DE ESTUDO: CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS, HIDRO E FITOGEOGRÁFICAS	26
3.5 ESTUDOS COM PRÓPOLIS: ATIVIDADE BIOLÓGICA	27
3.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	28
3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	29
3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 LOCAIS DE COLETAS E DE ANÁLISES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DO RN	32
4.2 AMOSTRAS DE PRÓPOLIS E FORMAÇÃO DOS CONJUNTOS PARA ANÁLISE	32
4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	35
4.4 ANÁLISE ORGANOLÉPTICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	35
4.5 PRODUÇÃO MENSAL DE PRÓPOLIS POR COLMEIA NOS MUNICÍPIOS DE MOSSORÓ E ALTO DO RODRIGUES	36
4.6 SOLÚVEIS EM ETANOL SEM CONTEÚDO DE CERAS	36
4.7 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS PARA ANÁLISES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS	36
4.8 TEORES TOTAIS DE FENÓIS E FLAVONÓIDES	37

4.8.1 Teor total de Fenóis	37
4.8.2 Teor total de Flavonóides (Flavonas e Flavonóis)	38
4.9 DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS DE CERA	38
4.10 TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	39
4.10.1 Atividade antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH	39
4.10.2 Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico	40
4.11 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS	41
4.11.1 Preparação das cepas	41
4.11.2 Extratos utilizados nos testes	41
4.11.3 Avaliação da atividade dos antibióticos in vitro	42
4.11.4 Atividade antibacteriana dos extratos de própolis in vitro	42
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ANÁLISE ORGANOLÉPTICA DAS AMOSTRAS	44
5.2 PRODUÇÃO MENSAL DE PRÓPOLIS POR COLMEIA NOS MUNICÍPIOS DE MOSSORÓ E ALTO DO RODRIGUES	48
5.3 SOLÚVEIS EM ETANOL SEM CONTEÚDO DE CERAS	52
5.4 TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS	54
5.4.1 Teores de fenóis totais	54
5.4.2 Teores de flavonóides totais	57
5.5 TEOR DE CERAS TOTAIS	59
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	62
5.6.1 Atividade antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH	63
5.6.2 Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico	66
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	70
5.7.1 Avaliação da atividade dos antibióticos in vitro	70
5.7.2 Atividade dos extratos de própolis frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	71
5.7.3 Atividade dos extratos de própolis frente à <i>Escherichia coli</i>	72
6 CONCLUSÕES	76
7 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Estudos com a própolis têm demonstrado o quanto esse material é promissor. Próspero em aspectos econômico, social e científico. Observando-se o panorama das pesquisas que tem utilizado esse material como base de estudo, quanto à verificação das substâncias que o compõe e do seu potencial biológico e farmacológico, pode-se perceber o quanto ele é uma matéria-prima natural que tem se destacado nos últimos anos (MARCCUCI, 1995; TRUSHEVA et al., 2006; SALATINO et al., 2011).

Com a própolis brasileira, no geral, essa conclusão não é diferente, embora com particularidades. O Brasil, por ser um país continental, abriga uma diversidade de vegetais e variações climáticas, o que tem favorecido uma exploração ampla quanto aos tipos de própolis produzidos por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.).

Nesse país, a principal própolis produzida por essas abelhas, que vem sendo estudada e comercializada atualmente é a própolis verde, cuja resina provém de ápices vegetativos do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) (SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al. 2010). No entanto, além dessa própolis, outros tipos já foram classificados no país de acordo com a diversidade da flora existente no local de coleta, podendo estes ser bastante variados em termos de composição química e atividades biológicas (PARK et al., 2000; TRUSHEVA et al., 2006).

Outro tipo que também se tornou bastante conhecido e estudado mais recentemente foi a própolis vermelha. Essa, por sua vez, é produzida a partir de exsudados resinosos liberados pela planta *Dalbergia ecastophyllum* e também tem demonstrado um amplo potencial biológico (DAUGSCH, et al. 2006; CABRAL et al., 2009).

Nesse contexto, equipes de pesquisadores têm buscado meios de entender mais profundamente o potencial que a própolis brasileira possui. Seja em pesquisas que buscam o aprimoramento de técnicas de coleta, extração, purificação e isolamento de compostos, pesquisas incluindo testes *in vitro* com extratos de própolis em células tumorais, em testes de atividade antioxidante e em micro-organismos patogênicos diversificados, ou mesmo na descoberta de outros tipos de própolis provenientes do território brasileiro, que também possam ter resultados promissores.

De forma geral, essas pesquisas se complementam e fornecem subsídios para o desenvolvimento de outras subseqüentes. Por exemplo, os trabalhos iniciais que demonstraram a composição química da própolis verde no Brasil impulsionaram, posteriormente, a descoberta de sua fonte botânica e de uma miríade de atividades biológicas que essa própolis possui (BANKOVA, 1995; MARCUCCI, 1995; BANSKOTA et al., 1998). Além de pesquisas que descrevem sua composição química, a partir de extratos obtidos em diferentes solventes (FERNANDES-SILVA et al., 2013).

Dentro do âmbito das pesquisas com esse material, a própolis verde (proveniente das regiões Sul e Sudeste) e a própolis vermelha (proveniente da região Nordeste) têm sido produzidas e comercializadas em larga escala, embora a própolis verde seja comercializada em maior quantidade. Ambas têm sido importantes dentro da renda do apicultor brasileiro, juntamente com o mel, principal produto apícola (SEBRAE, 2014).

Dentre os estados do Nordeste que tem se destacado com a produção de própolis vermelha, Alagoas tem liderado essa produção por ter sido pioneiro no investimento e padronização de sua própolis vermelha produzida em seus ambientes de manguezais (SEBRAE, 2014). Outros tipos de própolis de abelha do NE já foram estudados, embora ainda sejam poucos os registros quanto a atividades biológicas e composição química destas (Bahia: CABRAL et al., 2012; Piauí: SILVA et al., 2005; TORRES et al., 2008; Pernambuco: NUNES et al., 2009; Paraíba: SILVA et al., 2006; Rio Grande do Norte: ORSI et al., 2005).

No estado do Rio Grande do Norte, até o momento pouco foi estudado quanto aos possíveis tipos de própolis produzidos por abelhas *Apis mellifera*. (ORSI et al., 2005; DANTAS et al., 2009). Esses trabalhos relatam a atividade antimicrobiana da própolis potiguar e a sua utilização no desenvolvimento de um sistema microemulsionado de própolis para aplicação tópica, respectivamente.

Sendo assim, foi proposto neste trabalho de dissertação investigar algumas variações da própolis de *Apis mellifera*, produzida no RN, com o intuito de esclarecer um pouco mais quanto à qualidade, composição e atividade biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a quantidade de produção entre períodos distintos do ano e as características sensoriais, físico-químicas e biológicas da própolis produzida no estado do Rio Grande do Norte.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a quantidade, requisitos sensoriais (cor, consistência em temperatura ambiente), físico-químicos e atividade biológica (antimicrobiana e antioxidante) da própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* (africanizadas) em duas localidades do RN (Mossoró e Alto do Rodrigues) em dois períodos distintos do ano (imediatamente após as chuvas e durante a seca);
- b) Comparar os tipos de própolis produzidos em cinco municípios do RN (Areia Branca, Mossoró, Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra e Cerro Corá) pela cor e consistência em temperatura ambiente, e pelas características físico-químicas e biológicas (atividades antimicrobiana e antioxidante).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DEFINIÇÃO E USO DA PRÓPOLIS

A própolis é uma resina obtida através da mistura de substâncias coletadas pelas abelhas de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais, cascas e exsudados resinosos, acrescida de secreções produzidas por suas glândulas salivares (GHISALBERTI, 1979).

De origem grega, a palavra “própolis” possui ligação com sua funcionalidade dentro do ninho das abelhas. Esse termo é originário de duas palavras, *pro* e *polis*, onde *pro* significa “em defesa de” ou “em favor de” e *polis* significa “cidade”, ou seja, em defesa da cidade ou da colônia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). Isso porque as abelhas a utilizam para reparar a colmeia, fechar frestas, protegendo-as contra o vento, impedindo a entrada de microrganismos e ainda no embalsamamento de insetos invasores (GHISALBERTI, op. cit.).

Apesar de ser um produto bastante utilizado pela medicina popular há muitos anos (aproximadamente 300 a.C), o interesse no estudo da própolis é relativamente novo, onde a importância sobre suas propriedades farmacológicas passou a se tornar mais acentuada nas últimas seis décadas.

A partir de então, quando se passou a estudá-la detalhadamente, diversas propriedades terapêuticas dessa resina foram identificadas, como a atividade antimicrobiana, antifúngica, antiprotzoária, antiviral, citotóxica, anestésica, de regeneração de tecidos, antiúlcera, antioxidante, entre outras (MARCUCCI, 1995).

Essas propriedades têm sido apontadas em diferentes tipos de própolis, como sendo provenientes dos diferentes compostos que esses podem conter, principalmente aos ácidos fenólicos e flavonóides, compostos químicos que tem se destacado por lhes serem atribuídas grande parte das atividades biológicas constatadas (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000; FUNARI; FERRO, 2006).

A composição da própolis depende da vegetação da região onde é produzida, podendo variar também nas diferentes épocas do ano numa mesma região (PARK et al., 2002a; SALATINO et al., 2011).

3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE DA PRÓPOLIS E A REGULAMENTAÇÃO TÉCNICA DO BRASIL

Assim como a flora local, outros fatores podem interferir na qualidade e composição química da própolis, como forma de coleta e a genética da abelha que a produz. Consequentemente, em função desses fatores, suas propriedades biológicas e terapêuticas também variam em potencial (MARCUCCI, 1996; MARTINEZ; SOARES, 2012).

A quantidade de cera presente nos tipos de própolis também pode variar de acordo com a região, época do ano e genética da abelha. A identificação desse teor está diretamente ligada à quantificação dos níveis de substâncias químicas ativas presentes na própolis, já que estes são atribuídos à fração de resina existente na amostra. Sendo assim, a análise do teor de cera (fração isenta de componentes fenólicos) é importante, pois é desejável um menor teor desta e maior teor de resina na amostra de própolis produzida (FUNARI; FERRO, 2006).

Na produção da própolis, além de um maior teor de resina quando comparado aos teores de cera é necessário também verificar alguns parâmetros determinados pelo Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Própolis. Nele existe algumas normas importantes que se deve analisar em uma amostra de própolis, entre as quais se encontram a análise dos níveis de compostos fenólicos e flavonóides, a atividade antioxidante e o controle de microrganismos presentes na amostra (BRASIL, 2001). Esses teores são importantes, pois servem para classificar uma dada amostra como apta ou não para a comercialização no mercado nacional e internacional.

Antes da publicação da Regulamentação Técnica vigente no Brasil, Park et al. (2000), em um estudo sobre caracterização da própolis do Brasil, classificou esse material resinoso em doze tipos e suas respectivas regiões (Sul, Sudeste e Nordeste).

Os autores encontraram mais algumas variações de amostras no país, coletadas em áreas de vegetações específicas e que, por não apresentarem atividade biológica (antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória), não foram incluídas na pesquisa. Esse detalhe nos resultados do trabalho dessa equipe pode ser considerado interessante, pois diante desse relato, pode-se inferir que alguns tipos de própolis de regiões específicas de um país continental como o Brasil, podem apresentar características químicas bem distintas e por essa razão variar em suas atividades biológicas.

A partir dos parâmetros existentes no Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Própolis, outros trabalhos, inclusive de outros países que ainda não possuem legislação própria quanto a avaliação da qualidade da própolis, foram publicados recentemente (DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO, 2012).

Na regulamentação houve a preocupação em incluir parâmetros básicos de qualidade, para que se possa ter uma segurança e padronização desse produto quanto a sua comercialização, embora ainda haja algumas exceções quando se trata de amostras de própolis brasileiras que devam ser levadas em consideração. Por exemplo, em relação à quantidade mínima de teor total de flavonóides, que considera o mínimo de 0,5%, sendo que em alguns casos as amostras brasileiras não atingem esse padrão, porém possuem valores totais altos quanto aos níveis de fenóis totais (acima do mínimo de 5% exigidos pela legislação) (SOUSA et al., 2007; FERNANDES-SILVA, 2008; TEIXEIRA et al., 2010).

Dentre os parâmetros vigentes no regulamento, alguns como teores totais de cera, fenóis e flavonóides e atividade biológica têm servido de base para as pesquisas recentes, onde o principal objetivo é avaliar a composição química e bioatividade da própolis (BRASIL, 2001).

Os demais parâmetros como umidade, solúveis em etanol, perda por dessecação e presença de contaminantes podem variar bastante entre regiões e até mesmo de apiário para apiário, dependendo de cuidados no manejo e das épocas do ano (SOUSA et al., 2007; DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO, 2012). Esses quesitos são igualmente importantes de serem avaliados antes da comercialização, embora não sejam tão imprescindíveis quanto aqueles, no caso de estudos preliminares que investigam a qualidade da própolis (BASTOS et al., 2011;

3.3 PRODUÇÃO DA PRÓPOLIS NO BRASIL E NO RN

Quanto à produção da própolis no Brasil, esta tem se destacado nos últimos anos e é estimada em torno de 150 toneladas anuais, sendo grande parte destinada para exportação, seja na forma bruta ou em produtos manufaturados, onde o Japão é o principal importador da própolis brasileira, absorvendo cerca de 80% da sua produção (LOPES, 2009). Nos últimos anos a China também tem participado de maneira significativa como um país importador da própolis brasileira, principalmente da própolis verde (LIMA, 2008; CHOUCAIR; VIEIRA, 2013).

Apesar da região Sudeste do país liderar a produção dessa resina, na região Nordeste, iniciativas quanto sua produção vem sendo realizadas em número crescente nos estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia, tendo se tornado uma boa fonte de renda na produção apícola (LOPES, 2009).

No entanto, apesar da própolis como meio comercial já ter sido introduzida na região Nordeste, e o estudo da composição química e atividade biológica dos tipos provenientes dessa região (principalmente referente a própolis do tipo vermelha) já ter sido iniciado, ainda não existem dados na literatura quanto ao potencial de produção e das possíveis variações qualitativa e quantitativamente dos variados tipos de própolis obtidos. Essas informações são necessárias para que se possa ter dados quanto aos reais tipos de própolis existentes no NE, uma área que possui variações na composição da sua vegetação que incluem as matas de caatinga, restinga, atlântica e manguezal.

Na região NE, além da própolis vermelha, outros tipos de própolis já foram identificadas em estados como Bahia, Pernambuco e Ceará porém ainda não se chegou num consenso de classificação (ANDRADE et al., 2012; CABRAL et al., 2012; PARK et al., 2000).

No estado do RN, por exemplo, nenhuma iniciativa de estudo tanto em relação a quantificação da produção, quanto a qualidade de amostras da própolis local foi realizada até o presente momento.

Nesse sentido, se torna importante avaliar o potencial de produção, a qualidade e atividades biológicas da própolis produzida no estado. Assim, essa iniciativa poderá auxiliar a sua inclusão como mais uma alternativa de renda para os apicultores, que será acrescida a comercialização de mel produzido pelas abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Essa subespécie de abelha tem sido de fundamental importância para a apicultura por ser adaptada às condições climáticas da região, possuindo potencial produtivo superior ao das europeias e uma ótima adaptação ao clima local, tendo proporcionado um grande avanço nos níveis de produção nacional nos últimos anos (GONÇALVES, 2006).

Diante da relevância das atividades terapêuticas da própolis e da necessidade de informações referentes a esse produto no estado Rio Grande do Norte, esta pesquisa busca verificar a viabilidade de produção da própolis no estado, contribuindo para um maior esclarecimento a respeito da sua produção local e propriedades terapêuticas. Este trabalho também poderá contribuir com conhecimentos que poderão estimular novos estudos sobre a composição química e atividades biológicas da própolis do RN.

Algumas características da apicultura no RN e da região onde os apiários experimentais deste estudo foram montados são descritas nos tópicos a seguir.

3.4 REGIÃO DE ESTUDO: CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS, HIDRO E FITOGEOGRÁFICAS

Neste trabalho, os municípios de coleta das amostras se localizam em duas mesorregiões do estado do RN, Oeste Potiguar (Areia Branca, Mossoró e Alto do Rodrigues) e Central Potiguar (Afonso Bezerra e Cerro Corá) (Fig. 1). Dentro destas, o clima é do tipo Tropical Semiárido.



Figura 1 – Mapa do estado do Rio Grande do Norte, destacando as cidades de coleta de própolis e suas respectivas Mesorregiões. (Fonte: www.baixarmapas.com.br, 2015).

A unidade de vegetação Caatinga, predominante no estado do Rio Grande do Norte, assim como todas as províncias geográficas pertencentes a essa classificação (que coincide aproximadamente com o chamado Polígono das Secas), possui características peculiares, como solos pedregosos e rasos, possuindo em sua hidrografia rios com cursos de água intermitentes sazonais, que nos anos mais secos tornam-se efêmeros (PRADO, 2003).

Quanto a sua vegetação, a Caatinga é caracterizada por possuir florestas arbóreas ou arbustivas com características de xerofilia e de microfilia (PRADO op cit.). Na Tabela 14 (Apêndice A) são encontradas algumas espécies desta região que são frequentemente visitadas por abelhas (MAIA-SILVA et al., 2012).

3.5 ESTUDOS COM A PRÓPOLIS: ATIVIDADE BIOLÓGICA

A própolis tem sido estudada atualmente nas mais variadas áreas da pesquisa biomédica. No campo dos estudos que testam seus extratos (etanólico/metanólico/hidroalcoólico) sob o efeito de microrganismos tem-se uma vasta gama de trabalhos que já comprovaram a sua atividade biológica.

Esta atividade é bem ampla onde inclui sua ação antibacteriana (*Paenibacillus larvae*: BASTOS et al., 2008; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans*: ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2012), antifúngica (*Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis*: SALOMÃO et al., 2008; *Candida albicans*: DOTA et al., 2011; *Penicillium italicum*: PENG et al., 2012), antiprotzoária (*Trypanosoma cruzi*: SALOMÃO et al., 2008; *Trypanosoma evansi*: GRESSLER et al., 2012; *Leishmania spp.*: AYRES et al., 2007; ODA et al., 2011) e antiviral (vírus HSV-1 e VSV: AMOROS et al., 1992; H5N1: KUJUMGIEV et al., 1999; HSV-1: TEIXEIRA, et al., 2007; HIV-1: GEKKER et al., 2005; HSV-1: SHIMIZU et al., 2011; FCV, CAV-2 e BVDV: CUETO et al., 2011).

Outra característica interessante que se tem observado nestes trabalhos é que mais de uma técnica de ensaios tem sido verificadas nos trabalhos (in vitro e/ou in vivo), o que leva a uma validação mais confiável da sua atividade contra microrganismos patogênicos.

Alguns desses estudos têm sido realizados a partir de extratos obtidos de própolis de diferentes localidades e com a verificação da sazonalidade de extratos desta resina (CASTRO et al., 2007; CHEN et al., 2008; NUNES et al., 2009; NUNES; GUERREIRO, 2012; TEMÍZ et al., 2011).

Na área das pesquisas com testes dos extratos da própolis em células tumorais/cancerígenas, já foram publicados estudos que verificam a sua capacidade citotóxica nestas células (ITO et al., 2001; CHEN et al., 2004; BÚFALO; CANDEIAS; SFORCIN et al., 2009; AWALE et al., 2008; BARBARIC et al., 2011; CABRAL et al., 2012; FROZZA et al., 2013; MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA et al., 2013) e ainda sua

atividade antiúlcera (BARROS et al., 2007). Outros trabalhos têm verificado a sua atividade antioxidante (TEIXEIRA et al., 2010; CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; MAVRI et al., 2012) e esses resultados tem sido promissores por mostrarem que diferentes tipos de própolis do Brasil e de outros países mostram um potencial antioxidante relevante.

Ainda há estudos um pouco menos abrangentes em áreas diversas como, por exemplo, no uso de extratos em vacinas (ASHRYA; AHMAD, 2012), na verificação da sua ação hepatoprotetora (BANSKOTA; TEZUKA; ADNYANA, 2001), cardioprotetora (DALEPRANE; ABDALLA, 2013), na atividade imunossupressora (YONAR; YONAR; SILICI, 2011), no efeito anticâncer (MOUSE et al., 2012) e na cicatrização de dermatofitose (ÇAM et al., 2013).

Diante disto, esse produto vem sendo valorizado em detrimento dos resultados das pesquisas realizadas que testam a atividade dos compostos presentes em seus extratos. Esse campo de pesquisa dentro da área biomédica tem se tornado bastante amplo, devido aos diferentes tipos de própolis produzidos pelas abelhas e pela ampla variedade de pesquisas que estão em busca da identificação de seus compostos químicos e atividades biológicas associadas.

3.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Atualmente, mais de 300 compostos químicos já foram identificados na própolis (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000). Sendo assim, esta resina é atualmente uma das fontes mais abundantes de polifenóis, onde os mais abrangentes são os flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres derivados, apontados como sendo as substâncias responsáveis pelas suas atividades biológicas (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000; BANKOVA, 2005; SALATINO et al. 2011).

Estudos em diferentes tipos de própolis que foram desenvolvidos com o objetivo de desvendar sua origem botânica deram grandes contribuições na identificação desses componentes químicos (PARK et al., 2002a; PARK et al., 2002b; PARK et al., 2004; ALENCAR et al., 2005; SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Park et al. (2000) classificaram as própolis brasileiras produzidas em diferentes estados em 12 tipos, de acordo com análise físico-química, características organolépticas, atividades antioxidante e antimicrobiana em *Streptococcus mutans* das

500 amostras que foram identificadas produzidas nas regiões sul, sudeste e nordeste do país.

Oito anos mais tarde, Dausch et al. (2008) verificaram em análise de própolis vermelha seus constituintes químicos e sua origem botânica (*Dalbergia ecastophyllum*) e a classificaram como própolis tipo 13. Em um estudo anterior verificaram também uma relação entre os níveis de constituintes químicos presentes em própolis produzidas em áreas de maior e menor quantidade de *D. ecastophyllum* com sua atividade antimicrobiana. Numa comparação entre os constituintes da própolis vermelha com a sua atividade antibacteriana em *S. aureus* constataram que, quanto maior a quantidade de constituintes químicos presentes nesta própolis (liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A) e também encontrados na planta de origem, maior os níveis de inibição bacteriana (DAUGSCH et al. 2006).

Em paralelo a estas pesquisas, estudos que associaram a constituição química da própolis com suas atividades biológicas em geral estão sendo realizados nos últimos anos.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Muitos estudos verificaram a atividade antibacteriana da própolis com o intuito de averiguar sua capacidade de inibição de diversas bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enterica*; *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (DUARTE et al., 2006; ALENCAR et al., 2007; BASTOS et al., 2011; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012; CABRAL et al., 2012), *Streptococcus sobrinus* (KIM et al., 2011), *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (SALOMÃO et al., 2008), *Paenibacillus larvae* (BASTOS et al., 2008;), *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA; RODRIGUES; FEÁS, 2012), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio damsela* (CHEN et al., 2008), *Listeria monocytogenes* (TEMIZ et al., 2011).

Já foi verificado também que a própolis possui uma maior atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Diplococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *B. cereus*.) quando comparada a sua atividade contra bactérias gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella*

paratyphi, *Shigella flexneri*, *Branhamella catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) (GRANGE; DAVEY, 1990; DOBROWOLSKI et al., 1991).

Estudos comparativos entre própolis produzidas em diferentes regiões e sua atividade antibacteriana e estudos com bactérias de mesmo gênero e até de mesma espécie (cepas diferentes) testadas com um mesmo tipo de extrato de própolis, verificaram que ocorre uma variação bastante frequente desta atividade, tanto em virtude da variação do clima e da vegetação do local de coleta, quanto da resistência das diferentes cepas utilizadas (ALENCAR et al., 2007; BASTOS et al., 2011; DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO, 2012; NAVARRO-NAVARRO et al., 2013).

No seu estudo referente à qualidade da própolis produzida em Portugal, na verificação da eficiência desta contra bactérias em própolis de regiões com climas diferentes (Terras quentes: municípios de Mirandela e Mogadouro; e Terras frias: municípios de Nogueira e Vinhais), Dias, Pereira e Estevinho (2012) verificaram variações nos resultados da CIM (Concentração Mínima Inibitória) na ação contra *Staphylococcus aureus*, tanto entre regiões de climas diferentes como de vegetações distintas.

Os autores perceberam que a própolis das regiões de terras frias apesar de obterem melhores resultados na atividade inibitória contra *S. aureus*, também variaram entre as localidades dessa região, onde os extratos obtidos da região de Nogueira apresentaram uma ação mais efetiva quando comparado aos da região de Vinhais. Esses resultados foram atribuídos a diferenças na vegetação das duas cidades.

No trabalho de Navarro-Navarro et al. (2013) foi comparado o efeito de extratos de própolis mexicana em várias espécies de *Vibrio spp.* e foi constatado a ocorrência de resistência variada nas cepas nos diferentes tratamentos. Neste estudo foi possível perceber variações nas respostas antibacterianas entre os tipos de extratos e na resposta destes às diferentes cepas de *Vibrio spp.*, seja entre diferentes espécies (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cólera*) ou entre estirpes da mesma espécie extraídas de meios distintos (*V. cólera O1 sorotipo Inaba*, *V. cólera O1 sorotipo Ogawa* e *V. cólera não-O1*).

Estes estudos são úteis para que se possa entender não somente quais bactérias um determinado tipo de própolis poderá inibir, como também a variabilidade que ocorre desta inibição em bactérias de mesmo gênero e espécie.

3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O efeito antioxidante da própolis já foi testado em vários trabalhos e tem por objetivo a verificação desta atividade a partir de seus compostos ativos como substituintes de agentes antioxidantes comumente utilizados nas indústrias de alimentos, como o BHT (TEIXEIRA et al., 2010).

Estudos nas últimas décadas têm verificado a atividade antioxidante dos extratos de própolis, seja na sua forma isolada (SHIMIZU et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2010), ou, como ocorre na grande maioria destes, descrita juntamente com sua composição química e ação antimicrobiana, fazendo assim um comparativo entre estas duas atividades dos extratos com componentes químicos associados (HEGAZI; EL HADYB, 2002; KALOGEROPOULOS et al., 2009; CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; MAVRI et al., 2012).

No Brasil, Teixeira et al. (2010) observaram a atividade antioxidante em extratos metanólicos de própolis de três regiões do estado de Minas Gerais. Perceberam que amostras com maior teor de compostos fenólicos possuíam maior atividade antioxidante, quando comparada a amostras com menores valores, embora não tenha sido observada uma correlação entre essa atividade e percentual de compostos fenólicos totais das amostras.

Em outro estudo com extrato de própolis da Turquia, Gülçin et al., (2010), analisaram a ação antioxidante deste comparando sua efetividade em seis métodos diferentes utilizando os radicais livres: DPPH, ABTS⁺, DMPD⁺, O₂⁻, H₂O₂ e Fe²⁺. Em todos os testes foi comprovada a efetividade da própolis na ação antioxidante com variações entre os métodos, porém o método de sequestro do radical DPPH obteve melhores resultados quando comparado aos demais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE COLETAS E DE ANÁLISES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DO RN

As coletas das amostras de própolis foram realizadas em apiários localizados em cinco municípios do estado do Rio Grande do Norte: Mossoró (Assentamento Jurema), Alto do Rodrigues (Comunidade Canafístula), Afonso Bezerra, Areia Branca e Cerro Corá (Fig. 3 e 4). As cinco localidades foram escolhidas por apresentarem pelo menos um tipo característico de própolis produzida ao longo do ano, conforme observações preliminares.

As análises químicas e avaliação da atividade antioxidante das própolis foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, localizado no Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (USP), e os testes de atividade antimicrobiana foram feitos no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

4.2 AMOSTRAS DE PRÓPOLIS E FORMAÇÃO DOS CONJUNTOS PARA ANÁLISE

Amostras de própolis do estado do RN, Região Nordeste do Brasil, coletadas nos cinco municípios foram recolhidas a partir de 9 colmeias racionais Langstroth de cada apiário, contendo abelhas *Apis mellifera*, nos meses de junho de 2013 a janeiro de 2014 (Fig. 1).

O método de estímulo para produção da própolis em todas as localidades se deu por meio da introdução de uma barra de madeira com dimensões de 370 x 20 x 20 mm na parte frontal e outra na traseira, entre o ninho e a melgueira, criando um espaço de aproximadamente 465 x 20 mm nas duas laterais (Fig. 2).

As amostras de Mossoró (Assentamento Jurema) e Alto do Rodrigues (Comunidade de Canafístula) foram coletadas em seus respectivos apiários (9 colmeias iniciais cada) quinzenalmente e destas foram feitos dois conjuntos, um de cada apiário. Estes conjuntos foram caracterizados por amostras coletadas em dois períodos distintos: um no período imediatamente após o término das chuvas regulares da região,

caracterizado por chuvas esporádicas, entre os meses de julho a setembro de 2013 (período pós-chuvoso) e um para o período de estiagem total na região, que aconteceu entre os meses de outubro de 2013 a janeiro de 2014 (período seco). Ao todo foram totalizados quatro conjuntos de própolis, dois de cada região para esses dois municípios.



Figura 2 – Fresta criada entre o ninho e a melgueira (espaçamento de 465x20 mm nas laterais) para estimular e orientar a produção de própolis pelas abelhas *Apis mellifera*.

Ainda no município de Mossoró, durante o período de coleta, duas amostras de própolis com características distintas das demais surgiram em duas coletas (26/07/13 e 07/02/14). Estas foram separadas para obter extratos individuais, além daqueles em que foram feitos a partir dos dois conjuntos por período. Totalizando 4 extratos obtidos desse apiário.

As amostras coletadas nos municípios de Cerro Corá e Afonso Bezerra foram obtidas a partir de uma única coleta em apiários das associações locais de apicultores, cada um contendo 9 colmeias (coletas realizadas dias 09/01/14 e 08/02/14, respectivamente).

A amostra do município de Areia Branca foi obtida a partir de uma única coleta, realizada em três colmeias, cedidas pelo CETAPIS aos apicultores da associação local.

Os apiários localizados nos municípios de Mossoró, Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra e Cerro Corá foram inseridos em áreas de floresta de Caatinga antropizada, enquanto as colmeias do apiário experimental do município de Areia Branca foram inseridas em uma área de transição entre floresta de Caatinga e Manguezal (Fig. 3 e 4).

Os apiários dos municípios de Alto Rodrigues e Afonso Bezerra possuíam alguma vegetação introduzida de algaroba (*Prosopis juliflora*) (Fig. 4 B e C, respectivamente).



Figura 3 – Localização do apiário experimental do município de Areia Branca/RN, entre os ambientes de vegetação de Caatinga (A) e de Mangue (B).



Figura 4 – Áreas dos municípios onde os apiários experimentais foram inseridos demonstrando sua vegetação local de floresta de Caatinga. Apiário de Mossoró (A), Alto do Rodrigues (B), Afonso Bezerra (C) e Cerro Corá (D).

Durante todo o período experimental não foi fornecido nenhum tipo de alimentação artificial para as colônias, já que o intuito desta pesquisa foi verificar a produção de própolis ocorrida naturalmente em ambientes distintos.

4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

As coletas das própolis foram feitas cortando e removendo somente a própolis depositada pelas abelhas na abertura de 20 mm nas duas laterais entre o ninho e a melgueira, não sendo removida a própolis adicionada em outras partes das colmeias. Para cada colmeia foi utilizada uma faca individual para realizar o corte e coleta da própolis, para evitar possíveis misturas, caso aparecesse tipos diferentes de própolis em colmeias distintas ao longo das coletas.

As amostras de própolis foram colocadas em sacos plásticos atóxicos novos e armazenadas, individualmente, em freezer até serem analisadas no Laboratório de Apicultura (UFERSA), quanto às características sensoriais (cor, odor e consistência) e também pesadas após remoção de partes estranhas incluídas durante a coleta, como pedaços de madeira, parte de abelhas, etc. A seguir cada saco plástico foi fechado e armazenado em freezer até o momento das análises físico-químicas e atividades antioxidante e antimicrobiana.

4.4 ANÁLISE ORGANOLÉPTICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

As amostras coletadas foram separadas para a preparação dos extratos de acordo com as características organolépticas visuais e táteis (cor e textura).

Ao longo do período de coleta, nos apiários experimentais, as amostras que possuíam características diferentes daquelas que estavam sendo coletadas frequentemente com uma mesma característica eram separadas. Isso ocorreu para obtenção de um conjunto homogêneo das amostras por apiário.

Assim, em todos os apiários foram feitos conjuntos homogêneos das amostras coletadas em suas respectivas colônias. No caso dos apiários de Mossoró e Alto do Rodrigues esses conjuntos homogêneos também foram separados por períodos (pós-chuvoso e seco). Esses conjuntos foram caracterizados por cor e textura antes da utilização das amostras para as extrações.

4.5 PRODUÇÃO MENSAL DE PRÓPOLIS POR COLMEIA NOS MUNICÍPIOS DE MOSSORÓ E ALTO DO RODRIGUES

Para avaliar a quantidade média em gramas de própolis produzida nos dois apiários experimentais, Mossoró e Alto do Rodrigues, foram feitas as pesagens de cada

amostra de própolis colhida por colmeia em cada apiário e dividido pelo número de colmeias dentro do período de trinta dias.

4.6 SOLÚVEIS EM ETANOL SEM CONTEÚDO DE CERAS

Para esse procedimento, foram utilizados os extratos etanólicos filtrados e liofilizados das amostras (procedimento em detalhes descrito no item 4.8).

Os tubos Falcon nos quais esses extratos foram liofilizados foram pesados até obtenção de peso constante. Os valores finais destes foram subtraídos pelos valores iniciais dos tubos antes da inserção dos extratos.

A obtenção dos sólidos solúveis em etanol de cada amostra foi feita através de regra de três simples com o valor inicial da própolis bruta pesada antes da extração em etanol (considerando 10g igual a 100% da amostra) e o valor final da massa do resíduo do extrato já liofilizado.

4.7 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS PARA ANÁLISES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Extratos etanólicos foram produzidos para a quantificação dos teores totais de fenóis e flavonóides e atividade antimicrobiana das amostras.

Para extração em etanol, alíquotas de 10 g da própolis pulverizada de cada amostra e dos conjuntos das amostras de Mossoró e Alto do Rodrigues foram adicionadas com aproximadamente 150 mL de álcool etílico absoluto (PA), por 6 horas em extrator Soxhlet. Após esse período, as amostras foram passadas em papel de filtro Whatman nº 1 e armazenadas em frascos âmbar em freezer. Esse procedimento de filtragem foi repetido no dia seguinte após a precipitação da cera restante das amostras. Esses extratos foram concentrados em rotaevaporador e liofilizados.

Em seguida os resíduos sólidos extraídos de cada amostra foram pesados e diluídos em etanol PA a 10 mg/mL.

Para a verificação da atividade antimicrobiana as amostras foram diluídas em 10, 7,5, 5 e 2,5 mg/mL.

4.8 TEORES TOTAIS DE FENÓIS E FLAVONÓIDES

As análises de teores totais de fenóis e flavonóides foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Woisky e Salatino (1998). Os dados obtidos para teor total de cera, fenóis e flavonóides serão analisados de acordo com o aconselhado pela Instrução Normativa sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis (BRASIL, 2001).

4.8.1 Teor total de Fenóis

No procedimento de determinação da concentração de fenóis totais das amostras foi feita inicialmente uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido p-cumárico (100 µg/mL).

Os volume da solução padrão (0, 10, 20, 30... 100 µL) foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada, e em seguida foram adicionados 160 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 240 µL de solução saturada de carbonato de sódio, nessa ordem. O volume final foi completado com água destilada para 2 mL. A leitura em espectrofotômetro UV-visível a 760 nm foi realizada após 2 horas.

Para os ensaios realizados com as amostras, 4 µL de cada extrato etanólico bruto a 10 mg/mL foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada. Após isso, foram realizados os mesmos passos seguidos na construção da curva padrão de ácido p-cumárico (WOISKY; SALATINO, 1998). Os testes para cada amostra foram realizados em triplicata.

4.8.2 Teor total de Flavonóides (Flavonas e Flavonóis)

Inicialmente foi preparada uma curva de calibração de quercetina, a partir de uma solução padrão de 20 µg/mL. Alíquotas desta solução padrão foram transferidas para tubos (0, 200, 400, 600, ..., 1600 µL), adicionados a 400 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, e o volume completado com metanol para 2 mL. Após 30 minutos a absorbância do conteúdo de cada tubo foi lida em espectrofotômetro UV-visível a 420 nm.

Para a determinação do teor de flavonóides totais (flavonas e flavonóis), foi utilizada uma alíquota de 10 μ L dos extratos etanólicos brutos a 10 mg/mL de cada amostra de própolis, onde o procedimento de leitura foi realizado do mesmo modo do tempo determinado para a realização da curva padrão de quercetina. Os testes para cada amostra foram realizados em triplicata.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS DE CERA

Para a quantificação de cera presente na própolis, o método de análise foi realizado conforme descrito por Woisky e Salatino (1998) com as modificações necessárias.

Porções de 10g de cada amostra previamente pulverizadas foram submetidas a extração exaustiva com diclorometano em extrator Soxhlet, durante 5 horas. Para as amostras de Mossoró e Alto do Rodrigues foram utilizados conjuntos de 10g de cada um dos dois períodos (pós-chuvoso e seco). Logo após, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em rotaevaporador.

A mistura de cada amostra individualmente foi mantida em ebulição em um béquer de 150 mL até que todo o solvente fosse evaporado e, em seguida 120 mL de etanol quente foi adicionado ao resíduo. A mistura foi mantida ainda em ebulição até que toda a cera da amostra fosse completamente solubilizada no etanol a quente. Em seguida, a mistura foi resfriada a 0°C, e o conteúdo foi filtrado em um erlenmeyer de 180 mL através de papel de filtro Whatman nº 1, previamente pesado.

Em algumas amostras essa mistura foi separada, durante a ebulição, em duas fases: uma solução clara na porção superior e outra com pequena quantidade de resíduo oleoso na porção inferior. Nesses casos, após o resfriamento a 0°C, no momento da filtragem dessas amostras, a fase superior foi filtrada através de papel de filtro Whatman nº 1, previamente pesado e a passagem da fase inferior (resíduo oleoso) no fundo do béquer para o papel de filtro foi evitada. O béquer e o resíduo foram lavados com aproximadamente 25 mL de etanol frio. Após secagem em capela, o béquer utilizado e o resíduo no papel de filtro foram transferidos a um dessecador até que atingissem peso constante (WOISKY; SALATINO, 1998).

Esse procedimento não ocorreu com a amostra do município de Areia Branca devido à quantidade de própolis coletada ter sido insuficiente para os dois procedimentos: extração em etanol, para caracterização química e verificação da atividade biológica e extração em diclorometano, para avaliação do teor de ceras totais. Sendo assim, optou-se por utilizar a amostra coletada somente para o primeiro procedimento.

4.10 TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para os ensaios de atividades antioxidantes seguiu-se os métodos de sequestro de radicais livres DPPH (NIEVA-MORENO et al., 2000; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006) e o sistema β -caroteno/ácido linoleico (KOLEVA et al., 2002).

4.10.1 Atividade antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH

Os ensaios de sequestro de radicais livres seguiram o método descrito por Nieva-Moreno et al. (2000) e Duarte-Almeida et al. (2006), com algumas modificações. Partiu-se de 400 μ L de solução metanólica dos extratos (nas concentrações 15, 30, 45 e 60 μ g/mL).

Em seguida, foram adicionados 800 μ L de uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrasila (DPPH, Sigma) em concentração aproximada de 20 μ g/mL, com a sua concentração previamente ajustada para um valor entre 0,7 e 0,8 a 517 nm, medida a partir de seu branco (800 μ L da solução de DPPH + 400 μ L de metanol). Onde esse valor foi utilizado como controle. Como branco das amostras, foram utilizados 400 μ L de cada concentração, acrescidos de 800 μ L de metanol.

Como substância de referência, foi utilizada a quercetina em diversas concentrações (2,5, 5, 7,5, 10, 15 e 30 μ g/mL). Após a adição de 800 μ L da solução de DPPH em cada amostra, estas foram agitadas e mantidas no escuro por 30 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm.

A degradação do DPPH pelos extratos de própolis foi avaliada por comparação com o controle (DPPH + metanol). Os resultados estão expressos como porcentagem de

atividade antioxidante (%AAox), que verificam a degradação do DPPH comparados ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs Am} - \text{Abs B}) \times 100}{\text{Abs C}}$$

Abs C

Onde Abs C = absorbância do controle; Abs Am = absorbância da amostra; Abs B = absorbância do branco.

4.10.2 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno / ácido linoleico

Os ensaios de atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foram realizados de acordo com Koleva et al. (2002), com as modificações necessárias. Foi preparada uma solução reativa, onde, para cada amostra de própolis uma alíquota de 300 μ L de uma solução de β -caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL) foi misturada com 7,5 μ L de ácido linoleico e 60 μ L de Tween 40. Em seguida, o solvente foi evaporado por completo sob fluxo de nitrogênio. Para obtenção da absorbância da solução entre 0,7 e 0,8 a 470 nm, foram então adicionadas aproximadamente 20 mL de água destilada saturada de oxigênio.

Para a reação de oxidação, 120 μ L de solução metanólica das amostras foram adicionadas nas concentrações 40, 80 e 120 μ g/mL em tubos de reação Eppendorf (1,5mL), todas em triplicatas. Em seguida, foram acrescentadas 1 mL da solução reativa nos tubos contendo as amostras diluídas. Como branco das amostras foram utilizadas 120 μ L de cada concentração das amostras, adicionados a 1mL de água destilada, e como controle, foi utilizado 120 μ L de metanol adicionado a 1mL de água destilada. Como substância de referência foi utilizada a quercetina nas concentrações 10, 20, 40, 80 e 120 μ g/mL.

As absorbâncias das reações foram medidas em espectrofotômetro UV/visível a 470 nm em intervalos de 30 em 30 minutos, totalizando 2 horas de reação e 5 leituras, contando com a leitura inicial. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (% I), comparando-se a queda da absorbância nas amostras (onde Am = absorbância final – absorbância inicial) com a queda da absorbância no controle (Ac = absorbância final – absorbância inicial), conforme a equação abaixo:

$$\% I = \frac{(Ac - Am) \times 100}{Ac}$$

Ac

4.11 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados por meio do Método de Antibiograma de Difusão em Disco (NCCLS, 2003), com as modificações necessárias de acordo com o material biológico utilizado nos procedimentos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

4.11.1 Preparação das cepas

Foram utilizadas quatro cepas padrão, sendo elas, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Laborclin) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Laborclin). Estas foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion –BHI por 24h para obter turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland de acordo com CLSI (2011).

4.11.2 Extratos utilizados nos testes

Os extratos etanólicos das diferentes amostras de própolis utilizadas para os ensaios de atividade antimicrobiana in vitro foram preparados nas concentrações 10, 7,5, 5,0 e 2,5 mg/mL, a partir extrato seco liofilizado obtido de cada amostra (item 4.5). Para todas as diluições destes, foi utilizado o álcool etílico (PA 99,8%)

4.11.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos antibióticos in vitro

Para comparação com o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis das amostras foi realizado a técnica de difusão em discos, com algumas drogas antimicrobianas de uso farmacológico. Foram utilizadas as quatro cepas padrão reativadas e suspendidas.

A suspensão foi inoculada em placas de petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton com auxílio de swabs esterilizados, pelo método de Kirby-Bauer, com posterior inserção dos discos de antibióticos, sendo os utilizados no experimento: Amicacina

(30µg), Ampicilina (10µg), Cefalexina (30µg), Eritromicina (15µg), Norfloxacin (10µg), Oxacilina (1µg) e Penicilina G (10U).

As placas foram incubadas invertidas a 37°C em estufa por um período de 24h. Em seguida mediu-se, com auxílio de paquímetro, o diâmetro dos halos de inibição. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.11.4 Atividade antibacteriana dos extratos de própolis in vitro

Para a verificação da atividade biológica frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi seguido o método de difusão em ágar (Mueller Hinton) (GAVIN, 1957). As cepas utilizadas foram de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC), devidamente caracterizadas. São elas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Laborclin), e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Laborclin).

Após a ativação das cepas em caldo Mueller Hinton, foi preparada uma suspensão a $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias UFC/mL, correspondente à turbidez da escala de MacFarland 0,5. Foram realizadas 2 diluições seriadas (1:10) para obtenção da suspensão de trabalho a 1×10^6 UFC/mL. Cinco poços em cada placa foram perfurados com ponteiras de 200µL estéreis e invertidas, logo após a completa absorção do inóculo pelo ágar, obtendo-se poços de 7mm. Os fundos dos poços foram preenchidos com o meio e mantidos em repouso até secar completa. Com auxílio de cotonetes esterilizados, a suspensão foi inoculada nas placas de AMH, em três direções (Padronização..., 2003). Posteriormente as placas foram deixadas em repouso até a completa absorção do extrato pelo ágar e, em seguida foram inoculados 40µL dos extratos. Em seguida, as placas foram incubadas de forma invertida, a 37°C, por 24 horas.

A atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando detectado o desenvolvimento de halo de inibição ao redor do poço, contendo as amostras de extrato de própolis. O experimento foi realizado em triplicata. As quatro concentrações de cada extrato foram avaliadas frente às cepas, de acordo com a medição dos halos através de paquímetro. Como controle positivo, foram empregados discos dos antibióticos ampicilina (10µg) e norfloxsarcin (10µg), nas placas inoculadas com *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, escolhidos conforme teste antibiograma realizado anteriormente em

laboratório. Como controle negativo, foi adicionado o etanol, o mesmo utilizado nas diluições das amostras.

A interpretação dos resultados seguiu de acordo com os dados sugeridos pela CLSI (2011), onde os halos de inibição formados foram comparados com a tabela de referência, sendo os micro-organismos classificados como resistentes, intermediários e sensíveis. As amostras foram consideradas ativas quando evidenciados halos de inibição maiores ou iguais a 10 mm.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste ANOVA, seguida do teste Tukey a 5% de probabilidade, para comparar as médias dos teores de ceras com os teores de fenóis e flavonóides totais, bem como as respectivas atividades biológicas das amostras de própolis nos diferentes locais de coleta e entre os diferentes períodos de coleta para as amostras dos municípios de Mossoró e Alto do Rodrigues (ZAR, 1996).

Para atender a distribuição de normalidade, os resultados referentes à atividade antimicrobiana tiveram os valores transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação das médias. Para isso, utilizou-se o software ESTAT (UNESP, 1994). Nas Tabelas 10 e 12 encontram-se os resultados originais e não os transformados. Para fins estatísticos, consultar resultados transformados nas Tabelas 11 e 13 (p.73 e 75).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ORGANOLÉPTICA DAS AMOSTRAS

A verificação da cor das amostras de própolis foi realizada no momento da trituração das amostras em nitrogênio líquido. As própolis do município Alto do Rodrigues possuíam coloração verde escuro (Fig. 5, B) enquanto as amostras de Mossoró possuíam coloração marrom (Fig. 5, A). A amostra de Afonso Bezerra possuía coloração verde seiva (Fig. 5, C), enquanto que as amostras de Areia Branca e Cerro Corá, possuíam coloração laranja e marrom escuro, respectivamente (Fig. 5, D e E).

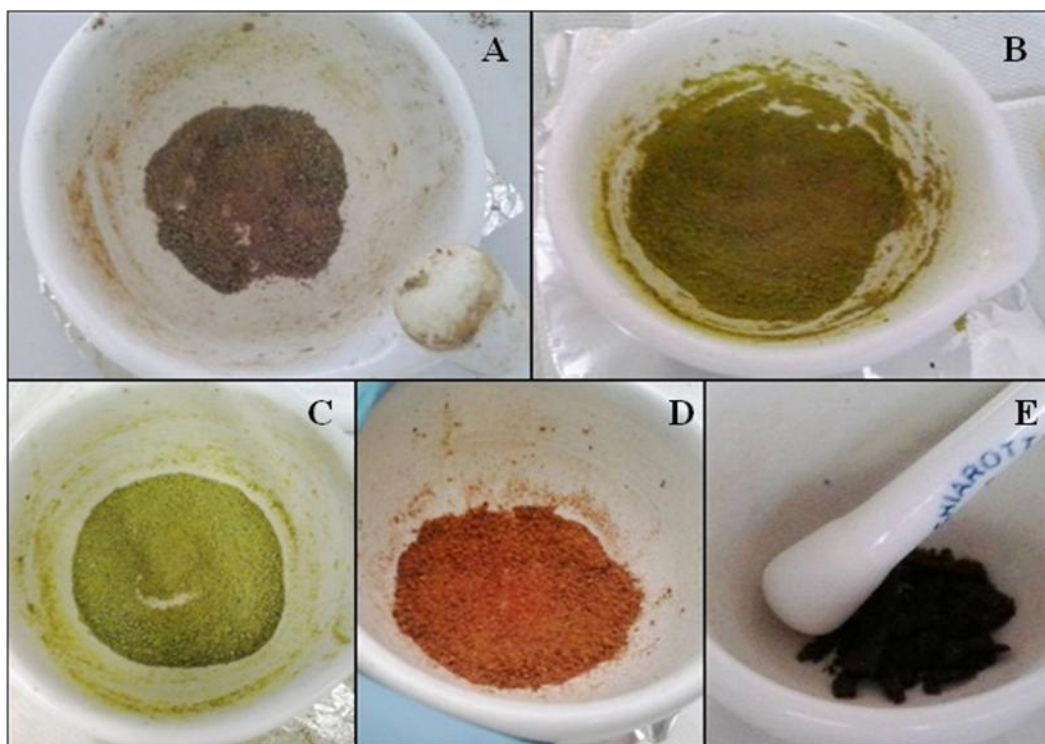


Figura 5 – Amostras de própolis dos cinco municípios trituradas em almofariz com nitrogênio líquido: Mossoró (A); Alto do Rodrigues (B); Afonso Bezerra (C); Areia Branca (D) e Cerro Corá (E).

A textura das amostras foi descrita de acordo com o que foi verificado no momento da coleta destas à temperatura ambiente, antes do seu congelamento, sendo todas elas classificadas como resinosa/maleável (Tab. 1).

Tabela 1 – Caracterização organoléptica das amostras de própolis do Rio Grande do Norte por município em seus respectivos períodos ou datas de coletas.

Amostras/ Municípios	Períodos/ Datas de Coletas	Cor	Textura*
Mossoró	**Pós-chuvoso	Marrom	Resinosa/Maleável
Mossoró	***Seco	Marrom	Resinosa/Maleável
Mossoró	26/07/2013	Verde escuro	Resinosa/Maleável
Mossoró	07/02/2014	Verde escuro	Resinosa/Maleável
Alto do Rodrigues	Pós-chuvoso	Verde escuro	Resinosa/Maleável
Alto do Rodrigues	Seco	Verde escuro	Resinosa/Maleável
Afonso Bezerra	08/02/2014	Verde seiva	Resinosa/Maleável
Areia Branca	10/02/2014	Laranja	Resinosa/ Maleável
Cerro Corá	09/01/2014	Marrom escuro	Resinosa/Maleável

* Texturas das amostras de própolis à temperatura ambiente. ** julho a setembro 2013 *** outubro de 2013 a janeiro de 2014.

As amostras de coloração marrom, coletadas no município de Mossoró assim como as amostras de coloração verde escuro do município de Alto do Rodrigues foram avaliadas separadamente, de acordo com os conjuntos feitos nos dois períodos distintos de coleta (pós-chuvoso e seco). Para tanto, estas foram avaliadas nas demais análises observando sempre a ocorrência de variações entre as duas épocas distintas do ano, na produção de própolis nas duas localidades.

A coloração marrom já foi descrita anteriormente para própolis de abelhas *Apis mellifera* de diferentes estados pertencentes à região nordeste do país (Ceará e Pernambuco: ANDRADE et al., 2012; Bahia: PARK et al., 2000; CABRAL et al., 2012).

Além dos estados da região nordeste, esta mesma coloração também já foi descrita em própolis da região sudeste (própolis marrom de Minas Gerais: ÍTAVO et al., 2009; própolis marrom do Rio de Janeiro: FREITAS; BARTH; LUZ, 2010) e centro-oeste (própolis marrom do Mato Grosso: BASTOS et al., 2011).

Algumas outras tonalidades similares também foram descritas por Park et al (2000), como as amostras marrom esverdeado (Paraná, São Paulo e Bahia) e marrom avermelhado (Bahia), além de tonalidades similares descritas pelos mesmos autores,

como “castanho claro” (Paraná e Rio Grande do Sul) e “castanho escuro” (Pernambuco).

Entretanto a coloração verde (seiva e escuro) ainda não tinha sido descrita, até o presente momento, em estados da região NE, como foi verificada nos municípios de Afonso Bezerra, Alto do Rodrigues e Mossoró. Em contrapartida, como essas amostras se encontram em região totalmente distinta das amostras de própolis verde produzidas no Brasil provindas de ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia* (TEIXEIRA et al. 2005; SALATINO et al. (2005), e sua textura e aroma serem bem diferentes destas, sua origem deve ser igualmente distinta.

As amostras de Mossoró de coloração verde escuro, coletadas nos dias 26/07/13 e 07/02/14, foram classificadas no mesmo padrão de coloração das amostras de Alto do Rodrigues (Fig. 5 A). Estas amostras surgiram nas colmeias experimentais no primeiro mês de coletas (amostra do dia 26/07/13) e no mês seguinte da última coleta (amostra do dia 07/02/14). Como eram amostras distintas das recolhidas durante todo o período de coleta no município de Mossoró, estas foram avaliadas separadamente, com o intuito de verificar possíveis relações com as amostras de coloração marrom e as de coloração verde de Alto do Rodrigues.

A amostra coletada no município de Afonso Bezerra foi classificada com a coloração “verde seiva” por possuir coloração de verde mais intenso que as demais amostras de cor verde (Fig. 5 C).

Quanto às amostras coletadas no município de Areia Branca, estas possuíam tonalidade vermelho escuro, mas após a trituração (apenas em nitrogênio líquido), apresentaram coloração alaranjada. É possível considerar o fato de essa amostra ter alguma relação com amostras de ambiente de manguezal (própolis vermelha).

Embora a verificação da sua composição química e avaliação microscópica dos sedimentos vegetais não tenham sido realizadas neste trabalho, por se tratar de uma própolis produzida em uma área de ambiente de Caatinga muito próxima do Manguê (aproximadamente 200 m, Fig. 3), a própolis de Areia Branca pode ter características provenientes de fonte botânica de ambos os biomas.

As amostras coletadas no município de Cerro Corá (região de serra) eram granuladas e possuíam coloração marrom escuro com tons claros. Essa característica é peculiar, considerando o fato de que as abelhas costumam triturar bem o material botânico com a mandíbula e acrescentar cera em quantidades variadas antes de sua deposição nas frestas da colmeia (GHISALBERTI, 1979).

Durante as coletas, foi possível registrar a atividade de deposição de própolis em uma das frestas (entre o ninho e a melgueira), após a retirada da melgueira para o corte da própolis verde de Afonso Bezerra (Fig. 6). Nesta figura é possível evidenciar claramente a coloração dessa própolis antes da sua coleta.



Figura 6 – Deposição de própolis verde por abelha *Apis mellifera* na abertura lateral entre ninho e melgueira, no município de Afonso Bezerra, RN.

Fazendo uma comparação visual entre a própolis de coloração verde de Alto do Rodrigues e a própolis verde de Minas Gerais, pode-se perceber que estas possuem tons distintos (Fig. 7), embora também ocorram variações na tonalidade da “coloração verde” até mesmo entre amostras de Minas Gerais (NUNES; GUERREIRO, 2012).

Quanto à consistência, ambas também diferem, sendo a amostra de própolis verde de MG de consistência rígida e quebradiça, e as amostras do RN, maleável e pegajosa à temperatura ambiente.

É importante salientar que variações na coloração podem ocorrer até mesmo em um único tipo de própolis, devido a condições ambientais como época do ano, umidade, e florada disponível (NUNES; GUERREIRO, 2012).

A maleabilidade das amostras do RN quando comparada aquelas produzidas na região sudeste do país, pode ser justificada devido às variações de temperatura, umidade e fonte botânica das duas regiões do país.

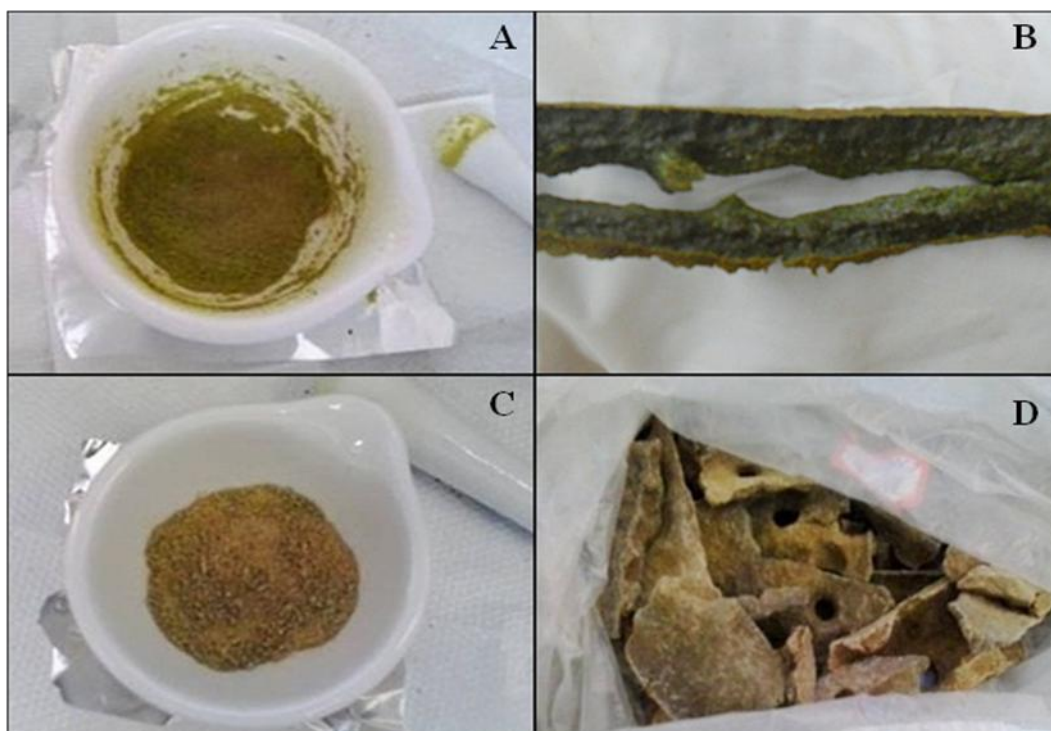


Figura 7 – Amostras de própolis verde de Alto do Rodrigues/RN (A e B) e Minas Gerais* (C e D). Avaliação comparativa de cor, textura e aroma das duas amostras. *Amostra de própolis verde de MG, cedida ao Laboratório de Fitoquímica da Universidade de São Paulo pelo Prof. Dr. Dejair Message.

5.2 PRODUÇÃO MENSAL DE PRÓPOLIS POR COLMEIA NOS MUNICÍPIOS DE MOSSORÓ E ALTO DO RODRIGUES

Ao longo dos dois períodos de coleta (pós-chuvoso e seco) nos apiários de Mossoró e Alto do Rodrigues, foi possível observar que as médias de quantidade de própolis produzida em gramas tiveram variações ao longo dos dois períodos e se comportaram de formas distintas (Fig. 8 e Tab. 2).

Ao longo dos meses de coleta, os dois apiários perderam três colmeias cada. Essas perdas foram compensadas nas médias registradas, onde o n amostral variou a partir do número de colmeias existentes no momento da coleta. Estas colmeias não puderam ser substituídas nos apiários experimentais, por terem sido cedidas pelos apicultores dos respectivos municípios para uso no período experimental.

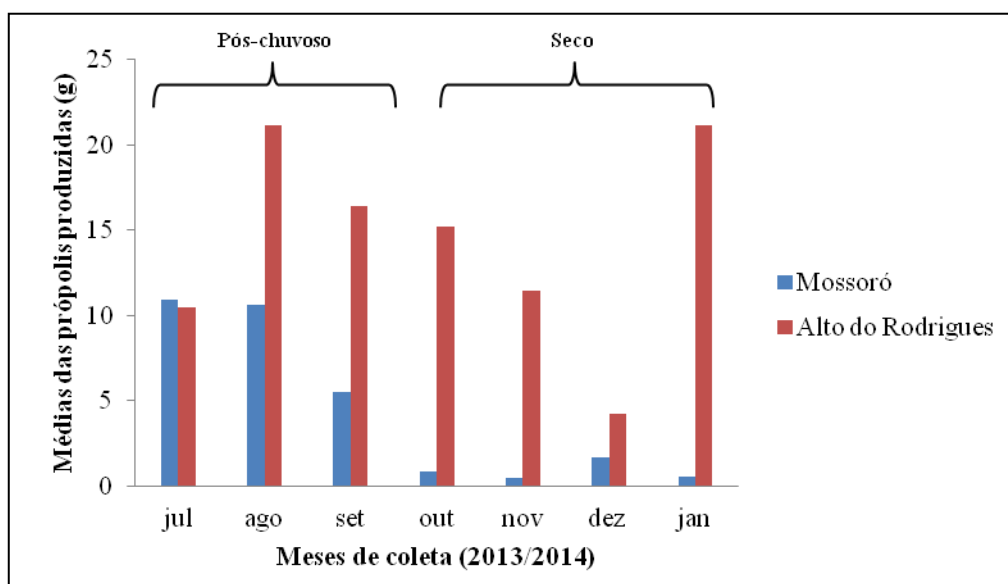


Figura 8 – Médias mensais da produção de própolis coletadas nos apiários de Mossoró e Alto do Rodrigues nos períodos pós-chuvoso e seco.

Tabela 2. Produção de própolis por colônias de abelhas africanizadas em Mossoró e Alto do Rodrigues no período de Julho de 2013 a Janeiro de 2014.

Meses de coleta	Médias de produção de própolis/colmeia (g)/mês de coleta	
	Mossoró	Alto do Rodrigues
Julho (pc)*	10,94 ± 9,93	10,44 ± 5,97
Agosto (pc)	10,63 ± 9,20	21,14 ± 10,46
Setembro (pc)	5,49 ± 3,40	16,41 ± 8,85
Outubro (sc)*	0,82 ± 1,17	15,18 ± 8,18
Novembro (sc)	0,50 ± 0,66	11,45 ± 6,40
Dezembro (sc)	1,64 ± 2,02	4,22 ± 7,95
Janeiro (sc)	0,54 ± 0,67	21,19 ± 10,72

*período pós-chuvoso (julho a setembro de 2013). **período seco (outubro de 2013 a janeiro de 2014).

As médias de produção no apiário de Mossoró ao longo do período de coleta reduziram até janeiro de 2014 (redução de 95% em relação ao mês de julho). No município de Alto do Rodrigues no último mês houve um aumento significativo no mês de agosto, bem como no mês de janeiro.

A maior produção de própolis no NE ocorre nos primeiros meses da estação das chuvas, época em que a maioria das espécies vegetais nativas floresce e produzem as gemas para reiniciar o crescimento (TORRES et al., 2008). Entretanto como nesta

pesquisa não foi possível avaliar as amostras de própolis do período chuvoso, pois, no ano de 2014, praticamente não choveu nos locais onde os apiários estavam localizados, portanto, não se pôde fazer tal comparação de produção entre os dois períodos (pós-chuvas e seco) com o período chuvoso propriamente dito.

As médias de produção mensal no município de Mossoró foram entre $0,54 \pm 0,67$ e $10,94 \pm 9,93$ g/colmeia/mês. Em Alto do Rodrigues variaram entre $4,22 \pm 7,95$ e $21,19 \pm 10,72$ g/colmeia/mês. Existe diferença entre os locais dos dois apiários e a baixa produção constatada pode ser devido ao fato de que as colmeias não foram selecionadas para produção de própolis e algumas delas em algumas coletas não produziram nada. Manrique et al. (2002) também observaram em seus apiários experimentais que estes possuíam colmeias que produziam própolis (colmeias propolizadoras) e outras não (não propolizadoras).

Vale salientar também que, no presente estudo, também não foram realizados manejos preconizados para aumentar a produção de própolis, como fornecimento de alimento energético.

Quanto ao decaimento da produção de própolis no apiário de Mossoró em relação ao de Alto Rodrigues, este fato pode estar relacionado com o tipo de resina coletado em ambos os locais, ou seja, fontes diferentes para a mesma época e com as condições diferentes dos dois locais onde estavam localizados os apiários. Por exemplo, em Alto Rodrigues parte das colmeias estavam localizadas na sombra durante o período seco, devido a presença da planta algaroba, que não perde as folhas durante o período seco, enquanto que em Mossoró a vegetação estava completamente seca, portanto, as colmeias estavam expostas diretamente à radiação solar.

Inoue et al (2007), ao verificar a produção de própolis em São Paulo, obtiveram médias entre 87,7 a 120,9 g/colmeia/mês para própolis verde colhidas em diferentes tipos de coletores. No mesmo estudo, verificaram também médias que variaram de acordo com as estações do ano e tipos de coletores, obtendo valores entre 42,8 e 212,9 g/colmeia/estação. Assim, constataram que tanto o tipo de coletor como a sazonalidade influenciam na produção de própolis por abelhas *Apis mellifera*.

Entretanto, Manrique e Soares (2002), verificaram valores menores na produção de própolis colhidas no espaço de três meses no estado de São Paulo. As médias de produção, por colmeia/trimestre (de abril a julho), em sete apiários distintos estudados por eles, variaram entre 0 e 68,82 g – apiários Americano e Cynthia, respectivamente, ambos inseridos dentro de uma mesma reserva florestal em Santa Rita de Passa Quatro,

São Paulo. Neste trabalho, entre as 100 colônias de abelhas *Apis mellifera* distribuídas nos sete apiários, apenas 25 foram consideradas propolizadoras. Assim, foi possível sugerir que, além dos fatores climáticos e métodos de coleta, as variações genéticas que ocorrem dentro das colônias de abelhas africanizadas, também influenciaram na produção.

Também poderia ser levado em conta que, devido à seca e a ausência de predadores naturais das plantas fornecedoras de resina, elas poderiam ter exsudado pouca ou nenhuma resina que atraísse as abelhas para a coleta. É importante, salientar que essas resinas são produtos secundários produzidos para a proteção das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Como neste estudo não se teve a pretensão de avaliar técnicas de coleta e de seleção de colmeias propolizadoras (todas as colmeias foram sobreviventes da seca de 2012 e escolhidas ao acaso), mas sim de fazer uma avaliação geral das médias de produção mensal por abelhas africanizadas em apiários distintos da caatinga, bem como sua composição físico-química e atividade biológica, não objetivou-se avaliar mais profundamente essas variações. Essa iniciativa pretende abrir espaço para pesquisas futuras quanto à comparação dos índices de produção, inclusive com aperfeiçoamento de tecnologias que se enquadrem à realidade do semiárido nordestino, para que se possa aperfeiçoar a produção de própolis nesta região.

Outra observação importante que pode contribuir para a discussão da baixa produção foi o fato de ter sido observado, no mês de setembro de 2013, no apiário experimental de Mossoró, a formação de aglomerados de abelhas (barreira física) sobre a fresta criada para deposição de própolis na colmeia (Fig. 9), devido ao excesso de abelhas na colmeia por falta de manejo populacional, ou seja, adição de mais melgueiras. Tendo sido o apicultor alertado, na quinzena seguinte ele relatou que a colmeia havia voltado ao normal sem a adição da melgueira, ocasião em que observamos que havia ocorrido uma enxameação reprodutiva neste local. Com a diminuição da população elas voltaram a se proteger dos ventos fortes e frios da região fechando a abertura com própolis. Também pode ser observado que a proteção ou produção da parede de própolis era maior no lado que estava na direção dos ventos fortes e frios, principalmente, aqueles que ocorrem durante a noite.



Figura 9 – Duas diferentes colmeias (A e B) do apiário de Mossoró no mês de setembro, com abelhas adultas fechando as aberturas com um cluster.

Neste mesmo mês, foi possível observar uma queda significativa na produção de própolis neste apiário, onde os índices de produção decaíram com o passar dos meses (Fig. 8).

No município Alto do Rodrigues, localizado a aproximadamente 13 m acima do nível do mar (IDEMA, 2015), as abelhas apresentaram um comportamento diferenciado daquele observado no município de Mossoró, principalmente, aquelas que estavam sob a sombra das árvores de algaroba, produzindo própolis em maior quantidade (fechando as frestas laterais), principalmente, na abertura voltada para a direção dos ventos que são mais frios também naquela região. Esse comportamento foi descrito por Ghisalberti (1979) como uma das finalidades da produção de própolis por abelhas (proteção contra os ventos), além daquele de proteger o ninho contra microrganismos.

5.3 SOLÚVEIS EM ETANOL SEM CONTEÚDO DE CERAS

Os teores de solúveis em etanol das amostras sem conteúdo de ceras apresentaram valores entre 28,04% (amostra de Mossoró, período seco) e 58,84% (amostra de Alto do Rodrigues, período seco) (Tab. 3).

Tabela 3 – Solúveis em etanol (sem conteúdo de ceras) das amostras de própolis do RN.

Amostra/Período de coleta	Solúveis em etanol (%)
Mossoró/Pós-chuvoso (pc)	30,61*
Mossoró/Seco (sc)	28,04
Mossoró 26/07	34,92
Mossoró 07/02	51,99
Alto do Rodrigues/Pós-chuvoso (pc)	54,37
Alto do Rodrigues/Seco (sc)	58,84
Afonso Bezerra	52,19
Areia Branca	56,56
Cerro Corá	31,61

*Valores expressos em porcentagem de massa seca liofilizada das amostras sem conteúdo de ceras.

Esses valores foram utilizados para os cálculos dos teores de fenóis e flavonóides totais das mesmas, no entanto, de acordo com a legislação brasileira que regulamenta a identidade e qualidade da própolis (BRASIL, 2001), nesse caso para um valor mínimo de 35% m/m, as amostras de própolis de Cerro Corá (31,61%); Mossoró (pc) (30,61%); Mossoró (sc) (28,04%) e Mossoró 26/07 (34,92%) não atenderiam a referida legislação e Mossoró 07/02 estaria praticamente dentro do limite.

Cabe salientar que as própolis de Mossoró, nos períodos pós-chuvoso e seco apresentaram um teor de cera alto e esse valor apresentado é livre de cera. Já a própolis Mossoró 26/7 e 07/02 que apresentavam uma coloração esverdeada, portanto, com mais resina proveniente de brotos, que confere mais massa mecânica, a inclusão de cera foi bem menor, levando a um total de massa seca (ou solúveis em álcool) maior. As amostras de Alto Rodrigues e Afonso Bezerra por apresentarem mais material proveniente de brotos devido sua cor esverdeada, portanto, com mais massa mecânica, o teor de cera foi menor e a massa seca foi maior (ver Tab. 6, com teores de ceras totais para comparação).

5.4 TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS

5.4.1 Teores de fenóis totais

A curva padrão de ácido *p*-cumárico obtida para os teores de fenóis totais, bem como equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), estão representados na Figura 10.

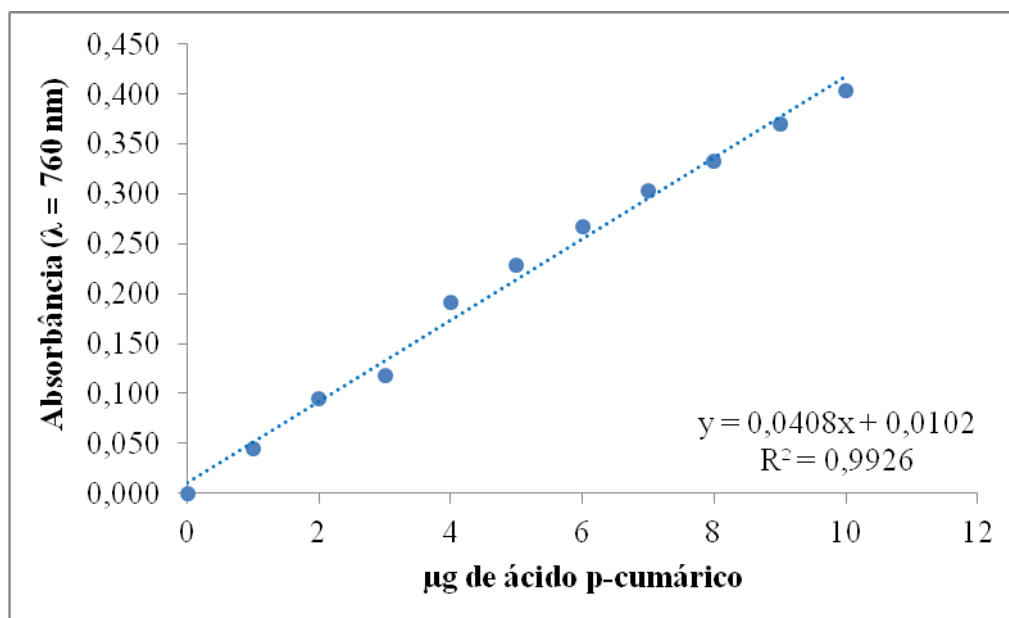


Figura 10 – Curva padrão de ácido *p*-cumárico obtida para determinação dos teores de fenóis totais de amostras de própolis do Rio Grande do Norte.

Nesta curva, o coeficiente de determinação de 0,99 foi excelente, permitindo calcular com segurança os teores de fenóis totais das amostras.

Nos teores de fenóis totais das nove amostras, foram obtidos valores variando entre $11,58 \pm 1,21$ mg/g (1,16 %, amostra de Cerro Corá) a $147,03 \pm 0,01$ mg/g (14,70 %, amostra de Alto do Rodrigues, período seco) (Tab. 4).

Tabela 4 – Teores de fenóis totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN.

Fenóis Totais		
Amostra/Período de Coleta	mg/g*	%
Mossoró (pc)	$67,10 \pm 0,80^{**}$	$6,71 \pm 0,08$ g
Mossoró (sc)	$46,70 \pm 0,45$	$4,67 \pm 0,05$ h
Mossoró 26/07	$73,12 \pm 1,21$	$7,31 \pm 0,12$ f
Mossoró 07/02	$127,56 \pm 1,75$	$12,75 \pm 0,18$ d
Alto do Rodrigues (pc)	$143,53 \pm 2,83$	$14,35 \pm 0,28$ b

Alto do Rodrigues (sc)	147,03 ± 0,10	14,70 ± 0,01 a
Afonso Bezerra	137,45 ± 0,90	13,74 ± 0,09 c
Areia Branca	84,96 ± 0,53	8,49 ± 0,05 e
Cerro Corá	11,58 ± 1,21	1,15 ± 0,12 i

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * = mg de fenóis totais presentes em 1g de própolis; resultados expressos em relação à massa seca; ** = valores expressos como equivalente de ácido *p*-cumárico; média ± desvio padrão, n = 3.

O teste estatístico ANOVA seguido do pós-teste de Tukey demonstrou que houve diferenças significativas entre os teores de fenóis totais entre todas as amostras ($P < 0,05$).

Os maiores percentuais de componentes fenólicos das amostras foram os daquelas caracterizadas por cor verde, amostras de Alto do Rodrigues, Afonso Bezerra e Mossoró, com percentuais que variaram entre 14,7 e 12,7%. Todas as amostras diferiram entre si, sendo os maiores percentuais os das amostras Alto do Rodrigues (pc) e Alto do Rodrigues (sc), com 14,3 e 14,7% (Tab. 4). Esses dados são importantes, pois remetem um bom indicativo do potencial farmacológico dessas própolis.

Na avaliação das variáveis dentro das amostras coletadas por períodos – períodos pós-chuvoso (pc) e período seco (sc) – foi possível observar que houve variação significativa entre os níveis dos teores de fenóis totais nos extratos de Mossoró. Essa variação ocorreu em também nas amostras de Alto do Rodrigues, porém de forma inversa, onde o extrato do período seco obteve valor maior.

Entre os extratos das amostras verde de Mossoró (26/07 e 07/02), verificou-se uma variação significativa entre aquela obtida no início das coletas (26/07), da obtida no final das coletas (07/02), com valores de fenóis totais igual a 7,3% e 12,7%. Esse resultado foi diferente daqueles das amostras de própolis verde de Afonso Bezerra, Alto do Rodrigues (pc) e Alto Rodrigues (sc) que apresentaram total de fenóis, respectivamente, igual a 14,3 e 14,7%.

Woisky e Salatino (1998) encontraram para própolis produzida no Estado de São Paulo variações de 8,8 a 13,7 mg/100g e Teixeira et al. (2010) detectou para a própolis verde de Minas Gerais 20,5% e 21,9% de fenóis totais, respectivamente, para Itapeçerica e Paula Cândido. Para colmeias instaladas no município de Virginópolis do mesmo estado, onde era produzida uma própolis preta, obteve-se somente 1,5% de

fenóis totais. A maior concentração de fenóis totais obtida nas amostras de Alto Rodrigues (período seco) foi de 14,7%, que corresponde a 67,2% do valor encontrado para a própolis verde característica do sudeste. Esses resultados mostram que a própolis verde do Rio Grande do Norte deve ser proveniente de gemas de plantas, pelo que pode se observar na Figura 5 (p.45), mas com menor teor de fenóis totais, portanto, com características diferentes, tanto na composição quanto na atividade biológica, que merecem ser melhor avaliadas.

Silva et al. (2006), avaliando própolis brasileira do estado da Paraíba em diversas colheitas ao longo do ano, verificou que os níveis de fenóis variaram ao longo das colheitas (entre 2,93 e 8,13%). Esse dado se enquadra com a variação que ocorreu nas amostras dos municípios de Mossoró e Alto do Rodrigues e os percentuais encontrados por Silva et al (2006) se aproximam dos obtidos neste estudo, nas amostras de própolis marrom de Mossoró. Entretanto, os teores de flavonóides totais encontrados nas amostras da Paraíba (entre 0,57 e 0,52%) foram menores dos que os encontrados no presente estudo (ver Tab. 5).

Alencar et al. (2007), encontraram valores de fenóis totais em própolis vermelha do estado de Alagoas de 232 ± 22.3 mg/g. Esse valor é muito superior aos encontrados neste trabalho (Tab. 4, p.55) para a própolis de Areia Branca, que apresenta cor semelhante à própolis vermelha do mangue, mostrando que possivelmente a resina obtida no Rio Grande do Norte seja de outra fonte, mas isso merece um estudo mais aprofundado para determinar a sua origem.

Em extratos etanólicos de própolis marrom da Bahia e verde de São Paulo, Cabral et al. (2009), apresentaram em seu trabalho percentuais bastante distintos de fenóis totais, de 1,4 e 16,9%, respectivamente.

Os dados do presente estudo também confirmam que a variabilidade de amostras de própolis de regiões diversas do Brasil é alta e isso também pode ocorrer dentro de um mesmo estado, como é o caso do Rio Grande do Norte.

5.4.2 Teores de flavonóides totais

A quercetina foi empregada como flavonoide para a construção da curva padrão por ser um dos flavonóis comumente empregados para a realização de comparações em análise de própolis. Sua equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), estão representados na Figura 11.

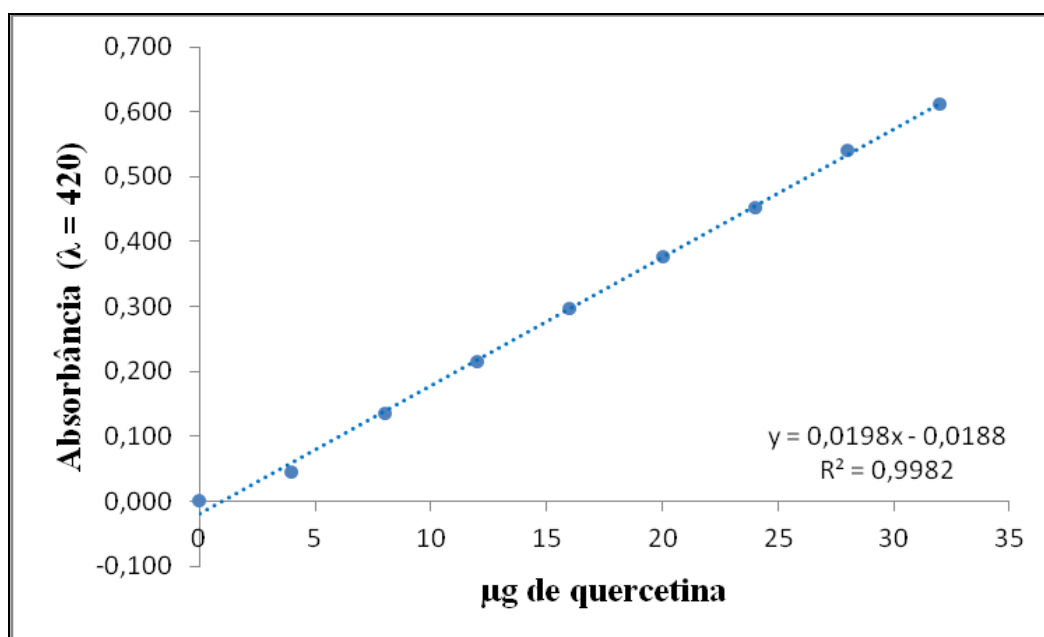


Figura 11 – Curva padrão obtida a partir da quercetina para determinação dos teores de flavonóides totais das amostras de própolis do Rio Grande do Norte.

As amostras apresentaram valores de flavonóides totais variando de $4,49 \pm 0,12$ mg/g (0,45%, amostra de Cerro Corá) a $116,66 \pm 0,48$ mg/g (11,67%, amostra de Afonso Bezerra) (Tab. 5).

Tabela 5 – Teores de flavonóides totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN.

Flavonóides Totais		
Amostra/Período de Coleta	mg/g*	%
Mossoró (pc)	$33,19 \pm 0,43^{**}$	$3,32 \pm 0,04$ e
Mossoró (sc)	$17,47 \pm 0,67$	$1,75 \pm 0,07$ f
Mossoró 26/07	$35,68 \pm 0,16$	$3,57 \pm 0,02$ d
Mossoró 07/02	$104,55 \pm 0,35$	$10,45 \pm 0,04$ b
Alto do Rodrigues (pc)	$93,72 \pm 2,52$	$9,37 \pm 0,25$ c
Alto do Rodrigues (sc)	$32,64 \pm 0,95$	$3,26 \pm 0,10$ de
Afonso Bezerra	$116,66 \pm 0,48$	$11,67 \pm 0,05$ a
Areia Branca	$10,27 \pm 0,11$	$1,03 \pm 0,01$ g
Cerro Corá	$4,49 \pm 0,12$	$0,45 \pm 0,01$ h

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * = mg de fenóis totais presentes em 1g de própolis; resultados

expressos em relação à massa seca; ** = valores expressos como equivalente de quercetina; média $\pm$ desvio padrão, n = 3.

A partir do teste estatístico ANOVA foi possível identificar que os valores de flavonóides totais das amostras analisadas são estatisticamente diferentes entre si. O teste Tukey demonstrou que o teor de flavonóides da amostra de Alto do Rodrigues (sc), é estatisticamente igual ao da amostra de Mossoró (26/07) e de Mossoró (pc).

Os teores de flavonóides das amostras de própolis verde de Afonso Bezerra, Mossoró (26/07) e Alto do Rodrigues (pc), com valores de 116,66 (11,6%), 104,55 (10,4%) e 93,72 mg/g (9,3%), respectivamente, foram superiores ao comumente encontrados em própolis brasileiras (GONSALES et al., 2006; ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009).

Para os teores de flavonóides totais, a avaliação das variáveis dentro das amostras coletadas por períodos pós-chuvoso (pc) e seco (sc) foi possível observar que houve variação significativa entre os níveis dos teores nos extratos de Mossoró e Alto do Rodrigues. Em ambos os locais, os teores de flavonoides foram maiores no período pós-chuvoso quando comparado ao período seco (Tab. 5). No entanto essa alta variação não ocorreu para os valores de fenóis totais (Tab. 4).

Alencar et al. (2007), por exemplo, encontraram valores de flavonóides totais de 43 mg/g (4,3%) em extrato etanólico de própolis vermelha do estado de Alagoas.

Gonsales et al. (2006) obtiveram valores entre 0,24 e 0,63% em 22 amostras de própolis das regiões sul, sudeste e centro-oeste do país.

Cabral et al. (2009), estudando extratos etanólicos de própolis marrom da Bahia e verde de São Paulo apresentaram em seu trabalho valores de flavonóides de 0,32% e 6,15%, respectivamente.

Os valores de flavonoides totais obtidos nestas amostras de própolis do RN são distintos, e aproximam-se mais com valores de própolis encontradas em países da Europa (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO, 2012).

Embora maiores percentuais de flavonóides sejam encontrados mais frequentemente em países europeus (própolis de regiões temperadas), na América do Sul valores superiores aos encontrados no presente trabalho já foram documentados (Argentina: 130mg/g, Chile: 116 mg/g, Uruguai: 168 mg/g) (KUMAZAWA;

HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Entretanto é importante salientar que no Brasil esses valores não aparecem de forma frequente (PEREIRA et al. 2002).

Apesar dos valores de flavonóides serem variados, segundo Pereira et al (2002), há grande controvérsia quanto ao percentual de flavonóides da própolis brasileira estarem associados aos seus respectivos potenciais farmacológicos. Isso porque, apesar de níveis baixos de flavonoides (flavonas, flavonóis, dentre outros.), quando comparados com as própolis europeias, já é de conhecimento comum que as amostras de própolis brasileiras possuem potencial terapêutico. No caso de amostras de própolis brasileiras, esse potencial provem de outros componentes fenólicos, como os fenilpropanóides prenilados e ácidos cafeoilquínicos como constituintes principais (SALATINO et al., 2005; SALATINO et al., 2011).

Diante destes resultados incomuns encontrados nesta pesquisa, estes níveis maiores de componentes flavonóides das amostras de própolis do RN devem estar diretamente ligados à fonte botânica destas amostras, considerando a diferença acentuada da flora local dos ambientes de caatingas, com aquelas em que foram coletadas em outras regiões do país descritas anteriormente na literatura.

5.5 TEOR DE CERAS TOTAIS

O conteúdo de ceras totais nas amostras variou de 21,98 mg/g (2,20 %, amostra de Cerro Corá) a 391,45 mg/g (39,14 %, amostra de Mossoró, período seco) (Tab. 6).

Tabela 6 – Teores de ceras totais dos extratos etanólicos das amostras de própolis do RN.

Ceras Totais		
Amostra/Período de Coleta	mg/g*	%
Mossoró (pc)	270,69	27,07
Mossoró (sc)	391,45	39,15
Mossoró 26/07	137,27	13,73
Mossoró 07/02	135,20	13,52
Alto do Rodrigues (pc)	81,26	8,13
Alto do Rodrigues (sc)	62,16	6,22
Afonso Bezerra	54,31	5,43
Cerro Corá	21,98	2,20

* = mg de ceras totais presentes em 1g de própolis

Observando os níveis de ceras das amostras dos municípios de Mossoró nos conjuntos realizados a partir dos dois períodos, tendo o pós-chuvoso, 27,7%, e o seco, 39,1%, percebeu-se que ambos estão acima dos limites determinados pela legislação brasileira. No município de Alto do Rodrigues, o conjunto das amostras coletadas no período pós-chuvoso obteve percentual de ceras totais igual a 8,1% e o do período seco 6,2%, ambos atendendo esse requisito da legislação. (Tab. 5). O aumento da cera deve ocorrer, provavelmente, quando a quantidade de resina disponível é baixa ou mais difícil de ser obtida, portanto, nesse caso as abelhas devem incluir mais cera na própolis.

A menor porcentagem de ceras foi o da amostra de Cerro Corá, com 2,2% seguida da amostra de Afonso Bezerra, com 5,4%. O maior teor de ceras entre as amostras foi o da própolis marrom, coletada em período seco no apiário de Mossoró que foi de 39,1%, a qual juntamente com aquela do período pós-chuvoso, com teor de 27,7%, estão fora dos níveis permitidos pelo Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001), que fixa o valor máximo em 25,0% (m/m).

Não foi possível avaliar os níveis de ceras da amostra de Areia Branca, devido a pouca quantidade obtida na coleta única que foi realizada desta amostra. Devido a não realização das avaliações dos níveis de ceras em triplicatas, não foi possível verificar se estes diferem estatisticamente por meio do teste ANOVA.

Para a verificação de possíveis correlações entre os teores de ceras com os de fenóis e flavonóides totais das amostras, foram realizados testes de regressão linear (método dos mínimos quadrados) (Fig. 12).

Nesta análise, foi possível constatar uma correlação positiva entre os teores de ceras e os teores de fenóis totais das oito amostras ($R^2 = 0,518$) (Fig. 12A), porém tal relação não foi verificada em comparação com os teores de flavonóides ($R^2 = 0,018$) (Fig. 12B).

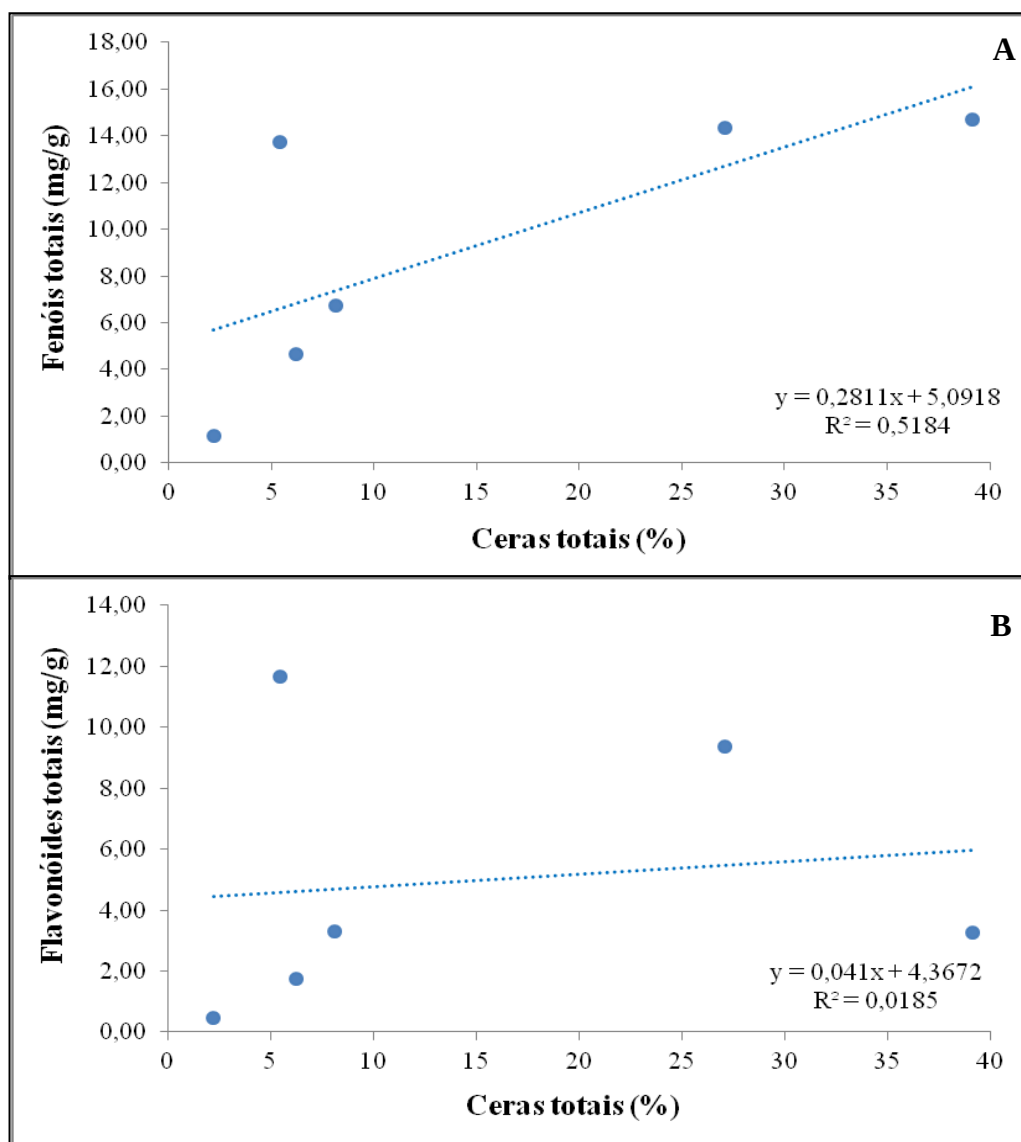


Figura 12 – Relações entre o conteúdo de ceras nas amostras de própolis e os teores de fenóis (A) e flavonóides (B) dos extratos etanólicos, obtidas pela análise de regressão linear.

O teor de ceras em amostras de própolis é algo importante quando o objetivo é avaliar o seu controle de qualidade, pois geralmente quanto maior a quantidade de ceras presente numa amostra menor o conteúdo de substâncias com atividades farmacológicas nesta (WOISKY; SALATINO, 1998). Estes podem variar de acordo com a disponibilidade de matéria prima para fabricação de própolis com maior variabilidade de componentes vegetais em época do ano distintas.

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Própolis (regulação vigente do Brasil), amostras com índices superiores a 25% de conteúdo de ceras não são consideradas aptas para comercialização. Todas as amostras verificadas neste estudo, com exceção dos conjuntos de amostras de própolis marrom de Mossoró,

estão dentro da legislação vigente quanto à fixação e qualidade de própolis no Brasil (< 25%).

O regulamento técnico vigente parte da premissa exposta anteriormente, em que, quanto maior o teor de ceras, menor o de compostos fenólicos, embora essa não seja uma regra, como foi observado no presente estudo onde, a própolis de Cerro Corá, apesar de possuir a menor porcentagem de ceras, também obteve menores índices de compostos fenólicos. Porém, no geral, constatou-se que as amostras tiveram correlação positiva entre estes dois parâmetros, conforme prever a legislação.

Fernandes-Silva (2008), ao avaliar teores de ceras em amostras de própolis verde de Minas Gerais e Paraná obteve resultados entre 3,8 e 10,4%. Essa variação foi bem menor do que as constatadas nas própolis do RN, que variara entre 2,20 %, a 39,14 %. Esses resultados podem ser justificados devido à variação nos tipos de própolis obtidos neste estudo.

Na região nordeste do país, Silva *et al.* (2006) verificaram teores de ceras em amostras de própolis coletadas no estado da Paraíba entre 12,2 a 38,5%. Os autores também observaram menores teores de ceras no primeiro período de coleta do seu experimento, entre os meses de julho a setembro (12,2%). Estes níveis foram crescentes até o mês de fevereiro do ano seguinte, variando entre 26,0 a 38,5%, e reduziram no conjunto das amostras coletadas entre meados de fevereiro e maio (meses de chuvas no nordeste), chegando a uma porcentagem de 15,6%. Estes dados estão de acordo com os desta pesquisa, onde foi possível verificar um aumento significativo entre os níveis de ceras das amostras de própolis de Mossoró em período de chuvas esporádicas (27,7%) e em período de seca prolongada (39,1%).

O valor máximo de ceras encontrados em própolis do RN também foi próximo ao máximo encontrado em própolis da Paraíba (39,1 e 38,5%, respectivamente), o que indica que essas amostras, por se tratarem de amostras pertencentes à mesma região (semiárida), podem sofrer alterações similares no nível de ceras nas mesmas épocas anuais.

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste estudo para avaliação das atividades antioxidantes através do método do DPPH utilizou-se a quercetina como agente antioxidante para a confecção das curvas padrão. A escolha pela quercetina se deu, devido à composição predominante de

flavonóides nas amostras e por esta se tratar de um flavonoide bastante conhecido e utilizado.

5.6.1 Atividade antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH

O método de sequestro de radicais livres DPPH permite verificar se a amostra analisada possui atividade antioxidante. A fim de se obter um gráfico que ilustrasse a atividade antioxidante da quercetina, foi feito um teste utilizando concentrações variadas desse composto (Fig. 13). Portanto, para testar a atividade antioxidante das amostras, foram utilizadas as concentrações de 15, 30, 45 e 60 µg/mL.

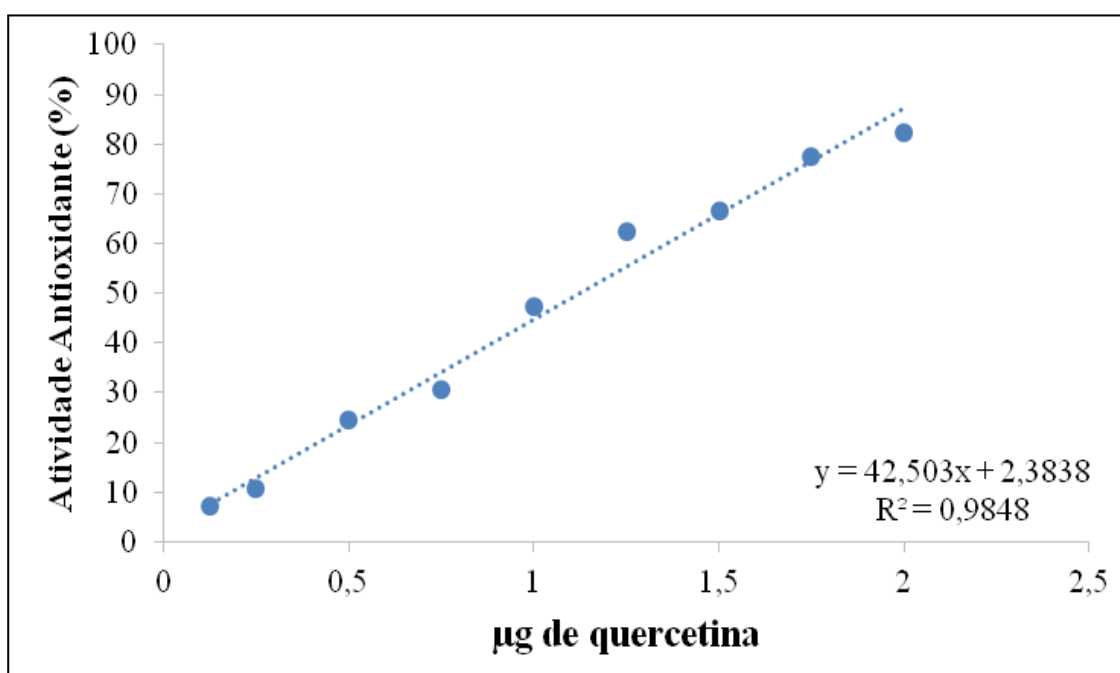


Figura 13 – Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina, pelo método de sequestro de radicais livres DPPH.

Os resultados obtidos permitiram concluir que todas as amostras analisadas possuem atividade antioxidante, e que esta é dose-dependente (Fig. 14).

A maior porcentagem de atividade antioxidante neste método entre as amostras testadas foi a de Alto do Rodrigues em período pós-chuvoso com valor de 52,18% na concentração de 60µg/mL (Tab. 7).

Foi possível observar que todas as amostras se comportaram de forma semelhante, aumentando a sua atividade antioxidante a partir do aumento da concentração destas (Tab. 7).

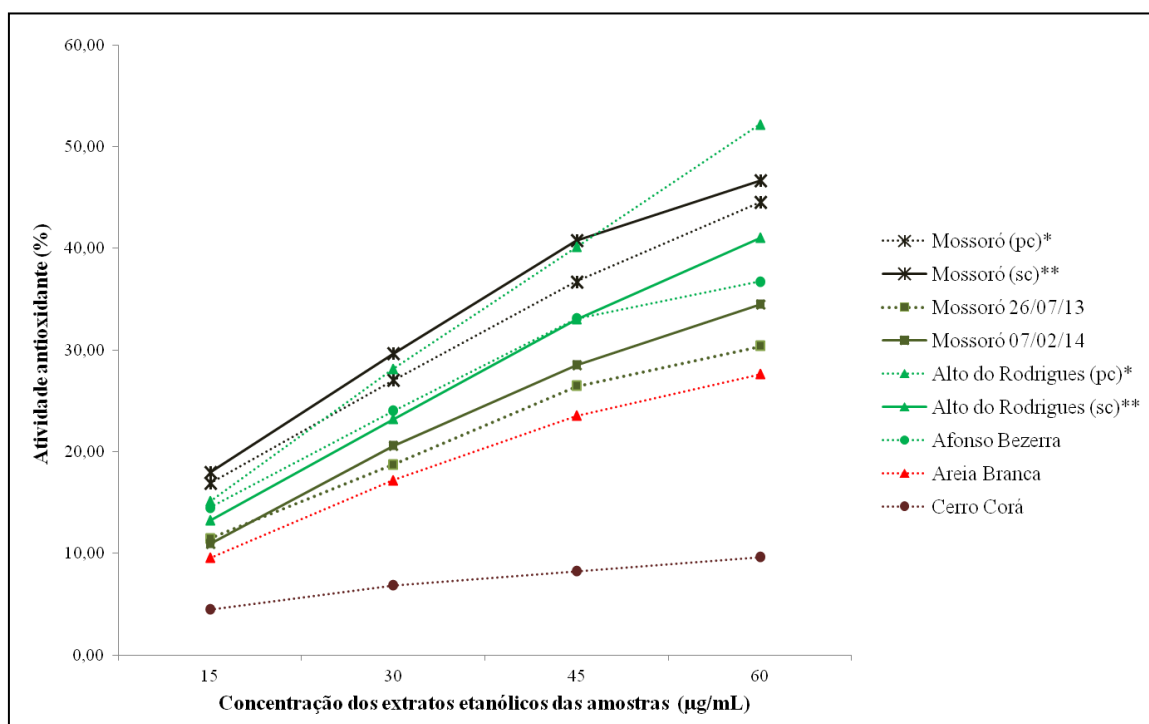


Figura 14 – Atividade antioxidante, pelo método do DPPH, dos extratos etanólicos brutos de amostras de própolis do RN, em comparação com a quercetina. * período pós-chuvoso (julho a setembro de 2013) ** período seco (outubro de 2013 a janeiro de 2014).

Tabela 7 – Porcentagem de atividade Antioxidante dos extratos etanólicos de própolis do RN pelo método de sequestro de radicais livres DPPH em diferentes concentrações.

Amostra	Concentração (µL/mL)			
	15	30	45	60
Mossoró (pc)	17,952 dA*	29,663 cA	40,767 bA	46,657 aB
Mossoró (sc)	16,893 dA	27,038 cB	36,730 bB	44,565 aC
Mossoró (27/07)	11,437 dD	18,721 cE	26,459 bE	30,383 aG
Mossoró (07/02)	10,939 dD	20,563 cD	28,497 bD	34,460 aF
Alto do Rodrigues (pc)	15,126 dB	28,138 cB	40,138 bA	52,184 aA
Alto do Rodrigues (sc)	13,277 dC	23,192 cC	33,025 bC	41,049 aD
Afonso Bezerra	14,498 dB	24,029 cC	33,109 bC	36,812 aE
Areia Branca	9,570 dE	17,198 cF	23,532 bF	27,600 aH
Cerro Corá	4,458 dF	6,850 cG	8,230 bG	9,655 aI

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%).

A atividade antioxidante da quercetina foi bastante superior à das amostras testadas. Porém, já que o padrão corresponde a uma substância isolada, esses resultados não são incomuns, pois os extratos de própolis, por serem misturas complexas de substâncias, geralmente possuem atividade inferior ao padrão.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras analisadas em todas as concentrações testadas são estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$), o que permitiu a comparação dos resultados obtidos.

Na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ as amostras de própolis marrom dos municípios de Mossoró (pc e sc) obtiveram os melhores desempenhos com 17,95 e 16,89%, respectivamente. Estas duas amostras e as amostras verdes de Mossoró (27/07 e 07/02) não diferiram entre si, bem como as amostras de Alto do Rodrigues (pc) com a amostra de Afonso Bezerra.

Na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ as amostras de própolis marrom dos municípios de Mossoró (pc e sc) e verde do município de Alto do Rodrigues (pc) obtiveram os melhores desempenhos com 29,66, 27,03 e 28,13%, respectivamente. Sendo que as amostras de Mossoró (sc) e Alto do Rodrigues (pc) não diferiram entre si, bem como as amostras de Alto do Rodrigues (sc) e Afonso Bezerra.

As amostras com melhores desempenhos à concentração de 45 $\mu\text{g/mL}$ foram as marrom de Mossoró (pc) e verde de Alto do Rodrigues (pc) com 40,76% e 40,13%, respectivamente. As amostras de Alto do Rodrigues (sc) e Afonso Bezerra não diferiram entre si, com porcentagens de atividade antioxidante de 33,02 e 33,10%, respectivamente.

A concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, todas as amostras diferiram entre si, sendo a Alto do Rodrigues (pc) com melhor porcentagem de atividade antioxidante (52,18%), seguida pelas amostras de Mossoró (pc) e Mossoró (sc) (46,65 e 44,56%, respectivamente).

5.6.2 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Figura 16 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de amostras de própolis do RN pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. * período pós-chuvoso (julho a setembro de 2013) ** período seco (outubro de 2013 a janeiro de 2014).

A maior porcentagem de atividade antioxidante neste método entre as amostras testadas foi a de Areia Branca (75,09 %) na concentração de 120 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 7).

Observou-se que todas as amostras se comportaram de forma semelhante, aumentando a sua atividade antioxidante a partir do aumento da concentração destas, exceto a amostra de Cerro Corá, que teve um decaimento na porcentagem de sua atividade à concentração de 120 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 8).

Tabela 8 – Atividade Antioxidante dos extratos de própolis do RN pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	40	80	120
Mossoró (pc)	40,129 cB*	52,104 bBC	60,649 aBC
Mossoró (sc)	24,939 cC	47,575 bCD	56,969 aC
Mossoró (27/07)	49,663 cA	54,248 bB	61,220 aB
Mossoró (07/02)	45,986 cAB	61,314 bAB	70,802 aAB
Alto do Rodrigues (pc)	22,631 cC	42,806 bCD	57,897 aC
Alto do Rodrigues (sc)	16,862 cC	40,392 bD	59,588 aC
Afonso Bezerra	27,184 cC	44,336 bCD	53,074 aC
Areia Branca	54,248 Ca	66,300 bA	75,091 aA
Cerro Corá	17,417 aC	21,922 aE	15,915 aD

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%).

Na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ a amostra de própolis de Areia Branca com porcentagem igual a 54,94, obteve o melhor desempenho, seguidas da amostra de Mossoró (27/07) com 49,66% e Mossoró (07/02), com 45,98% de atividade.

Nas concentrações de 80 e 120 $\mu\text{g/mL}$ as amostras de própolis de Areia Branca e Mossoró (07/02) obtiveram as maiores porcentagens de atividade antioxidante, com 66,30, 75,09, 61,31 e 70,80%, respectivamente. Estas amostras não diferiram entre si.

As amostras de Alto do Rodrigues e Afonso Bezerra não diferiram entre si em todas as concentrações.

Os melhores percentuais obtidos pelos métodos do DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico foram os das amostras de Alto do Rodrigues (pc) (52,18%) e Areia Branca (75,09%), nas concentrações de 60 e 120 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente.

Os autores Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), ao avaliarem extratos de amostras de própolis de vários países (concentração a 10 $\mu\text{g/g}$), verificaram que houve diferenças significativas entre os percentuais de atividade antioxidante pelos dois métodos (DPPH e β -caroteno/ácido linoléico). A amostra de própolis do Brasil estudada por eles (verde de MG) obteve percentuais aproximados em ambos os métodos (entre 30 e 40%), tendo atividade inferior aos de própolis com maiores percentuais de flavonóides totais (Argentina, Austrália, Chile e China).

A atividade antioxidante pelos dois métodos foi diretamente relacionada aos percentuais de compostos fenólicos e flavonóides das amostras. No entanto, os mesmos autores discutem a importância e diferenciação de componentes fenólicos encontrados na própolis Brasileira, com alto potencial antioxidante, apesar dessa ação não ser tão efetiva quando estes ocorrem em sinergismo nestas amostras. Isso foi comprovado quando uma fração isolada de artepillin C (principal constituinte bioativo da própolis verde de MG) foi testada pelo mesmo método, obtendo percentual de 80% de atividade. Também enfatizam que apesar dos testes terem ocorrido com uma amostra de própolis verde da região de MG, outros tipos de própolis do Brasil não foram estudados por eles para possíveis comparações.

Em seu trabalho com extratos metanólicos brutos de própolis verde das regiões de Minas Gerais e Paraná, Fernandes-Silva (2008) verificou que os níveis de atividade antioxidante pelo método do DPPH nestas amostras (25 $\mu\text{g/mL}$) obtiveram valores inferiores aos encontrados por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), com variação entre 10 e 19,2% nas amostras estudadas.

Porém, ao verificar a atividade antioxidante pelo método do DPPH, em frações diferenciadas dos extratos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) na mesma concentração (25 $\mu\text{g/mL}$), percebeu que houve um aumento significativo nesta atividade em todas as frações, sendo os valores mais altos os da fração metanólica (41,6%, amostra de MG), e inferiores nas frações menos polares. Nestes resultados com amostras em frações, Fernandes-Silva (2008) pode encontrar valores similares àqueles encontrados no trabalho de Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004).

No presente trabalho os valores da atividade antioxidante dos extratos etanólicos brutos pelo método do sequestro do radical DPPH na concentração de 30 $\mu\text{L/mL}$ (concentração próxima daquela testada por Fernandes-Silva, 2008) variaram entre 6,85 (amostra Cerro Corá) e 29,66% (amostra Mossoró pc). A variação destes valores foi superior ao encontrado nas própolis de Minas Gerais e Paraná, provavelmente devido a amplitude na variabilidade dos tipos de própolis do semiárido descritos aqui.

No método de atividade antioxidante por meio da descoloração do β -caroteno/ácido linoleico foi observado nas amostras de própolis do RN que os valores de porcentagem de atividade foram maiores que aquelas observadas pelo método do DPPH. Embora as concentrações testadas tenham sido diferentes, pelo tipo de amostra, local e método, em ambos os testes as amostras apresentaram atividade antioxidante significativa. Os autores Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) e Fernandes-Silva (2008) também encontraram respostas de atividade superiores em seus extratos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico quando comparado ao método do DPPH.

Quanto às atividades antioxidantes, não houve correlação, pelo teste de regressão linear, entre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e os teores de fenóis e flavonóides totais das amostras ($R^2 < 0,5$) em todas as concentrações testadas. Esse resultado também pode ter sido reflexo da grande variabilidade entre as amostras de própolis estudadas.

Entretanto, devido às diferenças apresentadas nas variações das atividades pelos dois métodos, é importante salientar que a curva padrão de quercetina para o método do β -caroteno/ácido linoleico (Fig. 15) apresentou o valor do coeficiente de determinação (R^2) considerado baixo, quando comparado à curva feita para o método do DPPH (Fig. 13). Sendo assim, devido a esse valor do R^2 ter sido inferior, pode-se considerar que a partir da curva de quercetina pelo método DPPH se possa avaliar melhor o modelo, ou seja, que os percentuais de atividade antioxidante das amostras seriam mais confiáveis pelo método do DPPH ($R^2 = 0,98$) que os obtidos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico ($R^2 = 0,68$), através da curva de quercetina.

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.7.1 Avaliação da atividade dos antibióticos in vitro

Para verificação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos das amostras de própolis do RN frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi realizado um antibiograma prévio, onde foi possível avaliar in vitro a ação de diferentes antimicrobianos de uso farmacêuticos (Tab. 9).

Tabela 9 – Perfil de susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente a diferentes antimicrobianos de uso farmacêuticos.

Halos de inibição (mm) pelo antibiograma		
Antibiótico	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Amicacina (30µg)	16,0 ^I	18,0 ^{S**}
Ampicilina (10µg)	27,0 ^S	15,0 ^S
Cefalexina (30µg)	26,0 ^S	10,0 ^R
Eritromicina (15µg)	22,0 ^S	13,0 ^R
Norfloxacin (10µg)	*	28,0 ^S
Oxacilina (1µg)	16,0 ^R	0 ^R
Penicilina G (10U)	20,0 ^R	0 ^R

*Não houve formação de halo significativo. ** S-sensível; I-intermediário ;R-resistente.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 8 com os da tabela de formação de halos padronizada pela CLSI (2011), os resultados obtidos demonstraram que os antibióticos Ampicilina e Norfloxsarcina foram os fármacos que inibiram de forma mais efetiva (com maiores halos de inibição) o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Estes antibióticos tiveram a formação de halos de 27 mm e 28 mm, concluindo que a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* demonstraram sensibilidade a estes fármacos. Deste modo, estes antibióticos foram escolhidos para serem postos em comparação com a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis do RN testados no presente estudo.

5.7.2 Atividade dos extratos de própolis frente à *Staphylococcus aureus*

Os halos de inibição dos extratos etanólicos brutos de própolis do Rio Grande do Norte contra *S. aureus* nas concentrações 2,5, 5, e 10 mg/mL estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de própolis do RN frente à *S. aureus* em três concentrações distintas.

Amostra	Diâmetros dos halos de inibição dos extratos em diferentes concentrações (mm)		
	2,5 ^{**}	5,0	10,0
Mossoró (pc)	*	10,66	10,66
Mossoró (sc)	*	*	10,33
Mossoró (27/07)	0	*	*
Mossoró (07/02)	*	10,66	13,33
Alto do Rodrigues (pc)	10,33	12,33	13,66
Alto do Rodrigues (sc)	14,00	15,66	19,33
Afonso Bezerra	*	14,33	20,33
Areia Branca	0	0	0
Cerro Corá	*	*	*

* amostras com formação de halos, porém com valores não significativos pela norma CLSI (2011) (< 10 mm). ** Concentrações dos extratos etanólicos de própolis do RN expressos em mg/mL. Para fins estatísticos, consultar resultados transformados na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados transformados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de própolis do RN frente à *S. aureus* em três concentrações distintas.

Amostra	Diâmetros dos halos de inibição dos extratos em diferentes concentrações (mm)		
	2,5 ^{**}	5,0	10,0
Mossoró (pc)	3.0266 ab	3.3270 abc	3.3363 a
Mossoró (sc)	1.6410 bc	1.7992 bc	3.2906 a
Mossoró (27/07)	*	2.3432 abc	2.9420 a
Mossoró (07/02)	2.7117 abc	3.3116 abc	3.6695 a
Alto do Rodrigues (pc)	3.2906 a	3.5818 ab	3.7601 a

Alto do Rodrigues (sc)	3.4353 a	4.0106 a	4.4493 a
Afonso Bezerra	2.6436 abc	3.8271 ab	4.5441 a
Areia Branca	*	*	*
Cerro Corá	1.2531 c	1.2531 c	2.6282 a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Não houve formação de halos.** Concentrações dos extratos etanólicos de própolis do RN expressos em mg/mL.

Dentre os resultados que demonstraram atividade significativa (halos com valores acima de 10 mm), nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 mg/mL, os extratos de Alto do Rodrigues (sc) e Afonso Bezerra (para as duas últimas concentrações) obtiveram os maiores halos de inibição, com 15,66 e 19,33 mm, e 14,33 e 20,33 mm, respectivamente (Tab. 10).

Na menor concentração (2,5 mg/mL), os únicos extratos que obtiveram halos de inibição significativos frente a *S. aureus* foram os das amostras de Alto do Rodrigues (pc e sc).

A 5 mg/mL os maiores halos foram os da amostra de Alto do Rodrigues (sc) com média de 15,66 mm. Na análise estatística esses valores apresentaram diferença significativa nas concentrações de 2,5 e 5 mg/mL (dados transformados, Tab. 11).

Na concentração de 10mg/mL, os extratos de Afonso Bezerra e Alto do Rodrigues (sc) apresentaram os maiores halos de inibição com 20,33 e 19,33mm, respectivamente (Tab. 10).

Somente os extratos de Mossoró (27/07) e Cerro Corá não formaram halos de inibição significativos frente a *S. aureus* na concentração de 10 mg/mL. O extrato feito a partir da amostra de Areia Branca não apresentou nenhuma reação antimicrobiana nesta estirpe testada. Na análise estatística esses valores não apresentaram diferença significativa (Tab. 11).

5.7.3 Atividade dos extratos de própolis frente à *Escherichia coli*

Os halos de inibição dos extratos etanólicos brutos de própolis do RN contra *E. coli* nas concentrações 2,5, 5, e 10 mg/mL estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente à *E. coli* em três concentrações distintas.

Amostras	Diâmetros dos halos de inibição dos extratos em diferentes concentrações (mm)		
	2,5**	5,0	10,0
Mossoró (pc)	0	*	10,00
Mossoró (sc)	*	*	11,33
Mossoró (27/07)	0	*	11,66
Mossoró (07/02)	*	11,00	12,00
Alto do Rodrigues (pc)	11,66	12,00	14,33
Alto do Rodrigues (sc)	*	*	*
Afonso Bezerra	*	*	0
Areia Branca	*	*	14,00
Cerro Corá	0	*	14,33

* Amostras com formação de halos, porém com valores não significativos pela norma CLSI (2011) (< 10 mm). ** Concentrações dos extratos etanólicos de própolis do RN expressos em mg/mL. Os resultados não apresentaram diferença significativa. Para fins estatísticos, consultar a Tabela 13.

Tabela 13 – Dados transformados da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente à *E. coli* em três concentrações distintas.

Amostras	Diâmetros dos halos de inibição dos extratos em diferentes concentrações (mm)		
	2,5**	5,0	10,0
Mossoró (pc)	*	3.1349 a	3.2379 a
Mossoró (sc)	1.6410 b	2.7254 a	3.4295 a
Mossoró (27/07)	*	2.9420 a	3.4726 a
Mossoró (07/02)	3.0731 ab	3.3912 a	3.4726 a
Alto do Rodrigues (pc)	3.4726 a	3.5296 a	3.5355 a
Alto do Rodrigues (sc)	2.7386 ab	3.0043 a	3.8449 a
Afonso Bezerra	2.3528 ab	2.9155 a	*
Areia Branca	2.5673 ab	2.9420 a	3.0558 a
Cerro Corá	*	2.4720 a	3.7869 a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Não houve formação de halos. ** Concentrações dos extratos etanólicos de própolis do RN expressos em mg/mL.

Dentre os resultados que demonstraram atividade dos extratos de própolis frente à *E. coli* nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 mg/mL, o extrato de Alto do Rodrigues (sc) obteve o melhor desempenho, apresentando halos de inibição de 11,66, 12 e 14,33 mm, respectivamente (Tab. 12)

Na menor concentração (2,5 mg/mL), a amostra de Alto do Rodrigues (pc) foi a única amostra que demonstrou atividade contra *E. coli* (média dos halos de 11,66 mm) (Tab.12).

Somente o extrato de Alto do Rodrigues (sc) não formou halos de inibição frente a *E. coli* na concentração de 10 mg/mL.

Na análise estatística com os valores transformados, os extratos das amostras testadas não diferiram entre si nas concentrações 5,0 e 10 mg/mL (Tab. 13).

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* foram sensíveis, ou seja, formaram halos de inibição, em meio aos extratos de própolis do RN nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 mg/mL, embora obtiveram maior eficiência na maior concentração testada.

Em geral, entre as concentrações testadas que foram observados halos de inibição igual ou superiores a 10 mm, as amostras de Alto do Rodrigues (pc e sc) foram consideradas a mais eficientes frente a *S. aureus* e *E.coli*, respectivamente, por terem demonstrado atividade antimicrobiana em todas as concentrações dos extratos.

Nestes resultados também foi possível observar que a inibição de *S. aureus* foi mais ampla nos diferentes extratos e concentrações testadas, quando comparada aos resultados obtidos em *E. coli*. Este resultado esta dentro do esperado quanto à ação de extratos de própolis, que geralmente possuem melhor eficácia contra bactérias gram-positivas em testes com extratos etanólicos (BISPO JÚNIOR et al., 2012).

Em sua pesquisa testando extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas em diferentes espécies de bactérias, – dentre elas *S. aureus* e *E. coli* – Bispo Júnior e colaboradores (2012) verificaram que 100% das bactérias gram-positivas testadas foram suscetíveis, em comparação com as gram-negativas onde apenas 62,5% foram sensíveis ao extrato.

Ainda no mesmo estudo, estes autores também verificaram que as mesmas cepas se comportaram de forma diferenciada frente a distintas frações dos extratos (etanólica, hexânica, clorofórmica e acetanólica), onde as duas últimas obtiveram melhores percentuais de atividade antimicrobiana frente às cepas de ambos os tipos de

bactérias estudadas (gram-positivas e negativas), chegando a 100% de atividade na fração acetanólica.

Diante disso, percebe-se que a variabilidade da atividade antimicrobiana pode variar entre os extratos de diferentes tipos de própolis, bem como em diferentes frações destes e que, nos extratos de própolis do Rio Grande do Norte, onde ocorreu formação de halos nas diluições propostas, essas variações também foram perceptíveis.

6 CONCLUSÕES

Os tipos de própolis de própolis encontrados nesta pesquisa nas cinco regiões do estado do RN, são distintos em todas as avaliações testadas. Na avaliação organoléptica, apresentaram cor e granulometria diferenciadas.

A produção de própolis em apiários localizados na região do semiárido do RN é baixa nos dois períodos testados quando comparado com produção de própolis verde em estados do sudeste;

Existe própolis verde no semiárido potiguar, porém, a sua origem certamente é diferente daquela do sudeste em função da vegetação ser distinta.

Houve uma tendência de produção maior no município de Alto Rodrigues em relação a Mossoró, provavelmente devido a uma maior disponibilidade de fontes para própolis verde em Alto Rodrigues.

Embora em níveis relativamente baixos, ocorreram picos de produção de própolis verde escuro no final do período chuvoso (julho/agosto) e em janeiro e início fevereiro em ambas localidades, neste último caso coincidindo com período de alta produção de própolis verde-seiva em Afonso Bezerra.

As amostras de própolis coletadas no semiárido potiguar mostraram-se bastante variadas em relação à cor (verde escuro, verde-seiva; marrom claro a escuro e, alaranjada), sendo resinosa e maleável.

A análise físico-química das nove amostras de própolis do RN é bastante variada. A própolis de Mossoró, exceto duas amostras verde escuro (obtidas em julho e fevereiro), apresentaram níveis de massa seca, livre de cera, abaixo dos níveis mínimos exigidos, provavelmente, por apresentarem maior quantidade de cera em relação àquela exigida na legislação brasileira (máximo de 25%). A própolis de Cerro Corá também não atendeu as exigências da legislação quanto à massa seca, no entanto, apresentou baixo nível de cera.

Os níveis de fenóis totais variaram significativamente entre as diferentes amostras e com exceção da amostra de Mossoró no período de seca e de Cerro Corá, todos atenderam a legislação pertinente do Brasil.

Os teores de flavonoides de uma maneira geral foram superiores àqueles observados para outros tipos de própolis brasileira, aproximando mais com os valores encontrados nas própolis europeias.

As amostras também apresentam variação quanto as suas atividades biológicas. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante, sendo que o melhor percentual obtido pelo método do DPPH foi o da amostra de Alto do Rodrigues (pc) e pelo método do β -caroteno/ácido linoleico a amostra de Areia Branca.

Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *E.coli*. As amostras de Alto do Rodrigues dos períodos pós-chuvoso e seco foram consideradas as mais eficientes frente a *S. aureus* e *E.coli*, respectivamente, por terem demonstrado atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas.

7 REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L. et al. Chemical composition and biological activity of new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, p.1-6, 2007.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G. et al. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v.30, n.4, p. 828–831, 2007.
- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. et al. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.
- ANDRADE, N. P. C.; SILVA, E. M. S.; MOTA, J. L. A. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.1, p.9-15, 2012.
- ASHRYA, E. S. H. E.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, p. 31-39, 2012.
- AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.2, p. 215-220, 2007.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H. 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 & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 181–189, 2008.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARUCCI, M. C. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29–32, 2005.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K. et al. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896–900, 1998.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K. et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8, p.16–23, 2001.

- BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ K.; BOJIĆ, M.; et al. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa Cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 772–778, 2011.
- BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 567–71, 2007.
- BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 273–281, 2008.
- BASTOS, E. M. A. F., GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M. 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.
- BISPO JÚNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03–10, 2012.
- BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1351–1358, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 3, de 19/01/2001, **Instrução Normativa** Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001.
- BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M. G.; SFORCIN, J. M. In vitro Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 483–487, 2009.
- BURDOCK G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347–363, 1998.
- CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.
- CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; ALENCAR, S. M. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 557–564, 2012.
- ÇAM, Y.; KOÇ, A. N.; SILICI, S.; GÜNES, V. et al. Treatment of dermatophytosis in young cattle with propolis and Whitfield's ointment. **Veterinary Record**, v. 165, p. 57–58, 2013.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. 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. 1512-1516, 2007.

CHEN, C. N.; WENG, M. S.; WU, C. L. et al. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 2, p. 175–185, 2004.

CHEN, Y. W.; WU, S. W.; HO, K. K. et al. Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 412–419, 2008.

CHOUCAIR, G.; VIEIRA, M. 2013. **Exportadores de rochas ornamentais e produtores de própolis de MG na contramão da balança**. Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2013/05/31/internas_economia,397331/exportadores-de-rochas-ornamentais-e-produtores-de-propolis-de-mg-na-contramao-da-balanca.shtml>. Data de acesso: 10 de set. 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Sensibility Testing**. Twenty-First Informational Supplement, v.30, n.1, 2011.

CUETO, A P.; ALVES, S. H.; PILAU M. et al. Antiviral activity of propolis extracts against feline calicivirus, canine adenovirus 2, and bovine viral diarrhea virus. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.10, p.1800–1806, 2011.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1–8, 2013.

DANTAS, T. N. C.; SILVA, H. S. R. C.; DANTAS NETO, A. A. et al. Development of a new propolis microemulsion system for tropical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p. 368–375, 2010.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, n. 89, p. 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P. et al. Brazilian Red Propolis: Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4246–4253, 2012.

DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K. et al. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 77–82, 1991.

DOTA, K. F. D., CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. et al. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1–8, 2011.

DUARTE, S.; ROSALEN, P. L.; HAYACIBARA, M. F. et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, v.51, n.1, p.15–22, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH^{•1} et al. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

FERNANDES-SILVA, C. C. **Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim**. 2008. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, p.341–352, 2010.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G. 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. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006.

GAVIN, J. Microbiological process report – analytical microbiology – II. The diffusion methods. **Appl. Microbiol.**, v. 5, p. 25-33, 1957.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M., LOKENSGARD, J. R. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4⁺ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 158–163, 2005.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–83, 1979.

GONÇALVES, L. S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. **Mensagem Doce**, v. 87, n.1, p. 21–26, 2006.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.2, p. 276–284, 2006.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p. 159–160, 1990.

GRESSLER, L. T.; SILVA, A. S.; MACHADO, G. et al. Susceptibility of Trypanosoma evansi to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1314–1317, 2012.

GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; ŞEHİTOĞLU, M. H. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.

HEGAZI, A. G.; EL HADYB, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands, **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 395–402, 2002.

IDEMA, Instituto de Desenvolvimento sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. **Perfil do seu município**, Alto do Rodrigues 2008. Disponível em: <<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/idema/DOC/DOC000000000016662.PDF>> Acesso em: 10 fev 2015.

INOUE, H. T.; SOUSA, E. A.; ORSI, E. O. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 2, p. 65–69, 2007.

ÍTAVO, C. C. B. F.; MORAIS, M. G.; COSTA, C. et al. Características de carcaça, componentes corporais e rendimento de cortes de cordeiros confinados recebendo dieta com própolis ou monensina sódica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.5, p.898–905, 2009.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K. et al. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1278–81, 2001.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, p. 452–461, 2009.

KOLEVA, I.I., VAN BEEK, T. A, LINSSEN, J.P.H., et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis** v. 13, p. 8–17, 2002.

KIM, M. J.; KIM, C. S.; KIM, B. H. et al. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans *Streptococci* isolated from Korean. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 161–164, 2011.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235–40, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n.1, p. 329–339, 2004.

LIMA, G. **Estudo sobre mel, cera e própolis**. Brasília: Apex-Brasil, 2008, 20p.

LOPES, M. T. R. **Própolis: uma alternativa para diversificar a produção apícola**. EMBRAPA. 2009. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/propolis-uma-alternativa-para-diversificar-a-producao-apicola>>. Acesso em: 10 de out. 2012.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C. I.; HRNCIR, M. et al. **Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga**. 1. ed., Fortaleza, CE: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012, 99p.

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

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n.1, p. 83–99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529–536, 1996.

MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, R.; BORAWSKA, M. H.; FIEDOROWICZ, A. et al. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 50, p. 1–9, 2013.

MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.4, p. 982–990, 2012.

MAVRI, A.; ABRAMOVIČ, H.; POLAK, T. et al. Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v.9, p. 1545–1558, 2012.

MOUSE, H. A.; TILAOU, M.; JAAFARI, A. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 558–567, 2012.

NAVARRO-NAVARRO, M.; RUIZ-BUSTOS, P.; VALENCIA, D. et al. Antibacterial Activity of sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 150–158, 2013.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada – oitava edição**. v.23, n.1, 2003.

NIEVA-MORENO, M. I.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis of several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p. 109–114, 2000.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 524–529, 2009.

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, p. 433–438, 2012.

ODA, J. M. M.; FUJITA, T. C.; PITZ, A. F. et al. Propolis extract action in Leishmaniasis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 111–121, 2011.

ORSI, R. O. et al. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases**, v.11, n.2, p.109 –116, 2005.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.1, p. 2–7, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 2502–2506, 2002a.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. et al. Propolis produced in south Brazil, Argentine and Uruguay: Phytochemical evidence for the plant origin. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997–1003, 2002b.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 1100–1003, 2004.

PENG, L.; YANG, S.; CHENG, Y. J. et al. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 1533–1539, 2012.

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

PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. 2003, p. 3-73. In: LEAL, R. I.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**, Recife: Ed. Universidade da UFPE, 2003, 823p.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2363–2370, 2011.

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

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

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C. et al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 317–324, 2008.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Boletim O Mercado da Própolis**. 2014. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf>. Acesso em: 16 fev 2015.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y. et al. Antioxidative bio-availability of artemisinin C in Brazilian propolis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 424, p.181–8, 2004.

SHIMIZU, T.; TAKESHITA, Y.; TAKAMORI, Y. et al. Efficacy of brazilian propolis against Herpes Simplex Virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

SILVA, M. S. S.; CITÓ, A. M. G.; CHAVES, M. H. et al. Triterpenóides tipo cicloartano de Teresina – PI. **Química Nova**, v.28, n.5, p.801–804, 2005.

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p. 1842–1848, 2006.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 1-4, 2007.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p.1790–1795, 2012.

SOUSA, J. P.B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R. 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, n. 1, p. 85–93, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2006, 764p.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A. et al.. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 85–92, 2005.

TEIXEIRA E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. et al. In vitro evaluation of antiviral effect of bauer-7-en-3b-yl acetate, the major constituent of a sample of Brazilian propolis, against Alpha herpesviruses. **Boletim de Indústria Animal**, v.64, n.2, p.107–114, 2007.

TEIXEIRA E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307–315, 2010.

TEMİZ, A.; ŞENER, A.; ÖZKÖK TÜYLÜ, A. et al. Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 503–511, 2011.

TORRES, R. N. S.; LOPES, J. A. D.; MOITA NETO, J. M. et al. Constituintes voláteis da própolis piauiense. **Química Nova**, v.31, n.3, p. 479–485, 2008.

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

YONAR, M. E.; YONAR, S. M.; SILICI, S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 318–325, 2011.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. London, Blackwell Scientific Publications, 1994.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n.1, p. 99–105, 1998.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1996, 718 p.

APÊNDICE A

Tabela 14 – Plantas da Caatinga brasileira visitadas por abelhas.

Nome Científico	Nome Popular
Árvores	
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira
<i>Spondias tuberosa</i>	Umbuzeiro
<i>Copernicia prunifera</i>	Carnaubeira
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Pau-d'arco-roxo
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Pacoté
<i>Cordia oncocalyx</i>	Pau-branco
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Imburana
<i>Cynophalla flexuosa</i>	Feijão-bravo
<i>Crateva tapia</i>	Trapiá
<i>Combretum leprosum</i>	Mofumbo
<i>Cnidoscolus quercifolius</i>	Faveleira
<i>Jatropha mollissima</i>	Pinhão-bravo
<i>Croton sonderianus</i>	Marmeleiro
<i>Libidibia férrea</i>	Juazeiro
<i>Poincianella bracteosa</i>	Catingueira
<i>Senna macranthera</i>	São-joão
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Angico
<i>Pityrocarpa moniliformis</i>	Catanduva
<i>Mimosa arenosa</i>	Calumbi
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Sabiá
<i>Mimosa paraibana</i>	Cerrador
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Jurema-preta
<i>Senegalia polyphylla</i>	Espinheiro
<i>Amburana cearensis</i>	Cumaru
<i>Luetzelburgia auriculata</i>	Pau-mocó
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Juazeiro
Arbustos e subarbustos	
<i>Allamanda blanchetii</i>	Sete-patacas-roxa
<i>Varronia globosa</i>	Moleque-duro
<i>Varronia leucocephala</i>	Buquê-de-noiva
<i>Tarenaya spinosa</i>	Mussambê
<i>Cnidoscolus urens</i>	Urtiga
<i>Chamaecrista duckeana</i>	Palma-do-campo
<i>Senna uniflora</i>	Matapasto-cabeludo
<i>Senna occidentalis</i>	Fedegoso
<i>Senna trachypus</i>	Canafístula
<i>Mimosa invisa</i>	Calumbi-miúdo
<i>Solanum paniculatum</i>	Jurubeba
<i>Hyptis suaveolens</i>	Bamburral
<i>Sida cordifolia</i>	Malva-branca
<i>Sida galheirensis</i>	Ervão
<i>Triumfetta rhomboidea</i>	Carrapicho-de-bode
<i>Waltheria americana</i>	Malva-branca
<i>Waltheria bracteosa</i>	Malva
<i>Lantana camara</i>	Cambará

Herbáceas	
<i>Alternanthera tenella</i>	Quebra-panela
<i>Froelichia humboldtiana</i>	Ervão
<i>Stilpnopappus pratensis</i>	Sete-sangrias
<i>Euploca polyphyllum</i>	
<i>Commelina erecta</i>	Santa-Luzia
<i>Ipomoea asarifolia</i>	Salsa
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Jetirana
<i>Chamaecrista calycioides</i>	Palma-do-campo
<i>Chamaecrista pilosa</i>	Palma-do-campo
<i>Chamaecrista supplex</i>	Palma-do-campo
<i>Mimosa modesta</i>	Malícia
<i>Mimosa quadrivalvis</i>	Malícia
<i>Stylosanthes viscosa</i>	Melosa
<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	Amargosa
<i>Pavonia cancellata</i>	Corda-de-viola
<i>Portulaca oleracea</i>	Pega-pinto
<i>Oxalis divaricata</i>	Trevo
<i>Oxalis glaucescens</i>	Trevo
<i>Scoparia dulcis</i>	Vassourinha-de-botão
<i>Polygala violacea</i>	Beldroega
<i>Boerhavia diffusa</i>	
<i>Talinum triangulare</i>	Beldroega-graúda
<i>Borreria verticillata</i>	Cabeça-de-velho
<i>Diodella teres</i>	Mata-pasto
<i>Richardia grandiflora</i>	Asa-de-pato
<i>Turnera subulata</i>	Chanana
Trepadeiras	
<i>Ipomoea bahiensis</i>	Jetirana
<i>Ipomoea nil</i>	Corda-de-viola
<i>Jacquemontia montana</i>	
<i>Jacquemontia multiflora</i>	Jetirana-branca
<i>Merremia aegyptia</i>	Jetirana-de-mocó
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Feijão-de-porco
<i>Centrosema brasilianum</i>	Jequitirana
<i>Chaetocalyx scandens</i>	Rama-amarela
<i>Cardiospermum corindum</i>	Chocalho-de-vaqueiro

Relação de plantas extraída do Livro: **Guia de Plantas visitadas por abelhas na Caatinga**, autoria de Maia-Silva et al., 2012.