UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS VERDE DO SEMIÁRIDO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ORIGEM BOTÂNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

MOSSORÓ
2019

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS VERDE DO SEMIÁRIDO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ORIGEM BOTÂNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Dejair Message

Co-orientadora: Profª. Dra. Kátia Peres Gramacho

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F383p Ferreira, Joselena Mendonça.
PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS VERDE DO SEMIÁRIDO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ORIGEM BOTÂNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE / Joselena Mendonça Ferreira. - 2019.
114 f. : il.

Orientador: Dejair Message.
Coorientadora: Kátia Peres Gramacho.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2019.

1. Resina de abelha. 2. Mimosa tenuiflora. 3. Compostos fenólicos. 4. Apicultura do Semiárido. 5. Caatinga. I. Message, Dejair , orient. II. Gramacho, Kátia Peres, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC´s) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA

PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS VERDE DO SEMIÁRIDO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ORIGEM BOTÂNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus Mossoró, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção Animal

Defendida em: **16** / **05** / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dejair Message (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Antonio Salatino (USP)
Membro Examinador

Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Alexandre Paula Braga (UFERSA)
Membro Examinador

Profª. Dra. Maria Rociene Abrantes (UFERSA)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JOSELENA MENDONÇA FERREIRA nasceu em 04 de julho de 1991, na cidade de Natal, 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 Cientifica, atuando na área de Fisiologia e Ecologia Comportamental e bolsista na área de docência pela Secretaria de Estado da Educação e da Cultura (SEEC/RN), lecionando as disciplinas de Ciências e Biologia no Ensino Fundamental, Médio e na Educação para Jovens e Adultos (EJA). Após a graduação, atuou como estagiária voluntária no Centro Tecnológico de Apicultura e Meliponicultura do Rio Grande do Norte (CETAPIS), onde envolveu-se na pesquisa com abelhas africanizadas. Fez mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), desenvolvendo sua pesquisa no estudo de diferentes tipos de própolis produzidas na caatinga. Atualmente é aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), aonde desenvolve trabalhos com avaliação da qualidade e origem de produtos apícolas, trabalhando especificamente com própolis e geoprópolis de abelhas africanizadas e abelhas nativas, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Criador, Senhor e Rei. Por tudo o que é e por tudo o que fez por mim. Mesmo sendo quem sou, Ele me amou e se entregou para que eu pudesse ter vida em abundância. A minha admiração e gratidão ao Senhor serão eternas. Sou feliz por saber que poderei render-lhe graças por toda a eternidade.

Aos meus pais por todo apoio e cuidado. Sei que sou amada por eles e que, apesar das dificuldades, sempre fizeram o possível para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

A minha irmã Edilena, pelo apoio na caminhada e por todo amor, mesmo diante da distância inevitável durante todos esses anos. O amor que nos une não tem e nunca terá barreiras geográficas.

A minha tia querida Maria do Carmo, por estar comigo durante todos esses anos e por ter me acolhido de forma tão amorosa em seu lar.

Ao meu querido esposo Gabriel. Por todo companheirismo e apoio. Por ter tido firmeza e paciência, principalmente nos momentos de minha ausência. Obrigada, meu bem. O Senhor nos uniu no início da nossa caminhada acadêmica e espiritual, e nos fez crescer juntos. Glória a Deus pelas suas maravilhas.

Aos irmãos da Igreja Batista Nacional em Areia Branca. Todos eles contribuíram para que eu conseguisse superar as dificuldades e não desistisse do meu curso, principalmente nos momentos mais dolorosos. Agradeço especialmente ao Pastor Daniel Wagner, pelos conselhos amorosos, cheios de sabedoria e fé.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Dejair Message. De fato, eu sou privilegiada por Deus, pois o seu cuidado foi imenso em me dar não apenas um orientador, mas um orientador que me trata com um carinho de pai. Você é o meu maior exemplo de educador e pesquisador humilde. Ao ouvir relatos de muitos estudantes de pós-graduação, a minha atitude sempre é e sempre será de gratidão a Deus pela sua vida. Um verdadeiro presente que veio no mestrado e continuou comigo no doutorado. Meu muito obrigada!

A toda a equipe do NCTA (Núcleo de Capacitação Tecnológica em Apicultura) da UFERSA, pelo apoio e incentivo à minha pesquisa, em especial a coordenadora Prof.ª. Dra. Kátia Peres Gramacho por todo carinho, apoio e co-orientação, ao Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves e aos amigos Ricardo Gonçalves, Hérica Tertulino, Dayson Castilhos, Dayana Sombra, Nira Lopes, Leandro Alves da Silva, Felipe Marrocos e demais “abelhudos”, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino (USP), as pesquisadoras Dra. Giuseppina Negri (UNIFESP) e Dra. Caroline C. Fernandes-Silva, a Prof.ª Dra. Emília Cristina Pereira de Arruda (UFPE) e ao Prof. Dr. Ramiro Gustavo Valera Camacho (UERN). Obrigada pela contribuição de cada um neste trabalho. Nele está contido os resultados dos esforços de todos vocês.

Aos apicultores brasileiros, representados na pessoa de Aldifran Medeiros, pelo empenho e determinação em fazer desse ofício um verdadeiro sonho, com prazer e alegria. Vocês são a nossa inspiração.

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio acadêmico e financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Banca Examinadora por ter aceitado o nosso convite e estar disposta em contribuir para que este trabalho seja aperfeiçoado e renda bons frutos.

"Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários".

C. S. Lewis

RESUMO

PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS VERDE DO SEMIÁRIDO DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ORIGEM BOTÂNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

FERREIRA, Joselena Mendonça. **Própolis e geoprópolis verde do semiárido do Brasil: caracterização química, origem botânica e atividade antioxidante.** 2019. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2019.

Na região Nordeste do Brasil, estudos que objetivam identificar os compostos presentes nas própolis tem se expandido nos últimos anos. No entanto, até o presente momento, o conhecimento sobre própolis e geoprópolis da região de semiárido do Nordeste brasileiro é escasso. Para suprir essa necessidade, objetivou-se fazer uma investigação a respeito de um tipo de própolis e de geoprópolis, ambos de coloração verde, produzidos nessa região. Foram coletadas amostras de própolis e de geoprópolis no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Também foram coletados folíolos jovens e maduros de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), principal suspeita de ser a fonte botânica dessas amostras. As amostras de própolis, geoprópolis e folíolos foram submetidas a extração etanólica em Soxhlet por 6 horas. Extratos das amostras de própolis e geoprópolis foram utilizados para avaliação de parâmetros básicos para comercialização de própolis no Brasil. Posteriormente, os extratos de própolis, geoprópolis e folíolos seguiram para análise em HPLC-DAD-MS/MS, onde foram quantificados e identificados os seus respectivos compostos fenólicos. Por fim, as amostras passaram por dois testes para identificação da origem botânica: 1) Comparação de compostos químicos presentes nos extratos dos folíolos de *M. tenuiflora*, própolis e geoprópolis. 2) Comparação microscópica dos tecidos vegetais de *M. tenuiflora* com os encontrados nas amostras de própolis e geoprópolis. Na avaliação dos parâmetros básicos para comercialização, as amostras de própolis e geoprópolis obtiveram valores aceitáveis conforme a legislação vigente, apresentando alta atividade antioxidante. Estas possuíam níveis de flavonoides totais acima do comum para própolis brasileiras (117 e 98,5 g/kg^{-1}, própolis e geoprópolis, respectivamente). Foram encontrados 18 compostos fenólicos nos extratos etanólicos de folíolos de *M. tenuiflora* e da própolis, na sua maioria flavonóis e chalconas. Desses, dez foram encontrados no extrato de geoprópolis verde, além de outros 6 compostos distintos. Na análise microscópica foram encontrados folíolos de *M. tenuiflora,* tanto na

própolis como na geoprópolis. Também foi possível descrever algumas estruturas epidérmicas da planta e avaliar suas características particulares. Conclui-se que própolis e geoprópolis verdes do semiárido nordestino do Brasil possuem qualidade para comercialização, estando seus parâmetros dentro do indicado pela legislação, e que *M. tenuiflora* é a fonte botânica da própolis e geoprópolis verdes. Esse trabalho servirá como base para pesquisas futuras que visem a otimização da apicultura no semiárido brasileiro e preservação de espécies endêmicas importantes como *M. tenuiflora*.

Palavras-chave: Resina das abelhas. *Mimosa tenuiflora*. Compostos fenólicos. Apicultura do Semiárido. Caatinga.

ABSTRACT

GREEN PROPOLIS AND GEOPROPOLIS OF BRAZILIAN SEMIARID BIOME: CHEMICAL CHARACTERIZATION, BOTANICAL ORIGIN AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

FERREIRA, Joselena Mendonça. Green propolis and geopropolis of Brazilian semiarid biome: chemical characterization, botanical origin and antioxidant activity. 2019. 114 f. Thesis (PhD in Animal Science) – Post-graduation Program in Animal Science, Federal Rural Semi-Arid University (UFERSA), Mossoró - RN, Brazil, 2019.

Studies to identify compounds in propolis have been expanded in recent years in northeast Brazil. However, up to now knowledge about the description of propolis and geopropolis in the Brazilian semi-arid is scarce. The aim of this study was to investigate a type of propolis and a geopropolis, both in green color, produced in this region. Samples of propolis and geopropolis were collected in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Young and ripe shoot of jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) were also collected, as suspected to be the main botanical source of these samples. Propolis, geopropolis and shoot samples were submitted to ethanolic extraction in Soxhlet for 6 hours. Extracts of propolis and geopropolis samples were used to evaluate basic parameters for commercialization. In sequence, the extracts were analyzed in HPLC-DAD-MS/MS, for identification and quantification of their respective phenolic compounds. Finally, the samples underwent two tests to identify the botanical origin: 1) Comparison of chemical compounds in *M. tenuiflora* shoot, propolis and geopropolis extracts. 2) Microscopic comparison of *M. tenuiflora* plant tissues with those found in propolis and geopropolis samples. According to current legislation, propolis and geopropolis samples obtained acceptable evaluation for commercialization, presenting high antioxidant activity. The analysis showed above-normal total flavonoid levels for Brazilian propolis (117 and 98.5 g/kg, for propolis and geopropolis respectively). Eighteen phenolic compounds were found in the ethanolic extracts of *M. tenuiflora* shoot and propolis, mostly flavonols and chalcones. Ten of 18 were found in green geopropolis extract, plus 6 different compounds. In microscopic analysis several shoot of *M. tenuiflora* were found, both in propolis and in geopropolis. It was also possible to describe some epidermal structures of the plant and to evaluate some of its characteristics. This study concluded that green propolis and geopropolis of Caatinga semiarid biome are qualified for commercialization, with analytical

parameters according to indicated legislation, and *M. tenuiflora* is the botanical source of green propolis and geopropolis of this semiarid biome. This study will guide future researches aiming to optimize beekeeping in Caatinga Brazilian semiarid and protect important endemic plant species as *M. tenuiflora*.

Keywords: Resins of bees. *Mimosa tenuiflora*. Phenolic compounds. Semiarid beekeeping. Caatinga.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1 – Cromatogramas de HPLC de extratos etanólicos de ápices da parte aérea de "jurema-preta" [*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., Leguminosae, Mimosoideae] e amostras de própolis de duas localidades do Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil).....68

Capítulo III

Figura 1 – Cromatograma de HPLC de extratos etanólicos de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* (Meliponini) do meliponário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil), caracterizada por HPLC-DAD. Dígitos dos cromatogramas correspondem aos números vistos na Tabela 2, utilizado para indicar compostos caracterizados por HPLC-DAD-MS/MS. ….....83

Capítulo IV

Figura 1 – A e B. Vista frontal de folhas de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta). A. Aspecto geral do folíolo de *M. tenuiflora*. B. Detalhe de tricomas unicelulares tectores (setas) e estômatos paraciticos (círculo). Notar ainda tricoma glandular do tipo captado (Tg). C. Corte transversal do folíolo de *M. tenuiflora*. Notar epiderme contendo compostos fenólicos (Ed e Eb) e os tricomas tectores (Tt). Técnica: Inclusão em parafina. Coloração: Safranina e azul de Alcian (A, B e C) e teste com cloreto férrico (C). Estômatos paracíticos (Círculos); Tricoma glandular captado (Tg); Tricoma tector (Tt); Epiderme adaxial (Ed); Epiderme abaxial (Eb); Parênquima paliçádico (Pp); Parênquima lacunoso (Pl); Feixe vascular (Fv)..... 95

Figura 2 – Folíolos de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) encontrados em amostras dissociadas de própolis e geoprópolis verde do semiárido, nos municípios de Mossoró, Lajes e Alto do Rodrigues, RN, Brasil. A e B. Aspecto do folíolo de *M. tenuiflora* evidenciando o corte basal realizado pelas mandíbulas das abelhas, bem como seus tricomas tectores e glandulares. C. Detalhe da disposição dos tricomas unicelulares tectores (setas) na epiderme de *M. tenuiflora*. D e E. Detalhe dos estômatos paraciticos (círculos) da epiderme, tricomas glandulares captados (Tg) e tricomas unicelulares tectores (setas), idênticos ao da folha de *M. tenuiflora.* Técnica: Dissociação epidérmica. Estômatos paracíticos (círculos); Tricoma glandular captado (Tg); Tricoma tector (setas)..... 96

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 – Atividades de própolis contra diferentes tipos de organismos patogênicos e vírus humanos e animais. Registro de trabalhos publicados nos últimos 27 anos 26

Capítulo II

Tabela 1 – Parâmetros químicos (g kg^{-1}) de amostras de própolis verde de duas localidades do estado do Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil) e respectivos limites do RTIQP (Regulamento Técnico para fixação e Identificação e Qualidade de Própolis) 66

Tabela 2 – Atividade antioxidante (EC50, μg mL−1) de amostras de própolis verde provenientes de municípios do estado do Rio Grande do Norte e de quercetina, avaliados por dois métodos (DPPH e β-caroteno) 67

Tabela 3 – Distribuição de substâncias fenólicas em ápices de 'jurema-preta' e amostras de própolis de Afonso Bezerra (Af. Bez.) e Alto do Rodrigues (Alt. Rodr.), dois municípios do estado do Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil), caracterizados por análise HPLC-DAD-ESI-MS/MS ou comparação com padrão 69

Capítulo III

Tabela 1 – Parâmetros químicos (g kg^{-1}) e atividade de eliminação do radical DPPH (μg mL^{-1}) de uma amostra de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* de Mossoró (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil), comparado com valores médios de própolis de jurema-preta e valores-limite do Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis (RTIQP) 81

Tabela 2 – Distribuição dos constituintes dos extratos etanólicos da geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* (Meliponini) do meliponário da Universidade Federal Rural do Semiárido (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil), caracterizada pela análise HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Dados também são fornecidos sobre a presença/ausência dos constituintes na própolis de Apis mellifera da mesma área, derivada de ápices de jurema-preta (Mimosa tenuiflora, Leguminosae), segundo dados já publicados. 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPE	Éster fenil-etílico do ácido cafeico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Sistema de detecção que utiliza arranjos de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Dr	Doutor
EC_{50}	Do inglês: *median Effective Concentration*. Refere-se a quantidade antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%
ELC	Extrato livre de cera
FAA_{50}	Fixador contendo formaldeido, ácido acético glacial e álcool etílico 50% nas proporções 5:5:90
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
MS	Espectrômetro de massa
RN	Rio Grande do Norte
rpm	Rotação por minuto
RTIQP	Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis
UERN	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
USP	Universidade de São Paulo
UV	Espectro ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **17**

OBJETIVOS **20**

OBJETIVO GERAL 20

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

REFERÊNCIAS **21**

CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO **25**

ESTUDOS COM PRÓPOLIS 25

Própolis de abelhas *Apis mellifera* 27

Geoprópolis de abelhas sem ferrão 29

Própolis e geoprópolis do Brasil 31

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS, SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SEUS COMPOSTOS 34

ORIGEM BOTÂNICA DA PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS 38

Tipos de estudos realizados na identificação da origem botânica **39**

Caracterização química 40

Avaliação de estruturas anatômicas 42

REFERÊNCIAS **43**

CAPÍTULO II – NOVO TIPO DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ORIGEM BOTÂNICA **59**

CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PROVÁVEL ORIGEM BOTÂNICA **75**

CAPÍTULO IV – JUREMA-PRETA (*Mimosa tenuiflora*) COMO FONTE DE RESINA DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO **90**

APÊNDICE A – Artigo Primeiro: New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin **100**

APÊNDICE B – Artigo Segundo: Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin **109**

INTRODUÇÃO

Própolis é o termo denominado a uma mistura de resina vegetal e cera, produzida pelas abelhas. A extração da resina ocorre a partir da coleta de partes diversas das plantas (brotos, botões florais, cascas e exsudados resinosos), acrescida de cera da própria abelha e de secreções produzidas nas suas glândulas salivares. Depois de pronta para uso, as abelhas empregam esse material para fechar frestas na colmeia, fazer a assepsia das células do favo e embalsamar insetos invasores que ocasionalmente invadem seus ninhos (GHISALBERTI, 1979).

A composição química da própolis depende da vegetação da região onde é produzida, podendo variar também nas diferentes épocas do ano numa mesma região (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; SFORCIN et al., 2000). Além disso, outros fatores como a técnica de coleta, extração e metodologia de condução de ensaios, também podem ter influência sobre o maior ou menor grau de compostos fenólicos extraídos e atividade biológica (COTTICA et al., 2011; MACHADO, et al., 2016; PAPOTTI et al., 2010; TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007).

Nas últimas décadas, pesquisadores de todo o mundo têm despertado o interesse por este produto apícola e verificado que ele possui muitas propriedades, principalmente em relação as atividades biológicas contra agentes patogênicos humanos e, mais recentemente, no combate à células cancerígenas (FREIRES et al., 2016; MONZOTE-FIDALGO et al., 2011; MORA et al., 2019; PATEL et al., 2016; SHIMIZU et al., 2011).

Devido a abundância da flora nacional, ao longo dos anos, a própolis brasileira tornou-se uma fonte rica de informações, pela diversidade de compostos bioativos existentes em sua composição. As pesquisas com a própolis do Brasil geraram variadas informações que culminaram com o crescimento desta área produtiva na apicultura nacional (BASTOS et al., 2008; MENDONÇA et al., 2015; NEVES et al., 2016; SFORCIN; BANKOVA, 2011; TEIXEIRA et al., 2010).

Os estudos relacionados à própolis, produzida por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no Brasil, se iniciaram na década de 1980 (MOREIRA, 1986; SZEWCZAK; GODOY, 1984). Mais recentemente, também foram publicados trabalhos concernentes à

própolis de abelhas nativas (abelhas sem ferrão, Apidae: Meliponini) (CARDOZO et al., 2015; COELHO et al., 2018; SOUZA et al., 2013).

Quando acrescida de algum percentual de terra (barro), a própolis das abelhas nativas é conhecida como "geoprópolis". A maioria das abelhas nativas produz própolis misturada a partículas de solo, sendo, portanto, "geoprópolis" um termo comum dado a resina produzida por elas (ARAÚJO et al., 2010; CARDOZO et al., 2015; DUTRA et al., 2008; MACIEL et al., 2015; SILVA et al., 2016). Os trabalhos com ambas, própolis de abelhas africanizadas e geoprópolis de abelhas nativas do Brasil, têm trazido uma contribuição significativa, pois, a partir da avaliação de seus extratos, tem sido possível obter resultados positivos quanto as suas atividades biológicas e potencial terapêutico.

Diante da diversidade da flora nacional, até o presente momento já foi encontrada uma variedade considerável de tipos de própolis e geoprópolis brasileiras (CAMPOS et al., 2015; COELHO et al., 2018; DAUGSCH et al., 2008; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Levando-se em consideração características físico-químicas a aparência e coloração dos extratos e propriedades biológicas de amostras de própolis coletadas em diferentes regiões brasileiras, Park, Alencar e Aguiar (2002) classificaram as própolis em doze tipos, sendo cinco tipos de própolis na região sul (grupo 1, 2, 3, 4 e 5), seis grupos na região nordeste (grupo 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e um grupo na região sudeste (grupo 12). Mais recentemente, especificamente na região nordeste do Brasil, foi encontrado o 13º tipo, a própolis vermelha, nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco (DAUGSCH et al., 2008).

Os dois que se destacaram em termos produtivos, foram os conhecidos popularmente como própolis verde (de alecrim-do-campo) e própolis vermelha de mangue. Estas própolis são produzidas em regiões distintas do país, possuindo também origens botânicas distintas. A própolis verde provem de ápices vegetativos da *Baccharis dracunculifolia* (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; OLIVEIRA; BASTOS, 1998; TEIXEIRA et al., 2005), e a própolis vermelha é obtida a partir de exsudados resinosos da *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSCH et al., 2008).

Entretanto, os estudos sobre estes e outros tipos de própolis já conhecidos, em um país continental como o Brasil, não param por aí. Além das própolis verde e vermelha, outros tipos de própolis brasileiras já foram avaliados em alguns aspectos – composição química e atividades biológicas (COSTA et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2007; FERNANDES

JÚNIOR et al., 2006; FERREIRA et al., 2017). Esses estudos objetivaram contribuir com a obtenção de um panorama mais amplo sobre o potencial da própolis e suas características de interesse farmacológico no território nacional.

Mais precisamente na região Nordeste, alguns trabalhos foram realizados na tentativa de explorar mais os tipos de própolis produzidas nessa área geográfica do país. Em estados como Ceará, Bahia, Alagoas e Piauí as própolis produzidas já se tornaram conhecidas, graças às descrições quanto as suas características físico-químicas, caracterização química e atividades biológicas (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009; CASTRO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; FERREIRA et al., 2017; OLDONI et al., 2011; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; SILVA et al., 2008). Ainda que esses estudos preliminares tenham elucidado alguns aspectos, antes obscuros, relacionados à própolis nordestina, faz-se necessário continuação destas pesquisas, tanto para aprofundar o conhecimento já existente, quanto para avaliar outros novos tipos ainda não estudados.

Embora na região nordeste a própolis vermelha tenha se tornado destaque nos últimos anos, sua produção é registra apenas a zonas litorâneas, em ecossistemas de manguezal. Pouco se sabe a respeito dos tipos de própolis e geoprópolis produzidas em áreas de caatinga e nada foi publicado a respeito de suas fontes botânicas.

A região do semiárido, onde se encontra o bioma caatinga, está localizada em uma área denominada polígono das secas. Essa região tem sofrido com a seca e, durante séculos, foi classificada entre as piores do país em percentuais de pobreza (CROCITTI; VALLANCE, 2011). Portanto, estudos que tratam a respeito de estratégias produtivas para essa região são considerados urgentes, para dar melhores condições e alternativas, principalmente ao pequeno produtor rural. Esses resultados serão valiosos tanto do ponto de vista socioeconômico, quanto ecológico, buscando também incentivar a valorização e preservação da flora presente na caatinga (SILVA; PAZ, 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a própolis e a geoprópolis verde do semiárido do Brasil quanto à caracterização química, origem botânica e atividade biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever o perfil químico da própolis verde e da geoprópolis do semiárido potiguar, produzidas por *Apis mellifera* e *Scaptotrigona* aff. *depillis*;
- ✓ Avaliar sua atividade antioxidante;
- ✓ Investigar a origem botânica da própolis verde e da geoprópolis através métodos químicos e morfológicos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I. L. et al. Ácido canárico (3,4-Seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828–831, 2007.

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

ARAÚJO, M. J. A. M. et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580–587, 2010.

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

BASTOS, E. M. A. F. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 273–281, 2008.

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

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

CARDOZO, D. V. et al. Chemical variability of geopropolis from Jataí, Mandaçaia and Mandurí stingless bees. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457-2474, 2015.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

COELHO, G. R. et al. Antiviral activity of geopropolis extract from *Scaptotrigona* aff. *postica* against rubella virus. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 6, p. 91, 2018.

COSTA, A. S. et al. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus. S**érie Ciências Biológicas, v. 13, p. 1–7, 2013.

COTTICA, S. M. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929–935, 2011.

CROCITTI, J. J.; VALLANCE, M. M. **Brazil Today**: An encyclopedia of life in the Republic. Santa Bárbara: ABC-CLIO, 2011.

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

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 4, p. 557-562, 2008.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 2017.

FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 122–132, 2016.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

MACIEL, C. R. et al. Atividade antimicrobiana da geoprópolis da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias isoladas em leite de vacas mestiças leiteiras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 38-46, 2015.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil**. PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.

MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 357, 2015.

MONZOTE-FIDALGO, L. et al. Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. **Natural Product Communications**, v. 6, n.7, p. 973-976, 2011.

MORA, D. P. P. et al. The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 3, p. 591–601, 2019.

MOREIRA, T. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 12-19, 1986.

NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp**. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016.

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

OLIVEIRA, V. DEI C.; BASTOS, E. M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* dc. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta Botânica Brasilica**, v. 12, n. 3, p. 431–439, 1999.

PAPOTTI, G. et al. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 1610–1618, 2010.

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

PATEL, S. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 3, p. 245-268, 2016.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1–2, p. 243–249, 2000.

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

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

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.

SILVA, W. P.; LIMA, J. R.; PAZ, D. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

SOUZA, S. A. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1–5, 2013.

SZEWCZAK, E. H.; GODOY, G. F. Estudo comparativo entre a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à própolis e a antibióticos. **Apicultura no Brasil**, v. 3, n. 17, p. 28-29, 1984.

TEIXEIRA, É. W. et al. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85–92, 2005.

TEIXEIRA, É. W. 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.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis; a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

ESTUDOS COM PRÓPOLIS

O estudo da própolis tem se expandido nas últimas décadas a partir de diferentes vertentes: caracterização química padrão e efeitos biológicos (MEYER; ULRICH, 1956; MIRANDA et al., 2019; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; VELIKOVA et al., 2000a; WILSON et al., 2015), isolamento de determinadas substâncias químicas de interesse terapêutico (HERRERA-LÓPEZ et al., 2019; LI et al., 2010; TAZAWA et al., 2016; VEIGA et al., 2017), investigação de suas fontes vegetais (BANKOVA et al., 1999, 2016; DAUGSCH et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005); estudo do comportamento de coleta por abelhas (SANTOS, 1996; TEIXEIRA et al., 2005) e manejo para otimização da sua produção (INOUE et al., 2007).

Em se tratando de pesquisas biomédicas, a própolis tem sido estudada atualmente nas mais variadas áreas, com estudos que testam principalmente os seus efeitos contra microrganismos patogênicos. Dentro desse espectro, tem-se uma vasta gama de trabalhos que já comprovaram a sua atividade na ação antimicrobiana (Tabela 1). Um fator importante, que deve ser levado em consideração, é que estes estudos se utilizaram de mais de uma técnica de ensaios (in vitro e/ou in vivo), o que leva a uma validação ainda mais confiável da sua atividade antimicrobiana.

Esses trabalhos têm sido realizados a partir de extratos obtidos de própolis de diferentes localidades, algumas vezes com a verificação de variações sazonais nesta resina. Verificaram também que há diferença quantitativa e qualitativa dos diferentes componentes da própolis em diferentes localidades e épocas do ano (CASTRO et al., 2007; NUNES et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010; TEMIZ et al., 2011; VALENCIA et al., 2012)..

Uma outra área que vem se expandido nas pesquisas com extratos de própolis é aquelas que visam testar seus efeitos em várias linhagens de células cancerígenas (AWALE et al., 2008; BÚFALO; CANDEIAS; SFORCIN, 2009; FRIÓN-HERRERA et al., 2015; FROZZA et al., 2017; MOUSE et al., 2012; NANI et al., 2018; OLDONI et al., 2011; FROZZA et al., 2013; SZLISZKA et al., 2011). Outros trabalhos têm verificado a sua atividade antioxidante (HATANO et al., 2012; MAŠEK et al., 2018; MAVRI et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018; RIGHI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2010) e esses resultados têm obtido sucesso na comprovação do potencial da própolis na captura de radicais livres.

Tabela 1: Atividades de extratos de amostras de própolis contra diferentes tipos de organismos patogênicos humanos e animais. Registro de trabalhos publicados nos últimos 27 anos.

Antibacteriana	*Paenibacillus larvae* (BASTOS et al., 2008; MIHAI et al., 2012; WILSON et al., 2015)	*Staphylococcus aureus* (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018).	*Staphylococcus mutans* (ALENCAR et al., 2007; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012; CABRAL et al., 2012).	*Serratia* sp. (EL-BASSUONY, 2009).	*Pseudomonas* spp. (BISPO JUNIOR et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018).	*Escherichia coli* (BISPO JUNIOR et al., 2012; EL-BASSUONY, 2009).
	Salmonella spp.(BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012; ORSI et al., 2006).	*Bacillus cereus* (EL-BASSUONY, 2009).	*Streptococcus* spp.; *Actinomyces naeslundii* (CASTRO et al., 2009).	*Shigella flexneri; Proteus vulgaris; P. mirabilis* (BISPO JUNIOR et al., 2012).	*Charomyces cerevisae; Helicobacter pylori* (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012).	*Klebsiella pneumoniae* (TAHER, 2015)
Antifúngica	*Sporothrix schenckii* (SALOMÃO et al., 2008).	*Paracoccidioides brasiliensis* (SALOMÃO et al., 2008).	*Candida spp.*(DOTA et al., 2011; FREIRES et al., 2016; NEVES et al., 2016a).	*Penicillium italicum* (PENG et al., 2012; YANG et al., 2011).	*Malassezia pachydermatis* (CARDOSO et al., 2010)	*Alternaria alternata; Penicillium digitatum* (ÖZCAN, 1999).
	Trichophyton spp. (AGÜERO et al., 2010; KOC et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2009).	*Microsporum gypseum* (AGÜERO et al., 2010).	*Colletotrichum gloeosporioides* (MENESES; DURANGO; GARCÍA, 2009).	*Nosema ceranae* (MENDOZA et al., 2013; SUWANNAPONG; MAKSONG; BENBOW, 2011).	*Ascosphaera apis* (BARBARIĆ et al., 2011; WILSON et al., 2015).	*Botryodiplodia theobromae* (MENESES; DURANGO; GARCÍA, 2009)
Antiprotozoário	*Trypanosoma cruzi* (MONZOTE et al., 2012; REGUEIRA-NETO et al., 2018; SALOMÃO et al., 2008).	*Trypanosoma evansi* (GRESSLER et al., 2012).	*Leishmania* spp. (NINA et al., 2016; REGUEIRA-NETO et al., 2018; SANTANA et al., 2014).	*Plasmodium falciparum* (MONZOTE et al., 2012).	*Trichomonas vaginalis* (MONZOTE et al., 2012; SENA-LOPES et al., 2018).	*Blastocystis* spp. (MOKHTAR; EL-GAYAR; HABIB, 2016).
	Acanthamoeba castellanii (KARUSKY et al., 2015).	*Giardia lamblia* (ALDAY-PROVENCIO et al., 2015).	*Toxoplasma gondii* (SALOMÃO et al., 2011).	*Entamoeba histolytica* (ARDALAN; MUSHREF; AHMED, 2011).	*Crytosporidium parvum* (EL-AZIZ et al., 2014).	Protozoários ruminais (MORSY et al., 2014).
Antiviral	HSV-1; VSV(AMOROS et al., 1992).	H5N1(KUJUMGIEV et al., 1999).	HIV-1 (GEKKER et al., 2005).	HSV-1 (SHIMIZU et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2007).	FCV, CAV-2 e BVDV (CUETO et al., 2011).	H1N1 (Influenza A) (KAI et al., 2014; URUSHISAKI et al., 2011).
	H7N9 (KUJUMGIEV et al., 1999).	BVDV (CUETO et al., 2011).	CAV-2 (CUETO et al., 2011).	NDV (KONG et al., 2006).	PRV (BURQUEZ et al., 2015).	IBDV (KONG et al., 2006)

Outros estudos com própolis em áreas diversas, embora menos abrangentes, também foram realizados recentemente, como: o uso em vacinas (EL ASHRY; AHMAD, 2012), ação hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 2001), atividade cardioprotetora (DALEPRANE; ABDALLA, 2013), imunossupressora (AL-HARIRI, 2019; YONAR; MIŞE YONAR; SILICI, 2011) cicatrizante de dermatofitoses (ÇAM et al., 2009) e de úlcera gástrica aguda (BARROS et al., 2008); anti-inflamatória e redutora de peso (MIRANDA et al., 2019).

Própolis de abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* são insetos sociais que localizam fontes vegetais aonde quer que estejam para produção de própolis e não se limitam a uma região específica. Prova disso são os estudos realizados com própolis desta espécie em várias partes do mundo (Taiwan: CHEN et al. 2004; Turquia: ARSLAN et al., 2012 França: AMOROS et al. 1992; Croácia: BARBARIĆ et al. 2011; Egito: EL-BASSUONY 2009; EUA: WILSON et al., 2015; México: LI et al. 2010; Brasil: RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; Bolívia: NINA et al. 2016).

A própolis tem sua importância nas colônias de abelhas por ser um recurso multifuncional, sendo este um material que pode servir tanto na proteção, quanto no isolamento e reparo das colônias. Assim, ela pode permitir tanto a assepsia da colônia, agindo contra microrganismos no seu interior, como também funcionar como uma espécie de "cola" para a colmeia, podendo fixar suas partes móveis e fechar frestas (GHISALBERTI, 1979).

Vários tipos de própolis produzidos por *A. mellifera* já foram descobertos e estudados. No entanto, o conjunto de estratégias que as abelhas utilizam para desfrutarem o potencial das plantas propolinígeras (plantas que fornecem material às abelhas para produção de própolis) de uma dada região, até o presente momento foi pouco desvendado (MEYER; ULRICH, 1956; OLIVEIRA; BASTOS, 1998; SANTOS, 1996; TEIXEIRA et al., 2005).

Algumas observações comportamentais na coleta de própolis dependentes de fatores climáticos já foram descritas, como, por exemplo, o fato de que as abelhas *A. mellifera* possuem preferência para coleta desse material em horários mais quentes do dia (MEYER; ULRICH, 1956; SANTOS, 1996). Na Europa, Crane (1990) verificou que a fonte de resina adquirida para sua fabricação só estaria disponível em temperaturas acima de 18ºC. Esse fator pode estar relacionado com a volatilização de alguns componentes presentes nas resinas, com consequente detecção pelas abelhas e com o favorecimento de uma melhor maleabilidade desse material quando se encontra em temperaturas mais altas.

Outro estudo comportamental, que ajudou a elucidar alguns fatores importantes de coleta e produção de própolis por abelhas africanizadas no Brasil (*Apis mellifera* L.), foi o realizado por Santos (1996). Em seu trabalho ele construiu um sistema de alvado (entrada da colmeia) adaptado para o monitoramento de abelhas operárias coletoras de própolis. Foi avaliado através desse sistema o padrão e os efeitos do forrageamento de própolis por abelhas a partir do monitoramento das colônias. Assim, esse autor pode identificar que a proporção de abelhas campeiras destinadas a coletar própolis na colmeia é pouco representativa, com média de 1,02%, quando comparada aquelas destinadas a forrageamento de pólen e outros materiais (36,20 e 62,78% respectivamente).

Estudos como estes ajudaram na compreensão de fatores ambientais na coleta de própolis, bem como fatores organizacionais (divisão de tarefas dentre as operárias) relacionados ao comportamento de forrageamento desse material nas plantas e seu transporte para dentro das colmeias. Sabe-se que, ao coletar a própolis e depositá-la em suas corbículas, a abelha operária volta para o seu ninho e, com ajuda de operárias auxiliares, consegue se desprender da massa de resina. Posteriormente, as operárias ajudantes manipulam esse material e o depositam dentro da colmeia (WINSTON, 2003).

Quando se trata de produção de própolis na espécie *A. mellifera*, as raças (subespécies) europeias, juntamente com as abelhas africanizadas (poli-híbrido resultante do cruzamento entre abelhas europeias e africana), são atualmente as mais utilizadas na produção de própolis mundial. As raças europeias mais conhecidas que tem sido destinadas para esse fim são: *A. mellifera mellifera* (abelha alemã), *A. mellifera ligustica* (italiana), *A. mellifera carnica* (abelha carnica) e *A. mellifera caucasica* (abelha caucasiana) (ARSLAN et al., 2012; ATTALLA; OWAYSS; MOHANNY, 2007; BERTRAMS; KUNZ; MÜLLER, 2013). No entanto, a hibridização entre as raças tem ocorrido em várias partes do mundo e, atualmente, identificar os tipos de própolis desta forma tem sido cada vez mais difícil (WINSTON, 2003).

Devido a essa dificuldade, poucos estudos comparando possíveis variações de preferências por fontes vegetais entre raças de *A. mellifera* foram realizados até o presente momento. Estes indicam que provavelmente a localização das diferentes raças e a disponibilidade de material vegetal sejam fatores de maior relevância na escolha de fontes de própolis por abelhas desta espécie (SILICI et al., 2005; SILICI; KUTLUCA, 2005). O mesmo ocorre para a coleta de pólen, indicando que a variação da atividade de forrageamento entre as raças não são significativas quando se encontram em mesma área de pastagem (KÖPPLER; VORWOHL; KOENIGER, 2007).

Ainda quanto aos resultados de hibridização entre as raças de *Apis mellifera*, um exemplo que deve ser levado em consideração é o poli-híbrido conhecido como abelha africanizada (*Apis mellifera* L.). Essa abelha foi gerada no Brasil a partir de um cruzamento entre raças de abelhas europeias e africana (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera scutellata*). Apesar de ter adquirido características um tanto quando desfavoráveis para a sua criação racional, típicas da abelha africana (*A. mellifera scutellata*), como altas taxas de enxameação e defensibilidade, a abelha africanizada ganhou destaque nas Américas devido a sua alta produtividade de mel e própolis, e serviço de polinização eficiente (GONÇALVES, 2001).

Devido à produção de mel por essas abelhas, atualmente o Brasil é considerado o nono maior exportador mundial desse produto, numa média de aproximadamente 42 mil toneladas anuais produzidas em 3.879 municípios brasileiros, sendo as regiões sul e nordeste as que mais se destacaram nos últimos anos (IBGE, 2018). Nas últimas décadas os seus produtos, juntamente com seu serviço de polinização, têm sido objeto de diversos estudos no Brasil e no mundo (ARRUDA et al., 2017; FROZZA et al., 2017; KIELISZEK et al., 2018; KIMOTO et al., 1998; LONDONO OR et al., 2010; SOUTHWICK; SOUTHWICK, 1992; VERGARA; BADANO, 2009).

Os estudos com amostras de própolis de abelhas da espécie *Apis mellifera* têm sido os mais abrangentes em todo o mundo. Embora esta espécie seja nativa da região da África, se estendendo até o norte da Europa e Escandinávia meridional, posteriormente expandiu-se por quase todo o globo. As atividades farmacológicas das própolis coletas por essa espécie são diversas. Dentre elas, as que mais se destacam são as atividades antioxidantes (BARUD et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2018), antimicrobianas (HEGAZI et al., 2012; POPOVA et al., 2013), hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 2001; BATATUNDE et al., 2015; MOUNIEB et al., 2017) e anticâncer (BEGNINI et al., 2014; FROZZA et al., 2017; WATANABE et al., 2011).

Geoprópolis de abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão da Tribo Meliponini são abelhas sociais que vivem em ninhos permanentes e de arquitetura peculiar. Esses ninhos são construídos com áreas específicas para a postura de crias (em formato de cacho ou de discos horizontais de cera), e para o armazenamento de alimento (em formato de potes) (HEARD, 1999; MICHENER, 1974). A

geoprópolis é um produto elaborado por essas abelhas. É semelhante à própolis de abelhas *A. mellifera*, uma vez que ambos possuem matéria-prima análoga (conteúdo vegetal e cera de abelha). Entretanto, além de cera e resina vegetal, a geoprópolis também possui conteúdo variável de material de solo e/ou barro. Outros materiais também podem ser acrescentados à geoprópolis, como flores, folhas e sementes (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Assim como na própolis de abelhas do gênero *Apis*, a geoprópolis também é usada para fechar frestas e manter a assepsia do ninho. Foi relatado que algumas espécies de abelhas sem ferrão manipulam esse material com pouco ou nenhum conteúdo de solos, sendo este descrito, por vezes, como "própolis", simplesmente (LAVINAS et al., 2018; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Em uma recente revisão sobre composição química das própolis e geoprópolis brasileiras de abelhas sem ferrão, esses dois tipos de resinas foram discriminados de acordo com as espécies de abelhas envolvidas nos diferentes estudos. Sendo geoprópolis o termo usado para a resina produzida principalmente por abelhas do gênero Melipona e própolis para a resina produzida por abelhas de outros gêneros como *Frieseomelitta sp.*, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes* (LAVINAS et al., 2018).

Apesar disso, ainda há controvérsias quanto a terminologia desse produto de abelhas sem ferrão, pois trabalhos recentes que tratam desse material descrevem-no utilizando os dois termos. Por vezes essa divergência ocorre até mesmo quando se trata da mesma espécie de abelha produtora (ARAÚJO et al., 2010, 2011; COELHO et al., 2015, 2018). Em *Scaptotrigona postica*, por exemplo, enquanto Coelho et al. (2015, 2018), utilizam o termo "geoprópolis", Araújo et al. (2010, 2011), usam o termo "própolis" para a resina coletada por esta espécie.

Embora esse dissenso ocorra principalmente com espécies de abelhas sem ferrão que aparentemente agregam pouco ou nenhum conteúdo de solo/barro ao manipular a resina (CAMPOS et al., 2015; GASTAUER; CAMPOS; SAN,TOS et al., 2009), algumas vezes o termo "própolis" também tem sido usado para designar o material coletado por meliponídeos que agregam quantidade considerável de solo em sua composição (BANKOVA et al., 1998a; CAMPOS et al., 2014; VELIKOVA et al., 2000b).

Como ainda existe certa discordância quanto a terminologia e, tendo em vista que a maioria das abelhas sem ferrão agregam outros conteúdos extras à sua própolis (SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017), neste trabalho optou-se por utilizar o termo "própolis" para designar aquela oriunda de abelhas *Apis mellifera* e o termo "geoprópolis" para designar

aquela oriunda de abelhas sem ferrão, independente do conteúdo variável de solo que esta última possa ter.

Quanto as atividades biológicas das geoprópolis, os trabalhos são mais escassos quando comparado a própolis de *Apis mellifera*. Estes têm buscando avaliar, principalmente, as ações antioxidantes e antimicrobianas (LAVINAS et al., 2018; SANPA et al., 2015). Outros tratam de atividades imunomoduladora (SULAEMAN et al., 2019), anticâncer, associada ou não a agentes terapêuticos convencionais (BARTOLOMEU et al., 2016; CINEGAGLIA et al., 2013), cicatrizante de feridas (SILVA et al., 2016) e antinociceptiva (FRANCHIN et al., 2012).

Própolis e geoprópolis do Brasil

A investigação quanto aos tipos de atividades biológicas de própolis e geoprópolis brasileiras tem sido o foco de maior interesse entre pesquisadores e criadores de abelhas que trabalham com a sua produção no país. No Brasil, esse panorama tem sido intensificado de forma crescente nas últimas décadas, principalmente quando se refere a própolis de abelhas africanizadas. Isso se deu sobretudo após o isolamento de compostos bioativos de amostras produzidas em seu território (CARDOZO et al., 2015; KIMOTO et al., 1998; MATSUNO, 1995; OLIVEIRA et al., 2013; SZLISZKA et al., 2012) e da descoberta da origem botânica destas (BANKOVA et al., 1999; FERREIRA et al., 2017a; OLIVEIRA; BASTOS, 1998).

A partir desses dados, apicultores e meliponicultores puderam ter duas informações básicas para o investimento na atividade: Se a própolis ou geoprópolis que coletavam era apropriada para a comercialização (avaliação de composição química e atividade biológica) e onde colocar seus ninhos racionais para uma melhor produção (a sua origem botânica).

No entanto, antes destas pesquisas iniciarem no Brasil, na década de 1980, essa resina das abelhas era considerada como algo descartável dentre os produtos da colmeia (MOREIRA, 1986; SZEWCZAK, E. H.; GODOY, 1984). Ela dificultava o manejo do ninho devido à sua utilização pelas abelhas para vedar frestas entre as diferentes partes da colmeia (tampa, melgueira, ninho), fazendo com que estas ficassem firmemente unidas umas às outras (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010). Os apicultores não entendiam para que exatamente essa resina servia. Inicialmente, acreditavam que era apenas uma espécie de “cola das abelhas” e, então, era continuamente descartada. De acordo com Simone-Finstrom e Spivak (2010), isso foi algo que provavelmente fez com que inicialmente os apicultores

brasileiros selecionassem linhagens de abelhas *Apis mellifera* que produzissem pouca própolis em suas colônias. Felizmente essa perspectiva mudou ao se descobrir o valor da resina.

Grande parte da mudança de pensamento quanto a importância da própolis se deu a partir de pesquisas anteriores que possibilitaram a abertura do comércio para esse material, no território nacional e no exterior. O primeiro tipo de própolis que ganhou destaque no comércio do país foi a própolis verde provinda de ápices vegetativos do alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*), ou "própolis de alecrim"(BANKOVA et al., 1999; SHIMIZU et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2005). Esse material ganhou espaço significativo no mercado nos últimos anos e tem sido atualmente uma boa fonte de renda, agregada a venda do mel nas regiões sul e sudeste do país (RESENDE; BORGES, 2008).

Posteriormente, um outro tipo de própolis brasileira, da região nordeste, também ganhou a atenção de apicultores e pesquisadores do país. Logo se popularizou e foi denominada "própolis vermelha brasileira" (DAUGSCH et al., 2006). Esta própolis é proveniente de regiões de manguezais, e possui como a principal fonte botânica a planta *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida popularmente como rabo-de-bugio (DAUGSCH et al., 2008).

Diferentemente da própolis verde, a própolis vermelha é produzida a partir de exsudados resinosos liberados dos ramos da planta *D. ecastophyllum*, quando estes são submetidos à estresse ambiental. Esse estresse pode ser natural, através de insetos sugadores de seiva, ou artificial, através de orifícios induzidos pelos apicultores. Desta forma, quando a seiva da planta fica exposta, as abelhas fazem a coleta desse material, transportando-o para seus ninhos em suas corbículas (DAUGSCH et al., 2008; PRADO, 1996).

Devido descobertas recentes sobre suas propriedades farmacológicas e suas fontes vegetais, esses dois tipos de própolis brasileiras, verde e vermelha, produzidas por abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), atualmente são os mais estudados do país (DAUGSCH et al., 2008; FERREIRA; NEGRI, 2019; KUJUMGIEV et al., 1999; MARIANO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013; PAULINO et al., 2008; SENA-LOPES et al., 2018; SZLISZKA et al., 2012). Além desses, estudos com outros tipos de própolis e geoprópolis do Brasil também surgiram, com resultados promissores na Bahia (COSTA et al., 2013; CUNHA et al., 2013), Santa Catarina (MARASCHIN et al., 2016) e Paraná (TAZAWA et al., 2016).

Em geral esses estudos objetivaram contribuir com a obtenção de um panorama mais amplo sobre o potencial de plantas apícolas no território brasileiro. Consequentemente, esses resultados refletiram em uma maior produção da própolis nas diferentes regiões do país (RESENDE; BORGES, 2008; SEBRAE 2014). Com o crescimento da produção, em 2008 o

Brasil atingiu o primeiro lugar na produção mundial de própolis (RESENDE; BORGES, 2008) e, em 2014, foi considerado o terceiro maior produtor mundial (SEBRAE, 2014). A valorização da própolis brasileira no mercado também foi significativa, chegando a R$ 500,00/kg (SEBRAE, 2014). Ainda em 2014, o Japão se destacou na importação da própolis brasileira, com um percentual de 92% no consumo total de própolis *in natura* importada do Brasil. Entre os estados produtores, Minas Gerais alcança o primeiro lugar, produzindo própolis verde, sendo responsável por 70% da produção de todo o país (SEBRAE, 2014).

Quanto a produção e identificação das geoprópolis brasileiras, os dados da literatura são mais recentes e em menor número. Apesar de terem iniciado no final da década de 1990 (BANKOVA et al., 1998a), os trabalhos com geoprópolis nativas só passaram a ter uma maior produção na última década (ARAÚJO et al., 2016; CUNHA et al., 2013; DUTRA et al., 2014).

Um dos primeiros trabalhos com geoprópolis brasileira fez a caracterização química por CG-MS de três tipos diferentes de resinas, produzidas pelas espécies *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* (BANKOVA et al., 1998a). Esse estudo sugeriu que as amostras de geoprópolis poderiam ter fontes botânicas diferentes devido a variação nas suas respectivas composições que se mostraram muito complexas. Estas amostras também apresentaram perfis químicos bastante distintos daqueles encontrados em amostras brasileiras de extratos de própolis de *A. mellifera*.

Posteriormente, Velikova et al. (2000a), fizeram um estudo amplo, de caracterização química e atividade biológica de geoprópolis brasileiras. Desta vez, foram coletadas amostras produzidas por 12 espécies diferentes de abelhas, sendo estas classificadas de acordo com os tipos predominantes de compostos que possuíam. Algumas apresentaram atividade significativa contra o *Staphylococcus aureus*, atividade esta que foi relacionada as altas concentrações de ácidos diterpênicos nas amostras.

Na região Nordeste, alguns trabalhos foram realizados na tentativa de explorar mais os tipos de própolis e geoprópolis produzidos nessa área geográfica do país. Em estados como Ceará, Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte e Piauí as própolis produzidas já se tornaram conhecidas, graças às descobertas de seus componentes químicos e atividades biológicas (ALBUQUERQUE et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; BISPO JUNIOR et al., 2012; CABRAL et al., 2009; CASTRO et al., 2009; FERREIRA et al., 2017b; FRANCHIN et al., 2012; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; SILVA et al., 2016).

No estado do Rio Grande do Norte (RN), o estudo da própolis de abelhas africanizadas e da geoprópolis de abelhas nativas ainda é escasso. Até o presente momento, poucos

trabalhos trazem informações a respeito da própolis desse estado. Os trabalhos de Orsi et al. (2005) e Fernandes Júnior et al. (2006), trazem informações básicas sobre a atividade antibacteriana da própolis potiguar. Dantas et al. (2010) descreveram a possibilidade de um sistema de microemulsão para a sua aplicação tópica da própolis do Rio Grande do Norte (RN). Por fim, Silva et al. (2016) avaliaram as atividades antimicrobianas e cicatrizante de geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta*. Os trabalhos originários do presente estudo foram, portanto, pioneiros na investigação quanto a caracterização química e fonte botânica da própolis e geoprópolis do RN.

O estado do RN está localizado em uma área da região historicamente conhecida como o "polígono da seca". A vegetação nessa localidade é exclusiva de caatinga, caracterizada anualmente por longos períodos de seca severa (CROCITTI; VALLANCE, 2012). Por esta razão, encontrar recursos naturais capazes de aliviar as consequências trazidas pela seca à população no nordeste brasileiro é uma prioridade na investigação científica, especialmente, com estudos que tratem sobre a atividade biológica de produtos dessa região.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS, SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SEUS COMPOSTOS

Para separação e identificação de compostos químicos de própolis e geoprópolis, uma técnica comumente utilizada é a cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico que tem por objetivo a separação de componentes de uma mistura. Essa técnica é realizada através da distribuição de elementos de uma mistura em duas fases (móvel e estacionária), que estão em contato íntimo uma com a outra (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Um dos tipos mais bem estudados de cromatografias é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou HPLC (do inglês, *high-performance liquid chromatography*). A CLAE, por utilizar colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com o auxílio de bombas de alta pressão, garante uma vazão mais rápida da fase móvel, permitindo assim uma alta velocidade na separação dos componentes da mistura (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Desta forma, na CLAE é possível separar misturas que contenham muitos compostos similares. Podendo realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A alta resolução e detectabilidade da CLAE devem-se ao desenvolvimento de seus detectores, que podem ser diversos e específicos de acordo com o que se quer identificar nas diferentes misturas estudadas (detectores por arranjos de diodos, infravermelho, espectrômetro de massas, eletroquímicos etc.). Em suma, são os detectores que medem, de forma contínua, a propriedade físico-química da amostra e envia os sinais para registro. Esse sinal, por sua vez, é diretamente proporcional à concentração do componente da amostra (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Nas pesquisas com própolis o uso da CLAE tem sido realizado a fim de analisar e identificar com precisão seus componentes majoritários (KUMAZAWA, SHIGENORI; YONEDA et al., 2003; VOLPI; BERGONZINI, 2006). Esse método tem sido preferido entre as técnicas cromatográficas existentes (BANKOVA et al., 2016). A identificação desses compostos tem trazido informações novas quanto à caracterização química e quantificação em diferentes tipos de extratos (FALCÃO et al., 2013).

No estudo realizado por Kumazawa, Shigenori e Yoneda (2003), por exemplo, as análises em CLAE foram realizadas para confirmar a origem botânica da própolis de alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*). Acrescido a esse procedimento, os autores fizeram observações e gravações prévias da coleta por abelhas operárias diretamente na planta.

Volpi e Bergonzini (2006), fizeram a separação qualitativa e quantitativa para determinação de componentes polifenólicos de própolis da Argentina, Itália e Espanha, com o objetivo de verificar padrões nos extratos para possíveis preparações farmacêuticas de qualidade. Por sua vez, Maciejewicz et al. (2002), identificaram 37 tipos de componentes presentes em própolis de *Populus nigra*, através de CLAE, juntamente com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).

Inúmeros outros trabalhos vem se valendo dessa técnica desde então para caracterização química de amostras de própolis e geoprópolis (BARBARIĆ et al., 2011; FERNANDES-SILVA et al., 2013; MARASCHIN et al., 2016; NEGRI; SALATINO; SALATINO, 2003; TAZAWA et al., 2016). E por meio desta técnica e de outras similares, tem-se atualmente, mais de 300 compostos químicos já identificados na própolis (MARCUCCI, 1996). Entre estes compostos, os flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres derivados são apontados como sendo as substâncias responsáveis pelas suas atividades biológicas (BANKOVA, 2005; SALATINO et al. 2011).

Estudos em diferentes tipos de própolis deram grandes contribuições na identificação dos componentes químicos (ALENCAR et al., 2007; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PARK et al., 2004; SILVA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005).

Park, Alencar e Aguiar (2002), classificaram as própolis brasileiras produzidas em diferentes estados em 12 tipos, de acordo com análise físico-química, características organolépticas, atividades antioxidante e antimicrobiana das 500 amostras que foram identificadas. Estas foram produzidas nas regiões sul, nordeste e sudeste do país. Após isto, outras pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de analisar mais profundamente as características dos componentes destas própolis brasileiras (ALENCAR et al., 2007; CASTRO et al., 2007)

A própolis verde produzida nas regiões sul e sudeste ganhou atenção especial e destaque devido as diferentes atividades biológicas que passaram a ser estudadas, a descoberta da sua origem botânica e isolamento de seus constituintes (TEIXEIRA et al., 2005; KUMAZAWA; SHIGENORI; YONEDA, 2003).

Na própolis verde brasileira, o ácido fenólico Artepillin C foi descoberto e caracterizado como um marcador químico. Isso possibilitou que estudos mais abrangentes fossem desenvolvidos e houvesse garantia de exportação dessa própolis através de análise química, como parte da sua padronização para comercialização (KIMOTO et al., 1998; MATSUNO et al., 1995; PAULINO et al., 2008). Além disso, outros compostos da própolis verde brasileira também foram identificados como os compostos prenilados e não prenilados, fenilpropanóides, terpenóides, etc. (TEIXEIRA et al., 2005).

Seis anos mais tarde, após a identificação dos 12 tipos de própolis brasileiras, Daugsch et al. (2006), estudaram uma amostra de própolis vermelha de manguezal, verificaram seus constituintes químicos e sua origem botânica (*Dalbergia ecastophyllum*) e a classificaram como própolis tipo 13. Em um estudo posterior 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 (DAUGSCH et al., 2008).

Numa comparação entre os constituintes da própolis vermelha com a sua atividade antibacteriana em *S. aureus*, Daugsch et al. (2006), 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., 2008). Posteriormente, Silva et al. (2008), identificaram nesta própolis os isoflavonóides 3-hidroxi-8,9-dimethoxypterocarpan e medicarpina, sendo esta classe de compostos comumente encontrada na família Leguminosae.

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

(CHAN; CHEUNG; SZE, 2013; ENDO et al., 2018; FROZZA et al., 2013, 2017; KARUSKY et al., 2015; LI et al., 2010; MACHADO et al., 2016; NANI et al., 2018). Um exemplo recente foi o estudo de Endo et al. (2018), que, com base em seus resultados, sugeriram que o composto bioativo Artepillin C, da própolis verde brasileira, quando combinado com inibidores da autofagia celular pode ser um novo tratamento complementar alternativo para o câncer de próstata.

Já os trabalhos que tratam sobre a química da geoprópolis são bem mais escassos, quando comparados àqueles com própolis de abelhas *A. mellifera*. A maioria destes trabalhos sobre a química da geoprópolis produzida por abelhas nativas descrevem resultados a respeito da geoprópolis produzida por espécies do gênero Melipona. Foi visto que a geoprópolis de *Melipona fasciculata* possui diferentes tipos de compostos como carboidratos, triterpenos, ácido anacárdico, alquilresorcinóis e álcoois de açúcar (ARAÚJO et al., 2015). Compostos fenólicos e os ácidos gálico e elágico foram caracterizados na geoprópolis desta abelha da região oeste do estado do Maranhão (DUTRA et al., 2008, 2014).

A abelha *M. subnitida*, do estado do Paraíba, produz geoprópolis contendo fenilpropanóides e flavonoides (SOUZA et al., 2013), enquanto que *M. scutellaris* do estado da Bahia, produz tipos distintos de geoprópolis, podendo conter benzofenonas (CUNHA et al., 2013) ou ésteres de ácido cinâmico e cumarinas como constituintes principais (CUNHA et al., 2015). Os compostos fenólicos e terpenos foram relatados em geoprópolis de *M. orbignyi* do Mato Grosso do Sul (CAMPOS et al., 2014) e glicosídeos flavonoides foram detectados em amostras de geoprópolis de *M. interrupta* e *M. seminigra*, ambas da região amazônica (SILVA et al., 2013). Flavonoides, terpenos e polifenóis foram considerados os constituintes majoritários da geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* em Santa Catarina, sendo o principal componente desta o ácido isocupressico (diterpeno) (TORRES et al., 2018).

Já quanto aos demais tipos de geoprópolis, produzidos por abelhas nativas de outros gêneros, o número de trabalhos publicados é ainda menor. Amostras de geoprópolis de *Trigona spinipes* possuem em sua composição triterpenos e ácido magniferólico (FREITAS et al., 2008); de *Scaptotrigona postica* do Maranhão contém ácidos cafeoilquínicos, flavonóides-C-glicosídeos e o alcalóide pirrolizidina derivado de retronecina (COELHO et al., 2015).

ORIGEM BOTÂNICA DA PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

Em paralelo aos estudos das atividades biológicas e composição química da própolis e geoprópolis, o estudo das plantas que atraem as abelhas para a coleta de resinas tem se tornado, nos últimos anos, um referencial no âmbito da pesquisa nessa área. Isso tem revelado a diversidade mundial de fontes vegetais utilizadas, mesmo que as abelhas possuam certas limitações quanto a extração de sua matéria-prima (SALATINO et al., 2011; SALATINO; SALATINO, 2017).

Identificar as fontes das quais as abelhas coletam resina para produção de própolis é uma tarefa complexa e valiosa. Isso porque existem fatores que podem interferir na coleta de material pelas abelhas e, consequentemente, na composição da própolis. As abelhas podem, por exemplo, coletar matéria prima para produzir própolis a partir de mais de uma fonte botânica (BANKOVA, 2005; DAUGSCH et al., 2008). Elas também podem ter preferência por determinado tipo de planta local, mesmo que este não esteja em abundância, como é o caso da própolis provinda de *Populus nigra* em regiões temperadas (BANKOVA, 2005).

Fatores ambientais como mudanças na temperatura também podem interferir na coleta da própolis. Por exemplo, algumas resinas só ficam disponíveis para as abelhas a partir de uma temperatura específica, quando estará maleável para manipulação. As mandíbulas das abelhas são delicadas e não conseguem cortar ou manipular materiais mais rígidos, por isso há uma certa restrição quanto ao tipo de matéria-prima que podem ou não utilizar para este fim (SALATINO; SALATINO, 2017).

Até o presente momento, embora já se tenha conhecimento da origem botânica de alguns tipos de própolis brasileiras (SANTOS et al. 1996; OLIVEIRA; BASTOS, 1998; TEIXEIRA et al., 2005 SALATINO et al., 2011), uma estimativa da abundância das espécies de plantas propolinífera existentes nas diferentes regiões do Brasil ainda não foi realizada. O conhecimento obtido sobre os grupos de plantas propolinífera brasileiras é relevante para as pesquisas nacionais com própolis, pois, com base nos resultados de estudos anteriores, é possível identificar novas substâncias terapêuticas presentes em seus extratos (KIMOTO et al., 1998; ALBUQUERQUE et al., 2007). Assim, a ampliação do conhecimento destas plantas poderá auxiliar nas diretrizes nacionais quanto à preservação da flora apícola e contribuir para o avanço da apicultura e da meliponicultura no país.

Tipos de estudos realizados na identificação da origem botânica

Em geral, os estudos que trataram sobre a origem da própolis são divididos em duas principais vertentes, aqueles que se propuseram a avaliar as estruturas anatômicas que são encontradas na amostra e aqueles que se utilizaram da caracterização química.

Além desses, existem outros tipos de estudos utilizando ferramentas diversificadas para avaliação da origem botânica da própolis. Uma ferramenta complementar usada para a confirmação é a observação da coleta realizada pelas abelhas *in loco* através de registros fotográficos ou vídeos (KUMAZAWA, SHIGENORI; YONEDA et al., 2003). Outros estudos utilizaram extração de DNA seguida da técnica de amplificação por PCR para fazer a identificação da origem botânica (JAIN et al., 2014a, 2014b). No entanto, os dois primeiros métodos genéricos (avaliação de estruturas anatômicas e os de caracterização química) são considerados os mais convencionais e possuem um maior número de publicações.

Em geral, esses estudos levam em consideração a coleta de material vegetal *in loco* (em plantas suspeitas), coleta de própolis no ninho de abelhas e, em alguns casos, a coleta de material nas corbículas de abelhas recém-chegadas na colmeia (PICCINELLI et al., 2011; SILICI; ÜNLÜ; VARDAR-ÜNLÜ, 2007; SILVA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005).

Bankova et al. (2016), realizaram um trabalho minucioso descrevendo as diferentes etapas para se obter uma amostra de própolis de qualidade, bem como diferentes métodos utilizados para estudar própolis – como coletar própolis, métodos de extração de compostos químicos, identificação de fontes vegetais e atividades biológicas. Quanto a coleta da amostra, os autores também relataram que esta pode ser coletada das três diferentes fontes, de forma individual: da(s) planta(s) suspeita(s), das corbículas das abelhas e de dentro da colmeia. Também foi especificado os métodos que podem ser empregados nessas coletas.

Em estudos de caracterização química, a análise é feita por comparação dos perfis químicos encontrados em amostras de própolis com aqueles encontrados nos tecidos vegetais ou exsudados resinosos das plantas. Compostos fenólicos são caracterizados e uma avaliação comparativa é realizada. Muitas vezes pode-se chegar a uma conclusão a partir dessa análise. Especialmente em caso de amostras de própolis em que as abelhas coletam apenas exsudados resinosos, esse tipo de estudo foi bastante explorado e demonstrou resultados conclusivos (BANKOVA et al., 2016; DAUGSCH et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993).

Os estudos de avaliação anatômica das estruturas de plantas que estejam presentes na própolis são um pouco mais restritos, quando comparados aqueles de caracterização química. Provavelmente porque as abelhas não coletam apenas ápices vegetativos, mas também podem incluir exsudados resinosos na sua composição. No entanto, esses trabalhos são considerados uma ferramenta útil para avaliar minuciosamente quais são exatamente as estruturas que as abelhas têm selecionado e coletado para a produção da própolis (NEVES et al., 2016b; OLIVEIRA; BASTOS, 1998; SENA-LOPES et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2005).

Trabalhos com descrições anatômicas de tecidos vegetais encontrados em própolis também podem ser úteis para confirmação da fonte, principalmente em casos onde existem mais de uma espécie de planta sendo coletada, mas não se sabe exatamente quais. Ou ainda quando as espécies suspeitas são de mesmo gênero ou mesma família. Nesses casos, apenas dados de composição química podem ser insuficientes, já que plantas filogeneticamente próximas podem produzir os mesmos compostos (TEIXEIRA et al., 2010).

Outro fator que pode colaborar para que essa técnica seja mais confiável na descrição das fontes, é o fato de que as plantas podem variar o conteúdo de suas secreções químicas em diferentes épocas do ano. Se coletadas em dias diferentes, amostras de própolis e tecidos de plantas suspeitas podem apresentar perfis químicos diferentes e, consequentemente, alguma dúvida quanto a confiabilidade dos resultados poderá surgir (BANKOVA et al., 1998b; TEIXEIRA et al., 2010). Assim, em todos esses casos a anatomia pode ser uma ferramenta crucial para se obter um resultado mais fidedigno na pesquisa.

Caracterização química

Tem sido crescente o número de estudos que se dedicaram a avaliar a origem da própolis através de uma análise comparativa da química de plantas suspeitas (CUNHA et al., 2013; FALCÃO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2005). No entanto, em detrimento da falta de material vegetal coletado, muitos não chegaram a uma análise conclusiva, fazendo apenas sugestões a respeito das possíveis fontes (TRUSHEVA et al., 2011). Por isso, para que seja facilitada a descoberta da fonte vegetal, é importante a coleta de ambos (BANKOVA et al., 2016).

Essas pesquisas têm sido dedicadas principalmente a avaliarem o perfil de compostos fenólicos e terpenóides presentes nas amostras de própolis e compará-los com aqueles de plantas suspeitas. Além disso, também é importante utilizar-se de ferramentas extras, como é o caso da quimiotaxonomia, método de classificação biológica baseado em semelhanças na estrutura de certos compostos entre os organismos que estão sendo classificados (MACIEL et

al., 2002). Esse método tem contribuído significativamente para dar pistas quanto a possíveis grupos de plantas que podem produzir determinados metabólitos secundários particulares e tem sido útil para as descobertas em estudos com própolis nos últimos anos (SALATINO et al., 2011).

Os compostos encontrados em amostras de própolis e geoprópolis são diversificados, estão disponíveis para a abelha apenas em determinadas estruturas específicas da planta e seus níveis tendem a diminuírem consideravelmente ao longo do amadurecimento dessas estruturas (PARK et al., 2004).

Por exemplo, Park et al. (2004), coletaram brotos foliares, folhas não expandidas e folhas expandidas da planta *Baccharis dracunculifolia*, origem botânica da própolis verde brasileira, para avaliarem o conteúdo de compostos fenólicos presentes. Os autores constataram que o conteúdo de compostos fenólicos dos brotos foliares era significativamente maior quando comparado aqueles presentes em folhas não expandidas. Também verificaram que, em folhas expandidas, os níveis dos compostos estavam severamente comprometidos ou tinham desaparecido completamente. Um dos compostos que não foi encontrado nas folhas expandidas foi o ácido fenólico Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), considerado o marcador químico desta própolis.

Alguns desses estudos têm se preocupado também quanto a identificação e isolamento de marcadores químicos que caracterizem a origem botânica de uma determinada própolis ou geoprópolis. Isso não só traz vantagens para estudos subsequentes quanto a possíveis atividades biológicas do composto isolado, como também auxilia na tarefa de padronização de um determinado tipo de própolis de uma região (BANKOVA, 2005; LÓPEZ et al., 2014). Em geral essa descoberta ocorre juntamente com estudos que visam identificar a fonte da própolis ou geoprópolis.

Assim ocorreu na descoberta do Artepillin C, marcador da própolis verde brasileira provinda de *B. dracunculifolia* (BARTH et al., 2013); do CAPE (éster fenetil ácido caféico, do inglês, *caffeic acid phenethyl ester*), marcador das própolis típica das regiões temperadas (BANSKOTA et al., 2001); e da Formononetina (7 Hidroxi, 4'metoxi Isoflavona) e Biochanina A, marcadores da própolis vermelha brasileira, provinda de *D. ecastaphyllum* (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009).

Já os estudos sobre a origem botânica da geoprópolis a partir dessa técnica são escassos. Há evidências de que os frutos de *Corymbia torelliana* (Myrtaceae) fornecem resina para a produção de geoprópolis pela *Tetragonula carbonaria* australiana (Meliponini), devido à grande semelhança nos perfis químicos de flavanonas entre os dois (MASSARO et al.,

2014). Nenhuma evidência quanto a origem botânica de geoprópolis brasileira foi relatada antes do trabalho produzido a partir do presente estudo.

Avaliação de estruturas anatômicas

Estudar a origem botânica da própolis através de um trabalho anatômico é uma tarefa complexa. Antes de tudo é preciso fazer uma coleta adequada do material vegetal e, no caso de amostras de própolis, é preciso separar os tecidos vegetais do seu conteúdo de cera. Em estudos com geoprópolis, também é preciso retirar todo o conteúdo variável de material de solo encontrado na amostra (BANKOVA et al., 2016).

Como as abelhas podem coletar material de diferentes órgãos da planta, o primeiro passo é tentar identificar de que região da planta ela está coletando o material. Se é da região onde se encontram os brotos foliares, florais ou de regiões onde podem ser extraídos exsudados resinosos (DAUGSCH et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005). Nem sempre é possível ver a abelha coletando *in loco*, mas, de acordo com o material que é verificado dentro da colmeia ou nos coletores de própolis, o pesquisador poderá ter uma noção de que material a abelha pode estar coletando para este fim. Em geral, quando abelhas coletam brotos foliares, pedaços desses tecidos são evidenciados nas amostras coletadas. Nesse caso, coleta-se o material cuidadosamente para gerar resultados confiáveis (BANKOVA et al., 2016).

Para trabalhos em que o pesquisador não tem nenhum indício de quais plantas podem ser fonte de própolis, o indicado é que o pesquisador avalie em um guia de plantas resinosas quais as plantas da região que se encontram com essa característica e faça uma busca prévia na área para identificá-las. Após isso, é necessário realizar a coleta das plantas individuais. O ideal é que se colete de 4 a 6 brotos/folhas resinosas por planta ou, se for o caso, a resina fresca de pelo menos três plantas da mesma espécie, armazenando esse material em frascos EPA âmbar (BANKOVA et al., 2016).

No Brasil, alguns trabalhos utilizaram essa técnica, sendo estes estudos considerados pioneiros. Oliveira e Bastos (1998) fizeram um estudo da anatomia da folha de *Baccharis dracunculifolia* em várias fases de seu desenvolvimento para auxiliar na identificação dessas estruturas quando encontradas em própolis verde da região sudeste do país. Assim, esses autores fizeram a caracterização de estruturas secretoras e tricomas foliares para auxiliar na identificação de origem botânica para este tipo específico de própolis brasileira.

Posteriormente, Teixeira et al. (2005), fizeram uma caracterização de estruturas presentes em ápices vegetativos de *B. dracunculifolia* encontradas em amostras de própolis. Estas foram analisadas microscopicamente pela técnica de inclusão em metacrilato, sendo

identificados vários ductos resiníferos conspícuos da planta, tricomas glandulares e não glandulares, sendo todos correspondentes a folhas de plantas jovens. Quanto ao uso dessa técnica para análise microscópica de geoprópolis, até o presente momento não há estudos que descrevem essa técnica.

REFERÊNCIAS

AGÜERO, M. B. et al. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* cav. (Caesalpinieae) exudates: Phytochemical characterization and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 194–201, 2010.

AL-HARIRI, M. Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 26, n. 1, p. 57-60, 2019.

ALBUQUERQUE, I. L. et al. Ácido canárico (3,4-*seco* derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828–831, 2007.

ALDAY-PROVENCIO, S. et al. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* Trophozoites. **Planta Medica**, v. 81, n. 9, p. 742–747, 2015.

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

AMOROS, M. et al. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, n. 3, p. 231–240, 1992.

ARAÚJO, K. S. S. et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 61–68, 2016.

ARAÚJO, M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12, 2015.

ARAÚJO, M. J. A. M. et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580–587, 2010.

ARAÚJO, M. J. A. M. et al. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona* aff. *postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Natural Product Research**, v. 25, n. 11, p. 1037–1046, 2011.

ARDALAN, N. M.; MUSHREF, E.; AHMED, Z. A. Effects of propolis extract on growth of *Entamoeba histolytica* (trophozoites) in vitro. **Journal of Biotechnology Research Center**, v. 5, n. 1, p. 11–17, 2011.

ARRUDA, V. A. S. et al. Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 3, p. 231–238, 2017.

ARSLAN, S. et al. Antimicrobial activity of poplar propolis on mutans streptococci and caries development in rats. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, n. 1, p. 65–73, 2012.

ATTALLA, K. M.; OWAYSS, A. A; MOHANNY, K. M. Antibacterial activities of bee venom, propolis, and royal jelly produced by three honey bee, *Apis mellifera* L., hybrids reared in the same environmental conditions. **Annals Of Agricultural Science Moshtohor Journal**, v. 45, n. 1, p. 895–902, 2007.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181–189, 2008.

BANKOVA, V. et al. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift fur Naturforschung** - Section C Journal of Biosciences, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1998a.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361–367, 1998b.

BANKOVA, V. et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift fur Naturforschung** - Section C Journal of Biosciences, v. 54, n. 5–6, p. 401–405, 1999.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.

BANKOVA, V. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1–49, 2016.

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

BARBARIĆ, M. et al. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 772–778, 2011.

BARROS, M. P. DE et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 372–377, 2008.

BARTH, O. M. et al. Botanical origin and Artepillin-C content of Brazilian propolis samples. **Grana**, v. 52, n. 2, p. 129–135, 2013.

BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, n. 1, p. 48–55, 2016.

BARUD, H. D. S. et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

BASTOS, E. M. A. F. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 273–281, 2008.

BATATUNDE, I. R. et al. Hepatoprotective and pancreatoprotective properties of the ethanolic extract of Nigerian propolis. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 102, 2015.

BEGNINI, K. R. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

BERTRAMS, J.; KUNZ, N.; MÜLLER, M. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, n. 1, p. 143–153, 2013.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil Antimicrobial. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 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 and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1351–1358, 2012.

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.

BURQUEZ, M. et al. Protective effect of a mexican propolis on MDBK cells exposed to Aujeszky's disease virus (*Pseudorabies virus*). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, n. 4, p. 106–111, 2015.

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

CABRAL, I. S. R. 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. et al. Treatment of dermatophytosis in young cattle with propolis and whitfield's ointment. **Veterinary Record**, v. 165, n. 1, p. 57–58, 2009.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374–380, 2014.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 1–11, 2015.

CARDOSO, R. L. et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n.3-4, p. 432-434, 2010.

CARDOZO, D. V. et al. Chemical variability of geopropolis from jataí, mandaçaia and manduri stingless bees. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457–2474, 2015.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

CASTRO, M. L. et al. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5332–5335, 2009.

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

CHEN, C. N. 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.

CINEGAGLIA, N. C. et al. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1–6, 2013.

COELHO, G. R. et al. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

COELHO, G. R. et al. Antiviral activity of geopropolis extract from *Scaptotrigona* aff. *postica* against rubella virus. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 6, p. 91-106, 2018.

COSTA, A. S. et al. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1–7, 2013.

CRANE, E. Bees and beekeeping: science, practice and world resources. Oxford: Heinemann Newnes, 1990, 640p.

CROCITTI, J. J.; VALLANCE, M. M. **Brazil Today: An encyclopedia of life in the Republic**. Santa Bárbara: ABC-CLIO, 2011.

CUETO, A. P. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarréia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1800–1806, 2011.

CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 23, 2013.

CUNHA, M. G. et al. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, n. 03, p. 190–194, 2015.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

DANTAS, T. N. C. et al. Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 368–375, 2010.

DAUGSCH, A. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v.1, n. 89, p. 1–6, 2006.

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

DOTA, K. F. D. et al. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557–562, 2008.

DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.

EL-AZIZ, T. H. A. et al. Effect of Egyptian propolis on lipid profile and oxidative status in comparison with nitazoxanide in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium* spp . **Global Veterinaria**, v. 13, n. 1, p. 17–27, 2014.

EL-BASSUONY, A. A. New prenilated compound from Egyptian propolis with antimicrobial activity. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 37, n. 1, p. 85–90, 2009.

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

ENDO, S. et al. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 1, p. 437–443, 2018.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 805–812, 2013.

FERNANDES-SILVA, C. C. et al. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 237–240, 2013.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294–297, 2006.

FERREIRA, J. M. et al. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–6, 2017a.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 2017b.

FERREIRA, J. M.; NEGRI, G. Composição química e atividade biológica das própolis brasileiras: verde e vermelha. **ACTA Apícola Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 06–15, 2019.

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

FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 122–132, 2016.

FREITAS, M. O. et al. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532–535, 2008.

FRIÓN-HERRERA, Y. et al. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1448–1456, out. 2015.

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

FROZZA, C. O. S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 951–963, 2017.

GASTAUER, M.; CAMPOS, L. A. O.; WITTMANN, D. Handling sticky resin by stingless bees (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 2, p. 234–240, 2011.

GEKKER, G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 158–163, 2005.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979.

GONÇALVES, L. S. Africanized Honey Bee: Introduction, Adaptation and Benefits. In: **APIMONDIA CONGRESS**, 37, 2001, Durban. Anais [...]. Durban: South Africa, 2001. p. 1–3.

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

HATANO, A. et al. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577–584, 2012.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 183–206, 1999.

HEGAZI, A. G. et al. Inhibitory effect of Algerian propolis on viral, microbial infection and LDL peroxidation with correlation to its chemical composition. **Mellifera**, v. 12, n. 23, p. 2–11, 2012.

HERRERA-LÓPEZ, M. G. et al. Botanical origin of triterpenoids from Yucatecan propolis. **Phytochemistry Letters**, v. 29, p. 25–29, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [2018]. **Produção da Pecuária Municipal 2017**. ISSN: 0101-4234. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso em: 18 abr. 2019.

INOUE, H. T. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta Propolis production by different methods of collection. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 2, p. 65–69, 2007.

JAIN, S. et al. Botanical origin of the Brazilian red propolis: A new approach using DNA analysis. **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 79–85, 2014a.

JAIN, S. A. et al. Extraction and amplification of DNA from Brazilian Red propolis. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1–5, 2014b.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Eds.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273–398.

KAI, H. et al. In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 214–223, 2014.

KARUSKY, C. D. M. et al. Atividade amebicida e citotóxica do extrato aquoso de própolis verde contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 3, p. 283–294, 2015.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 170–180, 2018.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 6, p. 506–515, 1998.

KOC, A. N. et al. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 205–210, 2005.

KONG, X. F. et al. Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v. 85, n. 12, p. 2169–2175, 2006.

KÖPPLER, K.; VORWOHL, G.; KOENIGER, N. Comparison of pollen spectra collected by four different subspecies of the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 38, n. 4, p. 341–353, 2007.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.

KUMAZAWA, SHIGENORI; YONEDA, M. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740–742, 2003.

LAVINAS, F. C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 126, n. 1, p. 1–11, 2018.

LI, F. et al. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 4, p. 623–627, 2010.

LONDONO OR, A. et al. Antibacterial comparative study between extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 8, p. 1250–1254, 2010.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.

MACHADO, C. S. et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

MACIEJEWICZ, W. et al. GC-MS and HPLC analysis of phenolic acids extracted from propolis and from *Populus nigra* bud exudate. **Chemia Analityczna**, v. 47, n. 1, p. 21–30, 2002.

MACIEL, et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 5, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARASCHIN, M. et al. Metabolic profiling and classification of propolis samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with machine learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 2016.

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

MARIANO, L. N. B. et al. Brazilian green propolis hydroalcoholic extract reduces colon damages caused by dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1283–1292, 2018.

MAŠEK, T. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of different extracts of Poplar type propolis. **Croatica Chemica Acta**, v. 91, n. 1, p. 81–88, 2018.

MASSARO, C. F. et al. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). **Fitoterapia**, v. 95, p. 247–257, jun. 2014.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 50, n. 1–2, p. 93–97, 1995.

MAVRI, A. et al. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 8, p. 1545–1558, 2012.

MENDOZA, Y. et al. Forestaciones de eucalyptus grandis control of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) colonies in eucalyptus grandis plantations. **Agrociencia Uruguay**, v. 17, p. 108–113, 2013.

MENESES, E. A.; DURANGO, D. L.; GARCÍA, C. M. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2011–2017, 2009.

MEYER, W.; ULRICH, W. "Propolis Bees" and Their Activities. **Bee World**, v. 37, n. 2, p. 25–36, 1956.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard University Press, 1974, 404p.

MIHAI, C. M. et al. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 110, n. 1, p. 68–72, 2012.

MIRANDA, M. B. et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 610–620, 2019.

MOKHTAR, A. B.; EL-GAYAR, E. K.; HABIB, E. S. In vitro anti-protozoal activity of propolis extract and cysteine proteases inhibitor (phenyl vinyl sulfone) on *Blastocystis* species. **The Egyptian Society of Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 261–272, 2016.

MONZOTE, L. et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 978–984, 2012.

MOREIRA, T. Composição química do própolis: vitaminas e aminoácidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 12–19, 1986.

MORSY, A. S. et al. Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2014, n.1, p. 1–10, 2014.

MOUNIEB, F. et al. Propolis alleviates concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and inhibition of reactive oxygen species. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 11, p. 1105–1115, 2017.

MOUSE, H. A. et al. Anticancer properties of Moroccan propolis extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 558–567, 2012.

NANI, B. D. et al. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 750–754, 2018.

NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 246–254, 2018.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 4, p. 53–56, 2003.

NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016a.

NEVES, M. V. M. et al. Leaf and stem anatomy and histochemistry of *Dalbergia ecastaphyllum*. **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 6, p. 557–564, 2016b.

NINA, N. et al. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 290–296, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997, 446p.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 B, p. 524–529, 2009.

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

OLIVEIRA, P. F. D. et al. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of Artepillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1098–1103, 2013.

OLIVEIRA, V. D. C.; BASTOS, E. M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 3, p. 431–439, 1998.

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

ÖZCAN, M. Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**, v. 50, p. 395–398, 1999.

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

PARK, Y. K. et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 296–301, 2008.

PENG, L. 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.

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

POPOVA, M. et al. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 158, 2013.

PRADO, A. Seleção de sítios de oviposição por um inseto sugador em resposta à herbivoria e à idade da planta hospedeira. **Análise**, v. 5, n. 50, p. 1–4, 1996.

REGUEIRA-NETO, M. DA S. et al. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 215–221, 2018.

RESENDE, R.B.; BORGES, L. F. H. Exportações março/2008. **Coordenação Nacional da Rede APIS –** UAGRO – Sebrae Nacional, 2008.

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

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

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

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. Why do honeybees exploit so few plant species as propolis sources? **MOJ Food Processing & Technology**, v. 4, n. 5, p. 2–5, 2017.

SALOMÃO, K. 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.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian green propolis: effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 1, p. 1–11, 2011.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, 2017.

SANPA, S. et al. Antibacterial Compounds from Propolis of *Tetragonula laeviceps* and *Tetrigona melanoleuca* (Hymenoptera: Apidae) from Thailand. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126886, 18 maio 2015.

SANTANA, L. C. L. R. et al. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 5, p. 340–343, 4 mar. 2014.

SANTOS, C. G. DOS et al. Caracterização sazonal de acúmulos isolados de própolis em colônias de *Plebeia emerina* (Hymenoptera, Apidae) no sul do Brasil. **Iheringia**. **Série Zoologia**, v. 99, n. 2, p. 200–203, 2009.

SANTOS, Marco Antônio dos. **Estudo do forrageamento de própolis em abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L. 1758**. 1996. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1996.

SEBRAE. **O mercado da própolis**. Disponível em: http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf. Acesso em: jan. 2017.

SENA-LOPES, Â. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0191797, 2018.

SHIMIZU, T. 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.

SILICI, S. et al. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 39–44, 2005.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 69–73, 2005.

SILICI, S.; ÜNLÜ, M.; VARDAR-ÜNLÜ, G. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1797–1803, 2007.

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

SILVA, E. C. C. DA et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013.

SILVA, J. B. et al. Quantification of phenols, total flavonoids and pharmacological activities of geopropolis *Plebeia* aff. *flavocincta* of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2016.

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

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

SOUTHWICK, E. E.; SOUTHWICK, L. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the united states. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 3, p. 621–633, 1992.

SOUZA, S. A. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1–5, 2013.

SULAEMAN, A. et al. *Trigona* propolis and its potency for health and healing process. In: WATSON, R.; SINGH, R.; TAKAHASHI, T. (Eds.). **The Role of Functional Food Security in Global Health.** 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 425–448.

SUWANNAPONG, G.; MAKSONG, S.; BENBOW, M. E. Stingless bee propolis effects on experimental infection of *Apis florea* with *Nosema ceranae*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 818–825, 2011.

SZEWCZAK, E. H.; GODOY, G. F. Estudo comparativo entre a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* a própolis e antibióticos. **Apicultura no Brasil**, v. 3, n. 17, p. 28–29, 1984.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 4, p. 941-953, 2011.

SZLISZKA, E. et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 3, p. 818–828, 2012.

TAHER, N. M. Synergistic effect of propolis extract and antibiotics on multi-resist *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from wound. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 5, n. 17, p. 1–7, 2015.

TAZAWA, S. et al. Discovery of a novel diterpene in brown propolis from the state of Parana, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2, p. 201–205, 2016.

TEIXEIRA, É. W. et al. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85–92, 2005.

TEIXEIRA, É. W. 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 herpes viruses. **Boletim de Indústria Animal**, v. 64, n. 2, p. 107–114, 2007.

TEIXEIRA, É. W. 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.

TEMIZ, 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, n. 4, p. 503–511, 2011.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191–196, 1993.

TORRES, A. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, p. 1–10, 2018.

TRUSHEVA, B. et al. Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. **Natural Product Research**, v. 25, n. 6, p. 606–613, 2011.

URUSHISAKI, T. et al. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in Brazilian green propolis water extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

VALENCIA, D. et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 645–651, 2012.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, 2017.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 2000a.

VELIKOVA, M. et al. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693–696, 2000b.

VERGARA, C. H.; BADANO, E. I. Pollinator diversity increases fruit production in Mexican coffee plantations: The importance of rustic management systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 129, n. 1-3, p. 117-123, 2009.

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

WATANABE, M. A. E. et al. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378–1386, 2011.

WILSON, M. B. et al. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 124, p. 44–50, 2015.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Livraria e Editora Magister LTDA., 2003, 276p.

YANG, S. Z. et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 210–215, 2011.

YONAR, M. E.; MIŞE YONAR, S.; SILICI, S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 2, p. 318–325, 2011.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, 2009.

CAPÍTULO II – NOVO TIPO DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ORIGEM BOTÂNICA

New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin

Artigo publicado em língua inglesa no periódico

JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE

Em fevereiro de 2017

Escrito de acordo com as normas técnicas do periódico

Publicação na íntegra no APÊNDICE A

Novo tipo de própolis do nordeste do Brasil: composição química, atividade antioxidante e origem botânica

Joselena Mendonça Ferreira; Caroline Cristina Fernandes-Silva; Antonio Salatino; Giuseppina Negria e Dejair Message

RESUMO

Introdução: A própolis é um produto com uma atividade biológica bem diversificada. Ela possui uma composição complexa que varia de acordo com sua fonte botânica. No presente trabalho, objetivou-se determinar o perfil químico de duas amostras de própolis verde provenientes de duas localizações distintas do estado do Rio Grande do Norte (RN), região nordeste do Brasil.

Resultados: As características dos padrões químicos da própolis do RN são similares ou superiores às própolis verdes brasileiras, da região sudeste, comercializadas internacionalmente. Os extratos das duas amostras apresentaram alta atividade antioxidante, correspondendo a 10% (município de Afonso Bezerra) e a 13% (município de Alto do Rodrigues) da atividade da quercetina pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e de 15% (em ambos os locais) pelo método de descoloração de β-caroteno. A Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE/DAD) acoplada a espectrometria de massa em conjunto com ionização por eletropulverização (ESI-MS/MS), revelou que a maioria dos constituintes da própolis do RN são flavonoides, principalmente flavonóis e chalconas. A análise por CLAE/DAD revelou uma grande semelhança entre o perfil químico da própolis e ápices vegetativos da planta "jurema-preta" (*Mimosa tenuiflora*, Leguminosae, Mimosoideae).

Coclusão: Os ápices foliares da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) são provavelmente a fonte da resina obtida para produção da própolis do RN. As características químicas e propriedades antioxidantes da própolis do RN fornecem perspectivas promissoras para a introdução desse tipo de própolis no mercado apícola.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto feito pelas abelhas com uma composição complexa. A cera de abelha e as resinas vegetais são os principais constituintes desse produto. Outros materiais normalmente encontrados na própolis são pólen, açúcares e aminoácidos. O uso medicinal da própolis remonta ao antigo Egito, Grécia e Roma. Nas últimas décadas, o interesse na própolis aumentou consideravelmente em várias partes do mundo como resultado da publicação de

evidências científicas reveladoras que constataram que a própolis tem diversas propriedades benéficas para a saúde, incluindo as atividades antioxidantes, antimicrobianas, imunoestimulante e anti-tumoral.[1]

As propriedades biológicas da própolis são o resultado de substâncias presentes no material vegetal desta, coletado pelas abelhas. Dentro da colmeia, a própolis é utilizada para reduzir o risco de doenças, transmitidas por parasitas da colônia.[2] Em vários países, a própolis é uma importante matéria-prima na fabricação de produtos alimentares e de higiene (por exemplo, pasta de dentes, sabonete e shampoo). Tem-se defendido que alguns constituintes da própolis (como cafeína, ácido éster-fenetílico da própolis europeia e o artpillin C da própolis verde brasileira) podem ser usados como compostos majoritários em medicamentos.[3]

A composição da própolis depende das espécies vegetais usadas como fonte de resina e as abelhas exibem uma preferência marcante para algumas espécies de plantas em relação à sua produção. Por exemplo, a maior parte da própolis produzida no sudeste do Brasil pertence ao tipo verde derivado de brotos foliares de *Baccharis dracunculifolia* DC.[4,5] Comercialmente, a própolis verde brasileira está entre as mais importantes do mundo, sendo exportada para a China, Japão e Alemanha. Outro tipo comercialmente importante da própolis brasileira é a própolis vermelha do litoral do nordeste do Brasil, que é derivada de exsudatos de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub.[6] Os dados referentes à composição química também estão disponíveis para própolis de outros estados nordestinos brasileiros, como o Piauí, Bahia, [7] e também do Ceará.[8]

Até o presente momento, nada foi publicado sobre a caracterização química da própolis do Rio Grande do Norte (RN), um estado localizado na região mais oriental da América do Sul. Este estado situa-se na região do semiárido brasileiro denominada "polígono das secas"[9], uma região nordeste com sérios problemas sociais e econômicos, que, durante séculos, foi classificada entre as piores do país[10]. A vegetação típica da região é exclusiva e é conhecida como caatinga, um bioma ocupado por pequenas árvores espinhosas, arbustos e cactos; plantas adaptadas para os períodos de secas prolongadas típicos dessa floresta, com grande biodiversidade. A apicultura é economicamente importante no RN. No entanto, a produção da própolis ainda é negligenciada pela maioria dos apicultores locais. Isto é lamentável, especialmente considerando que o pico da produção de própolis na área também ocorre durante os meses mais secos, quando a agricultura e a pecuária são prejudicadas.

Para introduzir a própolis no mercado da apicultura do RN, são necessários vários procedimentos, incluindo a determinação de parâmetros padrões (odor, cor, textura, cera, substâncias fenólicas totais, flavonoides totais) análise do perfil químico, avaliação da

atividade biológica e identificação da fonte da planta. Especula-se que, no Nordeste do Brasil, uma leguminosa abundante e resistente, popularmente conhecida como "jurema-preta" (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.) pode representar a origem botânica da própolis local.

No presente estudo objetivou-se determinar parâmetros padrão da própolis do semiárido, caracterizar seus constituintes químicos, avaliar sua atividade antioxidante e testar a hipótese de que *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. é sua fonte botânica através da avaliação dos perfis químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de própolis e material de planta

Amostras de própolis foram coletadas em apiários localizados nos municípios de Afonso Bezerra (5°29′45.7″S; 36°31′10.3″W) em fevereiro 2014 e Alto do Rodrigues (5°15′21″S; 36°45′29″W) em junho/julho de 2013, durante um período de seca prolongada. Ambos os apiários eram cercados por vegetação de caatinga, afetada pela invasão da planta asiática *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Leguminosae, Mimosoideae) e áreas de plantação de melão. As amostras foram obtidas de colmeias racionais Langstroth contendo abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). O método para estimular a produção de própolis foi um sistema de ripas de madeira (370 × 20 × 20 mm) na frente e na parte de trás das colmeias, entre a melgueira e o ninho, mantendo uma folga de 20 mm em ambos os lados. As amostras foram coletadas raspando o produto acumulado nas frestas de ambos os lados. As própolis depositadas em outras partes das colmeias foram descartadas. As amostras foram colocadas dentro de sacos de plástico e mantidos no congelador.

Ápices vegetativos de jurema-preta bem como espécimes de 'jurema-preta' em floração foram coletados em uma área de caatinga no município de Afonso Bezerra. Os ápices foram secos ao ar e mantido no congelador dentro de sacos de plásticos. Os espécimes de comprovação foram preparados e depositados no Herbário SPF (Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Brasil). A espécie foi identificada pelo Dr. Luciano Paganucci de Queiroz (Universidade Estadual de Feira de Santana, estado da Bahia, Brasil) por *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (syn *Mimosa hostilis* Benth.).

Preparação dos extratos etanólicos

As amostras de própolis das duas localidades foram pulverizadas com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo. Triplicatas de 10 g de própolis de cada localidade foram tratados com 150 mL de etanol em Soxhlet por 6 horas. Os extratos foram filtrados e mantidos em frascos âmbar durante a noite em freezer a −20°C. Posteriormente, foram filtrados novamente para eliminar o excesso de cera. Os ápices secos de "jurema-preta" também foram pulverizados com nitrogênio líquido em um almofariz. Uma porção de 1g do pó foi extraído em Soxhlet com etanol por 6 horas. Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE/DAD) e análises por espectrometria de massa em conjunto com ionização por electropulverização por CLAE-DAD (ESI-MS / MS), alíquotas dos extratos de própolis das duas localidades e os ápices da jurema-preta foram evaporados até secarem sob fluxo de nitrogênio e os resíduos foram dissolvido em metanol para obter soluções a 10 mg/mL^{-1}.

Parâmetros Químicos Padrão

Para determinação de sólidos totais e cera, os extratos de cada localidade foram utilizados. O solvente (etanol) foi evaporado até secagem total sob fluxo de nitrogênio, em seguida foram pesados para determinação de sólidos totais. O teor de cera também foi determinado usando solventes combinados (extração com diclorometano por 5h seguida de extração em etanol a quente posteriormente resfriada a 0ºC, conforme metodologia padrão) [11]. Triplicatas de amostras de cada localidade foram utilizadas para determinação dos teores de substâncias fenólicas totais e flavonoides totais, o primeiro pelo método de Folin-Ciocalteau e o último pelo método do cloreto de alumínio. Os procedimentos foram realizados de acordo com metodologia padrão.[11] O ácido p-cumárico foi usado como referência para a determinação de substâncias fenólicas totais e a quercetina para flavonóides totais.

Atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foram empregados dois diferentes procedimentos que utilizavam o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (método do DPPH) e a descoloração de β-caroteno (método β-caroteno/ácido linoleico) com amostras triplicadas de cada localidade, como descrito anteriormente, [12] com algumas modificações. Para o primeiro método, soluções dos extratos metanólicos de própolis foram preparadas a 15, 30, 45 e 60 μg

mL^{-1}. Soluções metanólicas de quercetina em 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 e 30,0 μg mL^{-1} foram utilizados como referência. Para o método β-caroteno/ácido linoléico, soluções de metanol a 40, 80 e 120 μg mL^{-1} dos extratos e soluções de metanol da quercetina em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μg mL^{-1} foram utilizadas. O metanol foi usado como branco para ambos os métodos. Os resultados são expressos como EC_{50} (μg mL^{-1}). [13]

Análises HPLC / DAD e HPLC-DAD-ESI-MS / MS

Os extratos metanólicos (soluções a 10 mg/mL^{-1} obtidas previamente) de ambas as amostras de própolis foram purificados através de filtros de 0,45 μm. Alíquotas de 5 μL das soluções das duas amostras e do extrato do ápice da "jurema-preta" (*Mimosa tenuiflora*) foram analisadas com Cromatógrafo HPLC HP 1260 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de diodos, Coluna Zorbax 5B-RP-18 (4,6 x 250 mm, 5 μm; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) a 40 °C. Os solventes utilizados foram ácido acético 0,1% (A) e metanol (B), com o gradiente de concentração B: 0 a 10 min, 10 a 20%; 10 a 20min, 20 a 40%; 20 a 30min, 40 a 50%; 30 a 38min, 50 a 60%; 38-47,9min, 60%; 47,9-48min, 60-65%; 48 a 55min, 65 a 70%. O caudal foi estabelecido em 0.5 mL min^{-1} e a temperatura da coluna foi de 40 °C. O detector de arranjo de diodos foi ajustado para detecção em 254 e 352 nm.

Os constituintes das duas amostras de própolis foram caracterizados usando 10 μL da solução filtrada e a técnica CLAE-DAD-ESI-MS/MS. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo DADSPD-M10AVP (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), equipado com um desgaseificador, duas bombas LC (LC-20), uma coluna CTO-20A forno, um auto-injetor SIL 20 AC e um conjunto de detectores diodos SPD-20A, ajustado para operar em 254 e 352 nm. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massa Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), equipado com um analisador de massa quadrupolo de armadilha de íons. Todos os componentes de hardware foram controlados pelo software CBM-20A (Shimadzu Corp.). As análises foram executadas com uma coluna de fase reversa Gemini C-18 (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) (4,6 x 250 mm, 5 μm), protegido por uma coluna de guarda. Os solventes, programa gradiente e vazão utilizados foram os mesmos descritos acima. A aquisição de massa por varredura completa foi realizada por ionização por eletropulverização no modo de ionização positiva por digitalização no intervalo m/z 100–1200. O gás hélio foi usado como gás de colisão e o azoto como gás de nebulização. A

nebulização foi auxiliada com um gás coaxial de bainha de azoto, a uma pressão de 27 psi. A dessolvatação foi assistida utilizando um nitrogênio em fluxo contracorrente ajustado em fluxo de 7,0 L min $^{-1}$ e temperatura capilar de 320°C. Os eventos MS/ MS dependentes de dados foram realizados nos íons intensos detectados na varredura completa da MS. A acumulação máxima, tempo da armadilha de íons e os números de MS para obter o MS os espectros médios foram estabelecidos em 30 e 3MS, respectivamente. Todos os compostos foram caracterizados pela interpretação dos respectivos espectros ultravioleta (UV) e de massa, a partir de dados da literatura de EM (Espectrometria de Massas) e das seguintes bases de dados químicos online: Scifinder® (http: //www.scifinder.org), Reaxys® (http://www.reaxys.com), Riken MSn Spectral banco de dados para fitoquímicos (Respect) (http: //www.reaxys.riken.jp), Fenol-Explorer (http://phenol-explorer.eu), Chem.Spider (http://www.chemspider.com) e HMDB (http://www.hmdb.ca).

A quercetina foi identificada por comparação direta com um padrão. Flavonóis foram caracterizados por bandas UV-visíveis em 345 a 360 nm (banda I) e 250 a 280 nm (banda II); flavonas por bandas a 330–345nm (banda I) e 254–272nm (banda II); chalconas por banda I a 370 nm; e di-hidroflavonóis e di-hidroflavonas por bandas em 328 e 290 nm.[14] Além dos íons moleculares, a caracterização dos EM de flavonóides foram baseados em fragmentos gerados por reação de Retro-Diels-Alder, fornecendo dados sobre os números e tipos de substituintes nos anéis A e B.[15–17]

Sempre que possível, a caracterização dos compostos dependia da fragmentação, modos de ionização negativos e positivos e dados de literatura foram utilizados para adicionar a caracterização de fenilpropanóides e flavonóides.[18,19] Flavonóides metoxilados produziram fragmentos gerados por perda de radicais metila.[19,20] Um glicosídeo ramnosil foi caracterizado com base na perda de ramnose. A violantina foi caracterizada pela comparação do espectro de MS com a literatura.[21] A caracterização de chalconas baseou-se em sua característica de comprimento UV Banda I (365-370 nm) e fragmentos obtidos por perdas de hidroxivinil benzenos gerados por reação *Retro-Diels-Alder*.[17–19,22] As flavononas isoméricas correspondentes com Espectros de MS semelhantes foram caracterizadas pelo menor comprimento de UV Banda I (340 nm).

Análise estatística

As diferenças entre médias de parâmetros químicos padrões e atividades antioxidantes foram avaliadas usando o teste t de Student.

RESULTADOS

Parâmetros químicos e atividade antioxidante

As amostras de própolis das duas localidades do RN possuem uma cor verde. A amostra de Alto do Rodrigues tem um tom mais escuro que as de Afonso Bezerra. As amostras possuem uma textura relativamente maleável e sabor resinoso. A Tabela 1 apresenta o conteúdo de sólidos solúveis, cera, substâncias fenólicas totais e flavonóides totais, bem como os valores propostos no Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis (RTIQP)[23], no que diz respeito às propriedades físicas e químicas características da própolis produzida no Brasil. A amostra de Afonso Bezerra tem um conteúdo menor de cera e um conteúdo mais alto de flavonoides em relação à amostra do Alto do Rodrigues.

Tabela 1. Parâmetros químicos (g kg^{-1}) de amostras de própolis verde de duas localidades do estado do Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil) e respectivos limites do RTIQP (Regulamento Técnico para fixação e Identificação e Qualidade de Própolis.

Amostras	Sólidos solúveis	Ceras	Substâncias fenólicas totais	Total de flavonoides
AB	530	54	137 ± 3.2 a	117 ± 1.4 a
AR	544	81	143 ± 1.6 a	94 ± 2.3 b
RTIQP	Mínimo 350	Máximo 250	Mínimo 50	Mínimo 5

As mesmas letras minúsculas dentro de uma coluna indicam que os valores não são significativamente distintos. AB = Afonso Bezerra, AR = Alto do Rodrigues.

Para a atividade antioxidante, os valores de EC_{50} das duas amostras de própolis são mostrados na Tabela 2, juntamente com os valores EC_{50} das soluções de quercetina. A capacidade da amostra de Afonso Bezerra para sequestro do radical DPPH foi maior do que a amostra de Alto do Rodrigues, mas quanto à descoloração do β-caroteno, as capacidades de própolis de ambos os locais não obtiveram diferenças estatisticamente significativas.

A atividade das amostras de própolis para sequestrar o radical DPPH corresponde a aproximadamente 10% (Alto do Rodrigues) e 13% (Afonso Bezerra) da atividade da quercetina pura. A respeito de método de descoloração de β-caroteno, a atividade das duas amostras está perto de 15% da atividade da quercetina.

Tabela 2. Atividade antioxidante (EC_{50}, µg mL^{-1}) de amostras de própolis verde provenientes de municípios do estado do Rio Grande do Norte e de quercetina, avaliados por dois métodos (DPPH e β-caroteno).

Amostras	DPPH	β-caroteno
Afonso Bezerra	56.2 ± 0.4 a	101.1 ± 2.7 a
Alto do Rodrigues	72.9 ± 0.3 b	106.4 ± 4.0 a
Quercetina	7.4 ± 0.1 c	15.5 ± 2.9 b

As mesmas letras minúsculas dentro de uma coluna indicam que os valores não são significativamente distintos.

Constituintes de amostras de própolis e ápices de "jurema-preta"

Os perfis químicos das amostras de própolis dos dois locais e os ápices da planta são muito semelhantes (Fig. 1).

Diferenças foram observadas apenas em relação às abundâncias relativas dos constituintes dos extratos. Apenas compostos fenólicos foram caracterizados como constituintes dos extratos de própolis e ápices analisados (Tabela 3).

Com exceção do composto 1 (fenilpropanoide), todos os outros constituintes são flavonóides. Os compostos 3, 6 e 18 são flavonas; entre eles, 3 é um di-C-glicosídeo e os outros são agliconas. Os compostos 2, 4, 5, 8, 9 e 12-15 são flavonóis; os dois primeiros são glicosídeos e os outros são agliconas.

O composto 11 é uma flavonona. Uma importante característica química das amostras de própolis analisadas são as chalconas: entre os constituintes detectadas nas amostras analisadas, quatro (7, 10, 16 e 17) correspondem a essa categoria de flavonoides. O composto 17 é aparentemente o constituinte mais abundante de ambas as amostras de própolis analisadas (Figura 1).

DISCUSSÃO

Parâmetros químicos e atividade antioxidante

A própolis verde do RN possui características organolépticas e físicas distintas de outros tipos de própolis brasileiras. Os parâmetros químicos quanto aos teores de cera, sólidos solúveis, substâncias fenólicas totais e flavonoides totais estão em conformidade com os padrões de qualidade do RTIQP (Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis).

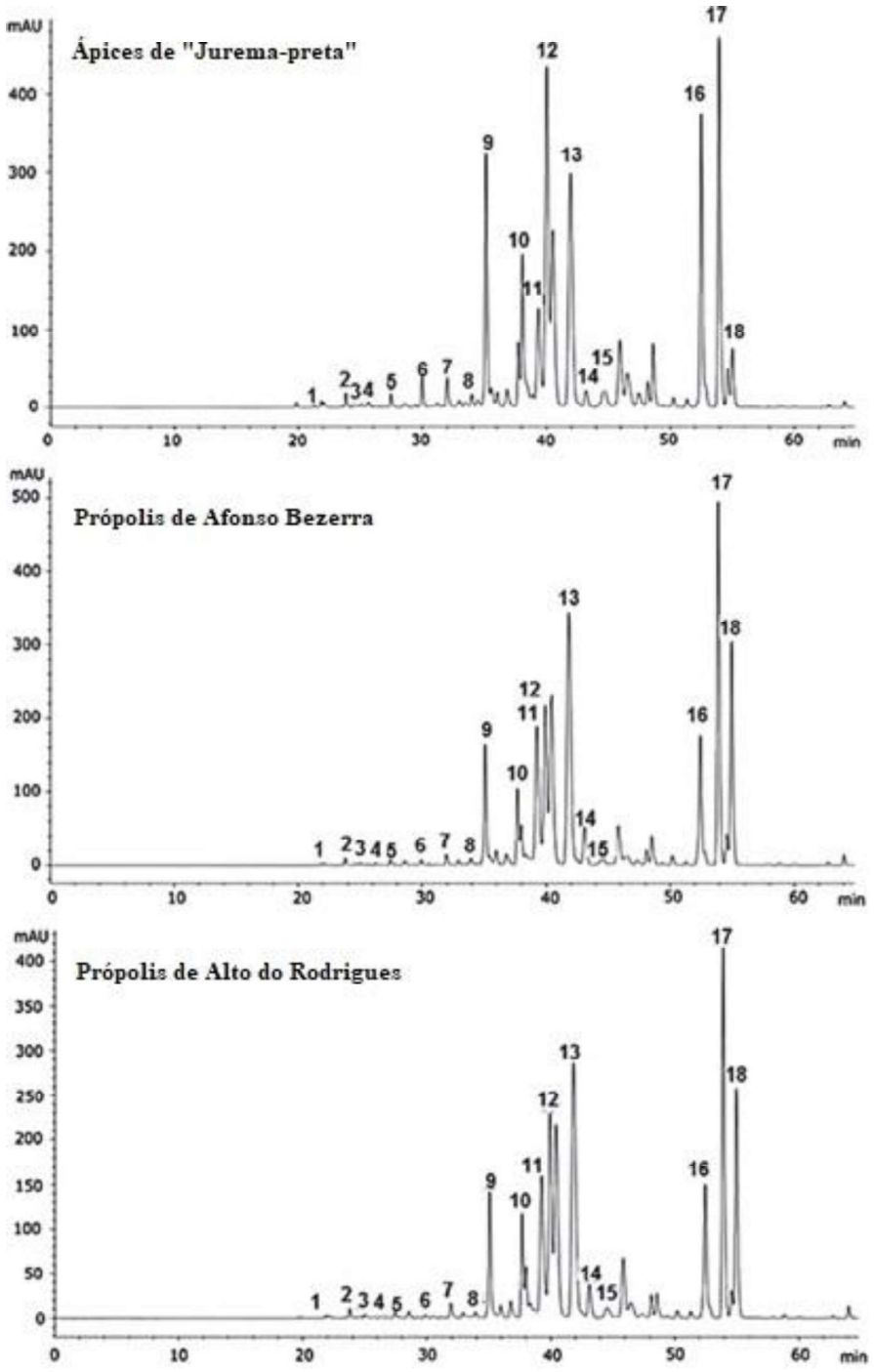

Figura 1. Cromatogramas de HPLC de extratos etanólicos de ápices da parte aérea de "jurema-preta" [Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir., Leguminosae, Mimosoideae] e amostras de própolis de duas localidades do Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil).

Tabela 3. Distribuição de substâncias fenólicas em ápices de 'jurema-preta' e amostras de própolis de Afonso Bezerra (Af. Bez.) e Alto do Rodrigues (Alt. Rodr.), dois municípios do estado do Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil), caracterizados por análise HPLC-DAD-ESI-MS/MS ou comparação com padrão.

Nº do composto	Tr	UV (nm)	MS^- (*m/z*, %)	MS^+ (*m/z*, %)	Proposta de Caracterização	Referência/Padrão utilizado
1	21.2		197 $[M-H]^-$		Ácido trihidroxi di-hidrocinâmico	19,20
2	23.8	260, 300 sh, 355	539$[M-H]^{-1}$,521(10),387(100)		Galato de pentahidroxi-flavona	19,20
3	24.7	270, 335	577 $[M-H]^-$		Violantina	21
4	25.6	255, 370	463 $[M-H]^-$		Miricetina-3-*O*-rhamnosideo	19,20
5	27.5	255, 355	629 $[M-H]^-$		Galato de Isoramnetina-3-*O*-Glucosil	19,20
6	29.9	270, 340	369 $[M-H]^-$		Prenil-penta-hidroxi-flavona	_*
7	31.9	255, 370	285 $[M-H]^-$	287 $[M + H]^+$, 167	Di-hidroxi-metoxi chalcona	17– 19,22
8	33.9	260, 365	303 $[M-H]^-$, 183	301 $[M + H]^+$	Quercetina	Padrão
9	35.1	260, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M + Na]^+$, 317 $[M + H]^+$, 302 (40)	Quercetina metil éter	19,20
10	38.1	270, 365	315 $[M-H]^-$	339$[M+Na]^+$,317$[M+H]^+$,197(100)	Tri-hidroxi-dimetoxi chalcone	17– 19,22
11	39.3	270, 340	285 $[M-H]^-$	287 $[M + H]^+$, 167	Di-hidroxi-metoxi flavanona	19,20
12	40.02	260, 360	299 $[M-H]^-$	323 $[M + Na]^+$, 301 $[M + H]^+$, 286	Kaempferol metil éter	19,20
13	41.9	250, 270sh, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M + Na]^+$, 331 $[M + H]^+$, 316	Quercetina dimetil éter	19,20
14	43.2	255, 355	313 $[M-H]^-$	337$[M+Na]^+$,315$[M+H]^+$,300(60),282(100)	Kaempferol dimethyl éter	19,20
15	48.6	255, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M + Na]^+$, 331 $[M + H]^+$	Isômero de quercetina dimetil éter	19,20
16	52.4	370	269 $[M-H]^-$	271 $[M + H]^+$, 161 (100), 137 (70)	Metoxi-di-hidroxi chalcona	17– 19,22
17	53.9	370	299 $[M-H]^-$	301 $[M + H]^+$, 167	Dimetoxi-di-hidroxi chalcone	17– 19,22
18	55.0	270, 340	343 $[M-H]^-$	367 $[M + Na]^+$, 345 $[M + H]^+$, 345	Di-hidroxi-trimetoxi flavona	17– 19,22

Caracterização provisória baseada no espectro UV e no íon molecular. Tr = tempo de retenção.

Os dados da Tabela 1 indicam que as duas amostras de própolis têm características químicas padrão altamente positivas, como baixo teor de cera e alto teor de substâncias fenólicas (correspondendo a aproximadamente 25% dos sólidos solúveis) e um alto teor de flavonoides (aproximadamente 70% do total de substâncias). Conteúdos na faixa de 88 a 126 g kg^{-1} e 8 a 27 g kg^{-1} de substâncias fenólicas totais e flavonoides, respectivamente têm sido relatados para a própolis verde do sudeste brasileiro.[11] Os valores são menores que os respectivos dados da própolis do RN (Tabela 1). O conteúdo de cera relatado para a própolis verde do sudeste brasileiro (46-78 g/kg^{-1}) [11] são semelhantes aos dados da Tabela 1.

Entre os constituintes da própolis, a maioria dos compostos biológicos ativos são substâncias fenólicas. Por exemplo, pinocembrina (constituinte da própolis europeia) é ativo com relação a uma diversidade de efeitos biológicos comprovados.[24] A crisina é uma flavona biologicamente ativa da própolis chinesa.[25] Em relação aos fenilpropanóides da própolis, uma alta diversidade de efeitos tem sido atribuída ao CAPE (Ácido fenil éster caféico) da própolis européia[26] e ao artepillin C da própolis verde brasileira.[2]

Em geral os flavonóides e outros constituintes fenólicos da própolis são fortes substâncias antioxidantes.[27] A química da própolis boliviana compreende dois padrões: ou altamente fenólico ou altamente triterpenoide. O primeiro tem altas atividades antioxidantes e antibacterianas, enquanto que os últimos são fracamente ativos.[20] Resultados semelhantes foram obtidos para própolis.[27] Além disso, atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, citotóxicas, antitumoral e quimiopreventiva das chalconas foram reconhecidas.[28–32]

Levando estes comentários em consideração, os resultados do presente estudo indicam que a própolis verde RN é um promissor produto apícola, com baixo teor de cera e alto conteúdo de substâncias fenólicas, principalmente chalconas e outros flavonoides (Tabela 1). Assim, as duas amostras possuem alta atividade antioxidante (Tabela 2). A amostra de Afonso Bezerra tem um menor teor de cera e maior teor de flavonóides (Tabela 1), bem como maior atividade sequestradora de radicais livres (Tabela 2), do que a amostra de Alto do Rodrigues.

Constituintes químicos e origem botânica

Uma peculiaridade do perfil químico das amostras analisadas é o teor relativamente alto de chalconas. Esses metabólitos são precursores biossintéticos de outras classes de flavonóides. No entanto, eles raramente se acumulam nos tecidos vegetais. Em particular, diidrochalconas são incomuns em fontes naturais.[32]

As espécies da família Leguminosae, como *M. tenuiflora* (presente trabalho) e *Acacia paradoxa* (Leguminosae, Mimosoideae) são relatadas como fontes frequentes de própolis.[33] No entanto, análises químicas e morfológicas são cruciais para a determinação do origem da própolis.[34] A similaridade dos cromatogramas dos extratos de própolis e dos ápices da planta *M. tenuiflora* mostrados na Fig. 1 pode ser considerada uma forte evidência, indicando que "jurema-preta" é a principal fonte de resina de própolis verde do RN.

Tanto a origem botânica como a composição química distinguem a própolis verde analisada no presente estudo de outros tipos de própolis brasileiras. Triagens com o objetivo de caracterizar a própolis a partir de regiões distintas do Brasil não relataram perfis químicos semelhantes para a própolis do RN.[7,35] No Brasil, *M. tenuiflora* ocorre na maioria dos estados do polígono da seca e em Minas Gerais (sudeste). Fora do Brasil, ela ocorre na Venezuela, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Panamá e sul do México.[36] Ela tem sido usada em rituais indígenas brasileiros.[37] A sua casca é o ingrediente principal do “vinho de jurema”, uma bebida psicadélica usada em rituais afro-brasileiros e cultos enteogênicos.[38,39] A substância extraída da casca da "jurema-preta" é a dimetiltriptamina.[40] Esses tipos de compostos contendo nitrogênio não foram detectados nos ápices ou nos extratos de própolis (Tabela 3). Também há relatos de que *M. tenuiflora* tem efeitos tóxicos em bovinos, ovinos e caprinos, [41] embora seu pólen não seja tóxico para *A. mellifera* e seja um relevante recurso no semiárido brasileiro para alimentação de abelhas.[42]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração a atividade biológica dos flavonoides, incluindo as chalconas, os resultados do presente estudo sugerem que a própolis verde RN tem perspectivas promissoras no mercado apícola. A implementação de ações destinadas a estimular a produção de própolis no RN pode trazer benefícios para a economia, particularmente durante as estações secas mais severas.

REFERÊNCIAS

1 Burdock GA, Review of the biological properties and toxicicty of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36:347–363 (1998).

2 Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA and Salatino MLF, Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* 28:925–936 (2011).

3 Sforcin JM and Bankova V, Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmac*133:253–260 (2011).

4 Salatino A, Teixeira EW, Negri G and Message D, Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2:33–38 (2005).

5 Teixeira EW, Negri G,Meira RMSA,Message D and Salatino A, Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* 2:85–92 (2005).

6 Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A et al., Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 5:313–316 (2008).

7 Righi AA, Negri G and Salatino A, Comparative chemistry of própolis from eight Brazilian localities. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:267878 (2013).

8 Albuquerque IL, Alves LA, Lemos TLG, Monte FJQ and Braz Filho R, Canaric acid (3,4-seco-lupane derivative) isolated from propolis of Ceará. *Quim Nova* 30:828–831 (2007).

9 Crocitti JJ and Vallance MM, *Brazil Today.* ABC-CLIO, Santa Barbara (2012).

10 Alves J, *História das secas*, 2ed. Fundação GuimarãesDuque/ESAM, Mossoró (1982).

11 Woisky RG and Salatino A, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apic Res 37:99–105 (1998).

12 Righi AA, Negri G, Marques LM, Breyer H and Salatino A, Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* 91:2363–2370 (2010).

13 Sun LP, Chen AL, Hung HC, Chien YH, Huang JS, Huang CY et al., Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* 60:11748–11758 (2012).

14 Markham KR, *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London (1982).

15 Abad-Garcia B, Berrueta LA, Garmon-Lobato S, Gallo B and Vicente F, A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatographywith diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr* A 28:5398–5415 (2009).

16 Engels C, Gräter D, Esquivel P, Jiménez VM, Gänzle MG and Schieber A, Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatograpgy/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Res Int* 46:557–562 (2012).

17 Portet B, Fabre N, Rozenberg R, Habib-Jiwan JL, Moulis C and Quetin-Leclercq J, Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. berbicense using liquid

chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromat* A 1210:45–54 (2008).

18 Zhang JY, Che YY, Zhang Y, Liang SX, Zhao YJ and Tu PF, Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of Murraya paniculata by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 56:950–961 (2011).

19 Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M and Swierczek-Zieba G, Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19:78–101 (2014).

20 Nina N, Quispe C, Jimenez-Aspee F, Theoduloz C, Gimenez A and Schmeda-Hirschmann G, Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *J Sci Food Agricult* 96:2142–2153 (2016).

21 Vukics V, Toth BH, Ringer T, Ludanyi K, Kery A, Bonn GK et al., Quantitative and qualitative investigation of the main flavonoids in heartsease (Viola tricolor L.). *J Chromatogr Sci* 46:97–101 (2008).

22 Popova M, Bankova V, Spassov S, Tsvetkova I, Naydenski C, Silva MV et al., New bioactive chalcones in propolis from El Salvador. *Z Naturforsch* C 56:593–596 (2001).

23 *Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis*, Portaria n. 3, Instrução Normativa n. 3, 19/01/2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília (2001).

24 Liu R, Wu C, ZhouD, Yang F, Tian S and Zhang L, Pinocembrin protects against β-amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *BMCMed* 10:105 (2012).

25 Sun LP, Chen AL, Hung HC, Chien YH, Huang JS, Huang CY et al., Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* 60:11748–11758 (2012).

26 Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ and Abdel-Naim AB, Caffeic acid phenethyl ester, a promising componente of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 65:699–709 (2013).

27 Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A and Stringheta PC, Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med* 7:307–315 (2010).

28 Ni LM, Meng DQ and Sikorski JA, Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin Ther Patents* 14:1669–1691 (2004).

29 Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J and Kohli DV, Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *CurrMed Chem* 19:209–225 (2012).

30 Singh P, Anand A and Kumar V, Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *Eur J Med Chem* 85:758–777 (2014).

31 Rozmer Z and Perjesi P, Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem Rev* 15:87–120 (2016).

32 Awouafack MD, Tane P, Spiteller M and Eloff JN, Eriosema (Fabaceae) species represent a rich source of flavonoids with interesting pharmacological activities. *Nat Prod Commun* 10:1325–1330 (2015).

33 Tran VH, Duke RK, Abu-Mellal A and Duke CC, Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry* 81:126–132 (2012).

34 Bankova V, Castro SL and Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31:3–15 (2000).

35 Fernandes-Silva CC, Salatino A and Salatino MLF, Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Quim Nova* 36:237–240 (2013).

36 US *National Plant Germplasm System*, Taxon: *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (2003). [Online]. Available: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?24430 [28 July 2016].

37 Souza RSO, Ulysses PA, Albuquerque UP, Monteiro JM and Amorim ELC, Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* [Wild.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz Arch Bio Techn* 51:937–947 (2008).

38 Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG et al., Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114:325–354 (2007).

39 Gaujac A, Martinez ST, Gomes AA, Andrade SJ, Pinto AC, David JM et al., Application of analytical methods for the structural characterization an purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potente psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. *Microchem J* 109:78–83 (2013).

40 Gaujac A, Aquino A, Navickiene S and Andrade JB, Determination of N,N-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC-MS. *J Chromat B* 881/882:107–110 (2012).

41 Bezerra CWC, Medeiros RMT, Rivero BRC, Dantas AFM and Amaral FRC, Plant poisoning in ruminants and horses in Southern Ceara, Northeastern Brazil. *Cienc Rural* 42:1070–1076 (2012).

42 Silva CV, Mesquita LX, Maracaja PB and Soto-Blanco B, Toxicity of *Mimosa tenuiflora* pollen to Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.). *Acta Sci Vet* 38:161–163 (2010).

CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ORIGEM BOTÂNICA

Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin

Artigo publicado em língua inglesa no periódico

EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE

Em fevereiro de 2017

Escrito de acordo com as normas técnicas do periódico

Publicação na íntegra no APÊNDICE B

Atividade antioxidante da geoprópolis do Nordeste do Brasil: caracterização química e origem botânica

Joselena Mendonça Ferreira; Caroline Cristina Fernandes-Silva; Antonio Salatino; Dejair Message e Giuseppina Negri

INTRODUÇÃO

Apidae e Meliponinae correspondem, respectivamente, a uma família e uma subfamília de abelhas tropicais. Uma tribo importante no grupo é a tribo Meliponini, cujos membros são conhecidos como abelhas sem ferrão (no inglês, *stingless bees*). Existem mais de 300 espécies de Meliponini, distribuídas em vários gêneros, incluindo Melipona e Trigona. O primeiro gênero compreende cerca de 50 espécies exclusivamente neotropicais, enquanto o segundo é um grupo maior, representado por cerca de 130 espécies pantropicais. Eles são valiosos polinizadores de plantas nativas e de culturas (HEARD, 1999).

As colmeias de abelhas sem ferrão são constituídas de discos de cera para as larvas e com potes de cera para armazenamento de mel e pólen [2, 3]. A geoprópolis é um produto elaborado por essas abelhas. Ela é semelhante à própolis da abelha *Apis mellifera*, uma vez que ambos os produtos contêm resina vegetal e cera de abelha. Elas são distintas, no entanto, porque a geoprópolis contém conteúdo variável de material de solo. Assim como na própolis de abelhas *Apis*, a geoprópolis também é usada para alinhar a entrada e vedar aberturas extras que possam existir no ninho. Muito tem sido publicado sobre a química da própolis, sua origem botânica, e atividade biológica [4-6]. Em comparação, consideravelmente pouco foi feito em relação a geoprópolis, apesar da enorme diversidade de abelhas sem ferrão [7, 8].

No Brasil, a geoprópolis tem sido usada para o tratamento de doenças respiratórias e dermatoses [9]. A geoprópolis brasileira revelou atividades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antimicrobianas [10], enquanto a geoprópolis da Indonésia tem atividade citotóxica contra várias linhas celulares de cancro humano [11]. A maioria dos trabalhos sobre a química da geoprópolis brasileira tem demonstrado resultados a respeito da geoprópolis produzida por espécies de Melipona. Por exemplo, *Melipona fasciculata* produz diferentes tipos de geoprópolis: carboidratos, triterpenos, ácido anacárdico, alquilresorcinóis e álcoois de açúcar caracterizam essa geoprópolis do nordeste do Brasil [7], enquanto fenólicos como o ácido gálico e elágico, são constituintes de uma geoprópolis das terras baixas da região oeste do estado do Maranhão, nordeste do Brasil [2, 3]. A abelha *Melipona subnitida* do estado do

Paraíba (nordeste do Brasil) produz geoprópolis contendo fenilpropanóides e flavonoides [12]. Já a *Melipona scutellaris* do estado da Bahia (sul do nordeste do Brasil) produz tipos distintos de geoprópolis, por exemplo, uma amostra contendo benzofenonas como constituintes principais [13] e outra caracterizada por ésteres de ácido cinâmico e cumarinas [8]. Glicosídeos flavonoides foram detectados em geoprópolis de duas abelhas sem ferrão da Amazônia, *Melipona interrupta* e *M. seminigra* [14] e compostos fenólicos e terpenos foram relatados para uma geoprópolis de *M. orbignyi* de Mato Grosso do Sul (centro-oeste do Brasil) [15].

Poucos trabalhos foram publicados sobre geoprópolis de outras espécies de abelhas sem ferrão. A geoprópolis de *Trigona spinipes* contém triterpenos e ácido magniferólico, entre outros constituintes [9]. A geoprópolis de *Scaptotrigona postica* do Maranhão tem um perfil químico peculiar: além dos ácidos cafeoilquínicos, contém flavonóides-C-glicosídeos (principalmente vicenina-2) e o alcalóide pirrolizidina derivado de retronecina [16]. Estudos sobre a origem botânica da geoprópolis são escassos. Há evidências de que os frutos de *Corymbia torelliana* (Myrtaceae) fornecem resina para a produção de geoprópolis pela *Tetragonula carbonaria* australiana (Meliponini), devido à grande semelhança nos perfis químicos de flavanonas entre os dois [17].

Até o momento, nada foi publicado sobre a química da geoprópolis de *Scaptotrigona* brasileira do Semiárido, uma região designada como “polígono das secas”. Foi mostrado recentemente que uma própolis de cor verde escura, de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) do Rio Grande do Norte (RN) é produzida a partir de ápices de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae, Mimosoideae), uma planta conhecida localmente como “jurema-preta” [18]. *M. tenuiflora* é uma espécie resistente e abundante no bioma caatinga, uma floresta seca típica do nordeste brasileiro, caracterizada por pequenas árvores e arbustos espinhosos, cactos e eufórbias. A maioria das plantas da caatinga ficam desprovidas de folhas durante a longa estação seca, mas a jurema-preta permanece com pequenas quantidades de brotos germinativos nesse período do ano, e é uma das plantas que germinam imediatamente após as primeiras chuvas.

Nessa área, uma geoprópolis com cor verde escura é produzida por abelhas *Scaptotrigona* aff. *depillis,* Moure, 1942, conhecida popularmente como “canudo” [37]. Embora não seja nativa da região Nordeste, essa abelha é um polinizador ativo, difundida em várias partes do Brasil.

O objetivo do presente estudo foi determinar alguns parâmetros padrões (compostos fenólicos e flavonoides totais, atividade antioxidante) de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff.

depillis, bem como fazer a caracterização de seus constituintes químicos e testar a hipótese de que a jurema-preta seja sua fonte de resina.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da geoprópolis

Uma amostra da geoprópolis de *S. depillis* foi coletada em janeiro de 2014 no meliponário da Fazenda Experimental Rafael Fernandes, UFERSA (Universidade Federal Rural do Semiárido), município de Mossoró, Estado do RN (nordeste do Brasil; 05°11'16''S 37°20'38''W). Cerca de 3 g de material foram coletados de três caixas, raspando o produto acumulado entre o ninho e a tampa. A geoprópolis coletada tinha cor verde escuro e tem a textura um pouco pegajosa, com cheiro resinoso e textura maleável. A amostra foi limpa de impurezas, colocada dentro de saco plástico atóxico, e mantida em freezer a -20°C (TEIXEIRA et al., 2005).

Preparação de extratos de etanol

A amostra da geoprópolis foi pulverizada usando nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo. O material em pó (1 g) foi tratado com 150mL de etanol em Soxhlet por 6 horas. O extrato foi filtrado e mantido durante a noite em frasco escuro em freezer a -20°C. O extrato foi filtrado novamente para eliminar o excesso de cera.

Parâmetros Químicos

Uma alíquota de 20mL do extrato livre de cera (ELC) foi evaporada até a secura sob fluxo de nitrogênio e pesada para determinação de sólidos totais. Foram utilizadas triplicatas de 5mL do ELC para determinação do conteúdo de substâncias fenólicas totais e flavonoides totais, o primeiro pelo método de Folin-Ciocalteu e o segundo pelo método do cloreto de alumínio. Os procedimentos foram descritos em trabalho anterior [19]. Os compostos de referência utilizados foram o ácido p-cumárico (fenóis totais) e a quercetina (flavonoides totais).

Atividade antioxidante

Triplicatas de 5mL do ELC foram usadas para análise de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de atividade de eliminação de radicais livres, segundo Righi e colaboradores

[21], com algumas modificações necessárias. O procedimento detalhado está disponível em uma publicação recente [18].

Análises HPLC / DAD e HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Alíquotas de 1mL do ELC foram evaporadas até a secura sob fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em metanol grau de HPLC para obter soluções a 10 mg mL^{-1}. As soluções foram purificadas através de filtros de 0,45 μm. Alíquotas (10 μL) foram analisadas por HPLC-DAD com um cromatógrafo HPLC HP 1260 (Agilent Technologies), usando uma coluna Zorbax 5B-RP-18. A análise também foi realizada por HPLC-DAD-ESI-MS/MS com um cromatógrafo DAD-SPD-M10AVP Shimadzu equipado com desgaseificador, duas bombas LC-20AC, coluna aquecedora CTO-20A, auto-injetor SIL 20AC e SPD-20A, e um coluna de fase reversa Phenomenex Gemini C-18, protegida por uma coluna de guarda. O cromatógrafo foi acoplado a um Esquire 2000 Plus Bruker Daltonics espectrômetro, equipado com um analisador de massa de captura de íons quadrupolo. Detalhes dos procedimentos de análise, tais como fluxos de gás, temperaturas do forno, gradientes de solventes e bases de dados para caracterização química constituintes, estão disponíveis em uma publicação recente [18]. A caracterização dos constituintes foi baseada em UV-DAD e Dados MS nos modos de ionização negativa e positiva, e foi realizada comparação com dados previamente publicados [22-25].

RESULTADOS E DISCUSÃO

Parâmetros químicos e atividade antioxidante

Os conteúdos de sólidos solúveis, compostos fenólicos totais e flavonoides totais são mostrados na Tabela 1, além dos dados de valores mínimos aceitáveis pelo Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis (RTIQP) (padrões para comparação de características físicas e químicas da própolis produzida no Brasil) [20] Todos os parâmetros analisados obedecem aos padrões do RTIQP.

Tabela 1: Parâmetros químicos (g kg^{-1}) e atividade de eliminação do radical DPPH ($\mu g\ mL^{-1}$) de uma amostra de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* de Mossoró (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil), comparado com valores médios de própolis de jurema-preta [18] e valores-limite do Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Própolis (RTIQP) [20]

Tipos	**Sólidos solúveis**	**Fenólicos totais**	**Flavonoides totais**	**EC_{50}**
Geoprópolis	550	111.5 ± 5.4	98.5 ± 8.6	74,1 ± 0,5
Própolis de jurema	537	140	105	65
TRPIQ	Mínimo 350	Mínimo 50	Mínimo 5	-
Quercetina	-	-	-	7,4 ± 0,1

Como visualizado na Tabela 1, eles são semelhantes aos valores relatados para a própolis verde do RN derivada de "jurema-preta" [18] e consideravelmente superior aos parâmetros correspondentes a própolis verde comercializada internacionalmente do Sudeste do Brasil [19]. A atividade antioxidante (EC_{50}) da amostra de geoprópolis também é mostrada na Tabela 1. Como era esperado, houve semelhança entre a geoprópolis verde do RN e a própolis de jurema-preta quanto a capacidade de eliminação dos radicais livres pelo método do DPPH, e em ambas os resultados foram semelhantes. A atividade antioxidante da própolis foi atribuída ao seu perfil fenólico [26].

Caracterização química da geoprópolis e comparação com ápices de "Jurema-Preta

A Tabela 2 resume os dados de UV-DAD e MS nos modos de ionização negativa e positiva. Os flavonoides foram caracterizados por bandas UV/vis em 345 a 360 nm (banda I) e 255 a 280 nm (banda II); as chalconas foram caracterizados por bandas de 340–370 nm (banda I) e flavanonas por banda a 280 nm [22]. A caracterização de flavonoides metoxilados foi baseado em fragmentos gerados por perda de um radical metoxil (·CH3) e as chalconas caracterizadas por fragmentos gerados por reação *Retro-Diels-Alder* [23-25]. Detalhes sobre a caracterização dos compostos baseados em UV/vis, MS-, MS+ e sódio ([M + Na]+) estão disponíveis no artigo de Ferreira e colaboradores [18]. Apenas compostos fenólicos (flavonoides), foram caracterizados como constituintes dos extratos analisados de geoprópolis (Tabela 2). Esta observação é consistente com o teor excepcionalmente alto de flavonoides mostrado na Tabela 1.

Tabela 2. Distribuição dos constituintes dos extratos etanólicos da geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* (Meliponini) do meliponário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil), caracterizada pela análise HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Dados sobre a presença/ausência dos constituintes na própolis de *Apis mellifera* da mesma área, derivada de ápices de "jurema-preta" (*Mimosa tenuiflora*, Leguminosae) também são fornecidos, segundo dados já publicados.

Nº do composto	Tr*	UV (nm)	MS^- (*m/z*, %)	MS^+ (*m/z*, %)	Proposta de Caracterização	Referência/Padrão utilizado	Presença/ausência em própolis de *M. tenuiflora*
1	35.2	260, 365	301 $[M-H]^-$	303 $[M+H]^+$	Quercetina	Comparação com o padrão	+
2	38.2	260, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 302 (100)	Quercetina metil eter	19, 20	+
3	39.6	270, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 197 (100)	Trihidroxi-dimetoxi chalcona	17-19, 22	+
4	41.0	260, 360	285 $[M-H]^-$	287 $[M+H]^+$	Kaempferol	Comparação com o padrão	-
5	42.4	260, 360	299 $[M+H]^-$	323 $[M+Na]^+$, 301 $[M+H]^+$, 286 (100)	Kaempferol metil eter	19, 20	+
6	43.0	250, 270sh, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$, 316 (100)	Quercetina dimetil eter	19,20	+
7	44.4	255, 355	313 $[M-H]^-$	337 $[M+Na]^+$, 315 $[M+H]^+$, 300 (60), 282 (100)	Kaempferol dimetil eter	19, 20	+
8	45.1	370	315 $[M-H]^-$	317 $[M+H]^-$	Chalcona não caracterizada	-	-
9	45.6	255, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$	Quercetina dimetil eter	19, 20	+
10	47.1	255, 355	327 $[M-H]^-$	329 $[M+H]^+$	Flavonol não caracterizado	-	-
11	48.3	280	271 $[M-H]^-$	273 $[M+H]^+$	Trihidroxi flavanona	19, 20	-
12	50.2	270, 340	329 $[M-H]^-$	331 $[M+H]^+$	Tri-hidroxi-di-metoxi flavona	19, 20	-
13	52.2	370	269 $[M-H]^-$	271 $[M+H]^+$, 161 (100), 137 (70)	Metoxi-di-hidroxi chalcona	17-19, 22	+
14	56.6	370	299 $[M-H]^-$	301 $[M+H]^+$, 167 (100)	Dimetoxi-di-hidroxi chalcona	17-19, 22	+
15	58.5	370	313 $[M-H]^-$	315 $[M+H]^+$	Hidroxi-tri-metoxi chalcona	17-19, 22	-
16	59.9	270, 340	343 $[M-H]^-$	367 $[M+Na]^+$, 345 $[M+H]^+$, 300	Di-hidroxi-tri-metoxi flavona	17-19, 22	+

Caracterização provisória baseada no espectro UV e no íon molecular. *Tr = tempo de retenção.

As propriedades biológicas da própolis são frequentemente atribuídas aos seus constituintes flavonoides. Os compostos 1, 4 e 11 são agliconas simples de flavonol. Os compostos 2, 5, 7 e 9 são flavonóis éteres metílicos; os compostos 3, 6, 8 e 13-15 são chalconas, o composto 11 é uma flavanona e os compostos 12 e 16 são flavonas. Assim, os principais constituintes da geoprópolis de *S.* aff. *depillis* são flavonóis e chalconas. A Figura 1 representa o cromatograma (HPLC-DAD) do extrato etanólico da geoprópolis.

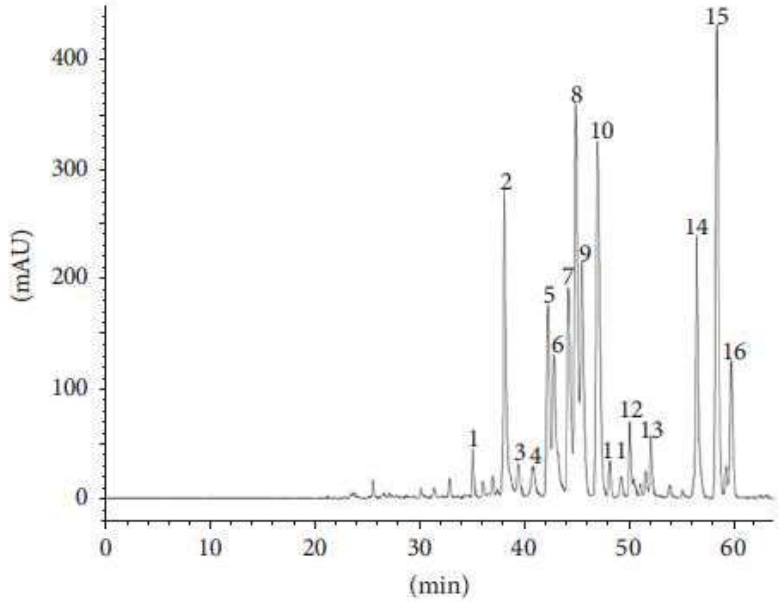

Figura 1: Cromatograma obtido por análise de HPLC-DAD-MS/MS de extratos etanólicos de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* (Meliponini) do meliponário da Universidade Universidade Federal Rural do Semi-Árido (estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil). Dígitos dos cromatogramas correspondem aos números vistos na Tabela 2, utilizado para indicar compostos caracterizados por HPLC-DAD-MS/MS.

Até agora, a origem da resina de própolis contendo chalconas tem sido atribuída a espécies de Leguminosae, como é o caso, por exemplo, de *Dalbergia ecastophyllum,* a fonte vegetal da própolis vermelha brasileira [21, 27, 28]. As principais fontes vegetais de chalconas são espécies de Asteraceae, Leguminosae, e Moraceae [29]. O presente relato de chalconas como constituintes da geoprópolis de *S.* aff. *depillis* e da própolis verde de *Apis mellifera* do RN é coerente com a hipótese de que a "jurema-preta" é uma de suas principais fontes botânicas [18]. Os dados da Tabela 2 evidenciam a alta similaridade entre composições químicas de ambos os produtos. Entre os 16 constituintes detectados no extrato etanólico do

geoprópolis, 10 também foram detectados como constituintes da própolis verde da mesma área (Tabela 2). A "jurema-preta" é abundante na vegetação da caatinga e seu pólen é um importante recurso nutricional para as abelhas locais.

Comparação com outras Geopropolis

O perfil químico visto na Tabela 2 é distinto da composição relatada para outras geoprópolis brasileiras. Até agora chalconas não tinham sido detectadas anteriormente em nenhum tipo de geoprópolis.

Uma geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* do RN foi descrita por conter altos teores de fenóis e flavonoides, mas não houve uma análise detalhada para caracterização de seus constituintes individuais [30]. A geoprópolis analisada no presente trabalho é diferente de uma geoprópolis produzida por uma abelha de mesmo gênero, a *Scaptotrigona postica* do Maranhão [16]. Vale a pena observar que colônias de abelhas sem ferrão da mesma espécie ou de mesmo gênero podem produzir geoprópolis distintas uma da outra (como observado com *S. postica* do estado do Maranhão), enquanto abelhas filogeneticamente distintas (como *Scaptotrigona* e *Apis*) podem elaborar produtos com composição química similar. Essa observação leva à conclusão de que os fatores genéticos das abelhas desempenham um papel irrisório na escolha de fontes vegetais para a produção de geoprópolis e própolis. A disponibilidade de potenciais fontes de resina é provavelmente decisiva a este respeito.

A planta "jurema-preta" é interessante como matéria prima da própolis e geoprópolis devido à sua abundância na caatinga, mesmo durante os períodos severos de seca. Além disso, ela fornece tecidos frescos passíveis de serem mastigados pelas pequenas e relativamente delicadas mandíbulas do aparelho bucal das abelhas [31].

Perspectivas

As perspectivas favoráveis em relação as atividades biológicas são sugeridas pelo alto conteúdo de flavonóis e chalconas e a expressiva atividade antioxidante da geoprópolis de *S.* aff. *depillis* do RN. Além de muitas outras atividades biológicas, flavonóis como a quercetina e derivados de isoramnetina favorecem a prevenção da doença cardíaca coronária, bem como atividade antioxidante, hepatoprotetora, anti-inflamatória e efeitos anticancerígenos [32, 33]. As chalconas são flavonoides reconhecidos por possuírem muitas atividades, como

antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antitumoral, e atividades quimiopreventivas [29, 34-36].

CONCLUSÃO

A maior parte da própolis no comércio nacional e internacional deriva das abelhas. Algumas abelhas sem ferrão, no entanto, podem produzir própolis em montantes comercialmente viáveis, como é o caso da abelha "jataí" (*Tetragonisca angustula*), do nordeste do Brasil. Abelhas de *S.* aff. *depillis* revelam perspectivas promissoras de tornarem-se uma fonte relevante de geoprópolis comercial. A alta qualidade de sua geoprópolis produzida no semiárido é vista a partir dos resultados do presente trabalho, como o alto poder antioxidante e a predominância de flavonoides, incluindo um alto teor de chalconas. Tendo em conta as dificuldades econômicas e sociais que afligem a população do nordeste do Brasil, incluindo a população do RN, a implementação de ações estimulando a produção de própolis e de geoprópolis de *S.* aff. *depillis*, ambas derivadas de "jurema-preta", podem trazer benefícios para a economia local, principalmente durante as estações secas mais severas.

REFERÊNCIAS

[1] T. A. Heard, "The role of stingless bees in crop pollination," *Annual Review of Entomology*, vol. 44, pp. 183–206, 1999.

[2] R. P. Dutra, B. V. D. Abreu, M. S. Cunha et al., "Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* smith," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 12, pp. 2549–2557, 2014.

[3] R. P. Dutra, A. M. C. Nogueira, R. R. D. O. Marques, M. C. P. Costa, and M. N. S. Ribeiro, "Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada Maranhense, Brazil," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 4, pp. 557–562, 2008.

[4] V. Bankova, "Chemical diversity of propolis and the problem of standardization," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1-2, pp. 114–117, 2005.

[5] S. Huang, C.-P.Zhang, K.Wang, G. Q. Li, and F.-L.Hu, "Recent advances in the chemical composition of propolis," *Molecules,* vol. 19, no. 12, pp. 19610–19632, 2014.

[6] R. Silva-Carvalho, F. Baltazar, and C. Almeida-Aguiar, "Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development,"

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2015, Article ID 206439, 29 pages, 2015.

[7] M. J. A.M. Araújo, M. C. Búfalo, B. J. Conti et al., "Thechemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil," *Journal of Molecular Pathophysiology*, vol. 4, no. 1, pp. 12–20, 2015.

[8] M. G. Da Cunha, P. L. Rosalen, M. Franchin et al., "Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*," *Planta Medica*, vol. 82, no. 3, pp. 190–194, 2015.

[9] M. O. Freitas, F. A. F. Ponte, M. A. S. Lima, and E. R. Silveira, "Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19, no. 3, pp. 532–535, 2008.

[10] M. A. Sanches, A. M. S. Pereira, and J. E. Serrão, "Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini)," *Journal of Apicultural Research*, vol. 56, no. 1, pp. 50–57, 2017.

[11] P. M. Kustiawan, S. Puthong, E. T. Arung, and C. Chanchao, "In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines,"*Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, no. 7, pp. 549–556, 2014.

[12] S. Alves De Souza, C. A. Camara, E. Monica Sarmento da Silva, and T. M. S. Silva, "Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 801383, 5 pages, 2013.

[13] M. G. da Cunha, M. Franchin, L. C. D. Galvão et al., "Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 23, 2013.

[14] E. C. C. da Silva, M. P. Muniz, R. D. C. S. Nunomura, S. M. Nunomura, and G. A. C. Zilse, "Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees," *Química Nova*, vol. 36, no. 5, pp. 628–633, 2013.

[15] J. F. Campos, U. P. dos Santos, L. F. B. Macorini et al., "Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of própolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, no. 1, pp. 374–380, 2014.

[16] G. R. Coelho, R. Z. Mendonça, K.D. Vilar et al., "Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1),"

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2015, Article ID 296086, 10 pages, 2015.

[17] C. F. Massaro, M. Katouli, T. Grkovic et al., "Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of Corymbia torelliana (Myrtaceae)," *Fitoterapia*, vol. 95, no. 1, pp. 247–257, 2014.

[18] J. M. Ferreira, C. C. Fernandes-Silva, A. Salatino, G. Negri, and D. Message, "New propolis type from north-east Brazil: Chemical composition, antioxidant activity and botanical origin," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017.

[19] R. G. Woisky and A. Salatino, "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control," *Journal of Apicultural Research*, vol. 37, no. 2, pp. 99–105, 1998.

[20] "RTIQP: *Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis*", Portaria n. 3, Instrução Normativa n.3, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2001, http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/melpropolis.htm.

[21] A. A. Righi, T. R. Alves, G. Negri, L. M. Marques, H. Breyer, and A. Salatino, "Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, no. 13, pp. 2363–2370, 2011.

[22] B. Abad-García, L. A. Berrueta, S. Garmón-Lobato, B. Gallo, and F. Vicente, "A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by highperformance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry," *Journal of Chromatography* A, vol. 1216, no. 28, pp. 5398–5415, 2009.

[23] B. Portet, N. Fabre, R. Rozenberg, J.-L. Habib-Jiwan, C.Moulis, and J. Quetin-Leclercq, "Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry," *Journal of Chromatography* A, vol. 1210, no. 1, pp. 45–54, 2008.

[24] C. Engels, D. Gräter, P. Esquivel, V. M. Jiménez, M. G. Gänzle, and A. Schieber, Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionizationmass spectrometry," *Food Research International*, vol. 46, no. 2, pp. 557–562, 2012.

[25] J.-Y. Zhang, N. Li, Y.-Y. Che et al., "Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of Murraya paniculata by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass

spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, no. 5, pp. 950–961, 2011.

[26] M. G. Miguel, S. Nunes, S. A. Dandlen, A. M. Cavaco, and M. D. Antunes, "Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal," *Food Science and Technology*, vol. 34, no. 1, pp. 16–23, 2014.

[27] A. Daugsch, C. S. Moraes, P. Fort, and Y. K. Park, "Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 435–441, 2008.

[28] B. B. Silva, P. L. Rosalen, J. A.Cury et al., "Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 313–316, 2008.

[29] Z. Rozmer and P. Perj´esi, "Naturally occurring chalcones and their biological activities," *Phytochemistry Reviews*, 2014.

[30] J. B. Silva, K. M. Costa, W. A. Coelho et al., "Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* do Rio Grande do Norte," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 36, no. 9, pp. 874–880, 2016.

[31] A. Salatino and M. L. F. Salatino, "Why do honeybees exploit so few plant species as propolis sources?" *MOJ Food Processing & Technology*, vol. 4, no. 5, 3 pages, 2017.

[32] S. Kumar and A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, 2013.

[33] V. Georgiev, A. Ananga, and V. Tsolova, "Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals," *Nutrients*, vol. 6, n. 1, pp. 391–415, 2014.

[34] M.D. Awouafack, P. Tane,M. Spiteller, and J.N. Eloff, "Eriosema (Fabaceae) species represent a rich source of flavonoids with interesting pharmacological activities," *Natural Product Communications* (NPC), vol. 10, no. 7, pp. 1325–1330, 2015.

[35] N. K. Sahu, S. S. Balbhadra, J. Choudhary, and D. V. Kohli, "Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, n. 2, pp. 209–225, 2012.

[36] P. Singh, A. Anand, and V. Kumar, "Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 85, pp. 758–777, 2014.

[37] F. A. Silveira, G. A. R. Melo and E. A. B. Almeida. *Abelhas Brasileiras*: sistemática e identificação. Belo Horizonte, 253 p., 2002.

CAPÍTULO IV – JUREMA-PRETA (*Mimosa tenuiflora*) COMO FONTE DE RESINA DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Mimosa tenuiflora as resin source of propolis and geopropolis from the Brazilian Northeastern Semi-arid.

Artigo a ser submetido em língua inglesa no periódico

JOURNAL APICULTURAL RESERCH

Escrito de acordo com as normas técnicas do periódico

Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) como fonte de resina de própolis e geoprópolis do semiárido brasileiro

Joselena Mendonça Ferreira, Emília Cristina Pereira de Arruda,
Alleson Silva Fernandes de Lima, Antonio Salatino, Caroline Cristina Fernandes-Silva,
Giuseppina Negri, Ramiro Gustavo Valera Camacho, Kátia Peres Gramacho, Dejair Message

INTRODUÇÃO

As Abelhas desenvolveram uma maneira peculiar de se protegerem através de compostos secundários de vegetais. Estudos recentes com resinas coletadas e processadas por abelhas sem ferrão também têm mostrado que esse produto é bastante promissor (Cunha *et al*., 2015; Ferreira *et al*., 2017a). Dentre as propriedades relatadas em ambas, se destacam as atividades antioxidantes, antimicrobianas, imunoestimulante e antitumoral (Burdock, 1998; Coelho *et al.,* 2018; Cunha *et al*., 2015).

Recentemente verificou-se que um tipo de própolis e de geoprópolis encontradas no Rio Grande do Norte (RN), semiárido do Brasil, possuem muitos compostos fenólicos em sua constituição, apresentando alta atividade antioxidante, cor verde clara a escura e similaridade em seus compostos. Porém, foi verificado que a composição química destas amostras é totalmente distinta da própolis verde encontrada nas regiões sul e sudeste do país. Também foi verificado muitos compostos similares com aqueles encontrados nos ápices vegetativos de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae, Mimosoideae), uma planta conhecida localmente como “jurema-preta” (Ferreira *et al*., 2017a; Ferreira *et al*., 2017b).

Além do uso das técnicas de análise de composição química para avaliar a fonte botânica de amostras de própolis, a técnica de microscopia óptica, que compara os tecidos vegetais presentes na própolis com o de plantas presentes na região, tem sido utilizada com sucesso, obtendo resultados precisos quanto a fonte botânica desse material (Warakomska and Maciejewic, 1992; Oliveira and Bastos, 1998; Montenegro *et al*., 2001; Teixeira *et al.*, 2005). Embora essa técnica seja encontrada de maneira mais escassa nos trabalhos com própolis, quando comparada àquelas de caracterização química, ela contribui muito para caracterizar a origem de determinado tipo de própolis com maior confiabilidade e precisão.

M. tenuiflora é uma espécie resistente e abundante no bioma caatinga, um dos ecossistemas brasileiros mais negligenciados devido a sua característica semiárida e relativa pobreza de espécies (Zanella and Martins, 2003). Embora a maioria das plantas da caatinga

percam toda a sua folhagem durante a longa estação seca desse bioma, *M. tenuiflora* permanece com pequenas quantidades de brotos germinativos e pode frutificar durante esse período (Maia, 2004). É considerada uma espécie pioneira em áreas degradadas e a sua madeira é bastante apreciada na fabricação de carvão nas Américas (Leme, Cartwright and Gasson, 2010; Azevêdo *et al.,* 2012). Recentemente foi identificada como importante planta hospedeira para comunidades de fungos micorrízicos arbusculares do semiárido brasileiro (Souza *et al.*, 2016). Em cultos afro-brasileiros, no estado de Pernambuco, o chá de cascas da árvore é usado no tratamento de infecções e inflamações, além de possuir efeitos alucinógenos (Souza *et al.*, 2008).

As abelhas coletam néctar e pólen de *M. tenuiflora* (Maia-Silva *et al.*, 2012) e os apicultores e pesquisadores locais têm utilizado do conhecimento quanto a aspectos da fisiologia dessa planta para tornar a atividade mais rentável. Eles induziram o florescimento de plantas de *M. tenuiflora*, quando em estresse hídrico, com tratamentos que consistiam em regá-las com água em quantidades a partir de 500 litros. Essa técnica simples tem se tornado uma boa fonte de alimentação para as abelhas em épocas prolongadas de escassez de alimento (Silva *et al.*, 2015).

Tendo em vista as similaridades quanto a composição química da própolis e da geoprópolis verde da caatinga com *M. tenuiflora* e a importância desta planta no semiárido brasileiro, objetivou-se testar a hipótese de que ela seja a fonte majoritária de própolis e geoprópolis do semiárido, através de avaliação anatômica microscópica; bem como também reduzir a escassez de informação histológica a respeito desta espécie a partir do laminário de referência obtido nesta pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação do material

Três amostras de própolis verde de colônias de *Apis mellifera* e três amostras de geoprópolis verde de colônias de *Scaptotrigona* aff. *depillis* foram coletadas em áreas de caatinga. A primeira amostra de própolis foi coletada na Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), município de Mossoró, estado do RN (05º11'16"S 37º20'38"W), a segunda foi coletada no município de Alto do Rodrigues (5º15'21"S; 36º45'29"W) e a terceira no município de Lajes (5º42'31.5"S 36º13'56.9"W). Já as

três amostras de geoprópolis foram coletadas no município de Mossoró/RN (05º11'16"S 37º20'38"W). As amostras foram armazenadas em freezer para posterior análise microscópica.

Para a identificação da planta foi seguida a metodologia de Bankova et al. (2016), onde foram coletados folíolos jovens e maduros de *M. tenuiflora* (n = 5), bem como seus respectivos espécimes em floração. Estes foram coletados de pelo menos três indivíduos da mesma espécie em área de caatinga do município de Mossoró/RN. Em seguida foram etiquetados e armazenados em frascos de vidro âmbar contendo fixador FAA_{50}. Os espécimes de comprovação foram preparados e identificados como *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (syn *Mimosa hostilis* Benth.), pelo Prof. Dr. Ramiro Gustavo Valera Camacho da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Em seguida, foram depositados no Herbário Dárdano de Andrade Lima, (Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, RN, Brasil).

Laminário de referência

Para confecção de um laminário de referência da espécie *M. tenuiflora*, após a fixação em FAA_{50} (Johansen, 1940), as amostras de folíolos jovens e maduros dessa espécie (n = 5) foram desidratadas em série etanol-butanol (50-100%), infiltradas e emblocadas em parafina (Kraus and Arduin, 1997). Estas foram emblocadas e seccionadas com espessura de 8-10µm em um micrótomo rotativo Leica RM2125. Os cortes obtidos foram submetidos à dupla coloração com safranina e azul de Alcian e, posteriormente, montados e fixados com bálsamo do Canadá (Bukatsch, 1972).

Parte das amostras foi submetida também a técnica de dissociação que foi realizada com hipoclorito de sódio com concentrações que variaram entre 50-100%, dependendo da amostra (Bersier and Bocquet, 1960). As amostras foram clarificadas e lavadas com água destilada, coradas com safranina 1% em etanol 50% e montadas em glicerina 50% (Purvis, Collier and Walls, 1964), e em seguida foram submetidas ao teste com cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos (Johansen, 1940).

Laminário de tecidos vegetais encontrados na própolis e geoprópolis

Para a preparação das lâminas com material vegetal das amostras de própolis e geoprópolis foi utilizada a técnica convencional (Warakomska and Maciejewic, 1992), na qual é possível obter os componentes insolúveis da própolis a partir do sedimento, pois, as

partes com paredes celulares são relativamente preservadas por serem insolúveis em solventes orgânicos (Oliveira and Bastos, 1998).

Para isso, foi utilizado 0.5g de cada amostra (própolis e geoprópolis) em 15mL de etanol P.A., sendo feitas agitações e descansos ao longo de 12 horas. Após este tempo a suspensão foi centrifugada a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a mistura decantada foi ressuspendida com 13mL de etanol, passada por uma nova centrifugação, conforme procedimento anterior. Ao material decantado foram adicionados 12 mL de KOH a 10% e aquecido por 2 minutos à 100ºC, em banho maria. A seguir, ainda quente, a mistura foi sonificada por 5 minutos, centrifugada por 15 minutos a 2.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Após a resuspensão do sedimento com etanol P.A. parte do material foi utilizado para montagem de lâminas não permanentes, feitas em gelatina glicerinada. As estruturas vegetais encontradas e observadas ao microscópio óptico foram comparadas com as lâminas de referência, avaliando estruturas relevantes para a identificação das espécies, incluindo tricomas glandulares e tectores, entre outras estruturas morfo-anatômicas dos folíolos (Warakomska and Maciejewic, 1992).

Análise dos dados

Foram confeccionadas 20 lâminas de cada uma das amostras de própolis e de geoprópolis, bem como dos folíolos jovens e maduros de *M. tenuiflora*. Foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM500 com auxílio do software LAS EZ, utilizando ocular 10x e objetivas 40x.

RESULTADOS E DISCUSÃO

A partir do laminário de referência de *M. tenuiflora*, foi possível identificar que seus folíolos jovens (extraídos de ápices vegetativos) e maduros (extraídos de folhas maduras) apresentaram, em vista frontal, tricomas unicelulares tectores, tricomas glandulares do tipo captado e estômatos paracíticos, conforme apresentado na Figura 1. Estes últimos, estão relacionados a secreção e armazenamento de substâncias fenólicas de defesa da planta (Levin, 1973), dentre as quais os flavonoides se destacam, principalmente aqueles das classes flavonóis e chalconas.

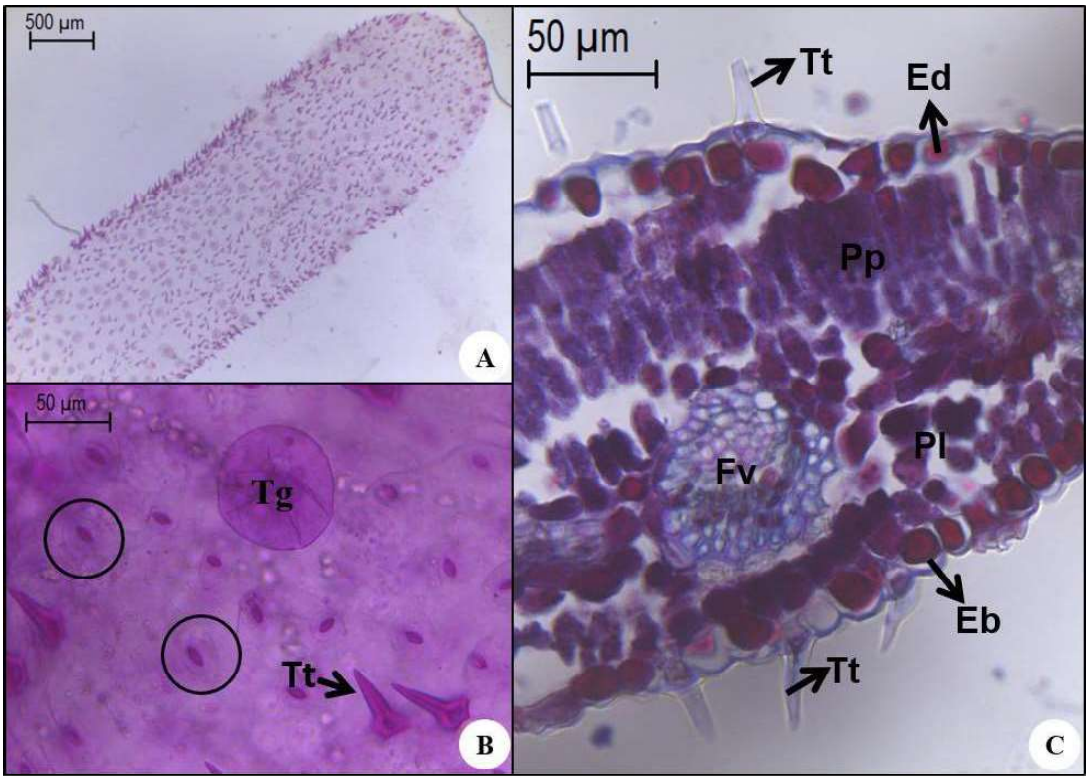

Figura 1. A e B. Vista frontal de folhas de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta). A. Aspecto geral do folíolo de *M. tenuiflora*. B. Detalhe de tricomas unicelulares tectores (setas) e estômatos paraciticos (círculo). Notar ainda tricoma glandular do tipo captado (Tg). C. Corte transversal do folíolo de *M. tenuiflora*. Notar epiderme contendo compostos fenólicos (Ed e Eb) e os tricomas tectores (Tt). Técnica: Inclusão em parafina. Coloração: Safranina e azul de Alcian (A, B e C) e teste com cloreto férrico (C). Estômatos paracíticos (Círculos); Tricoma glandular captado (Tg); Tricoma tector (Tt); Epiderme adaxial (Ed); Epiderme abaxial (Eb); Parênquima paliçádico (Pp); Parênquima lacunoso (Pl); Feixe vascular (Fv).

Nas lâminas de própolis de abelhas *A. mellifera* e de geoprópolis de abelhas *S.* aff. *depillis* da caatinga foi possível observar diversos folíolos de *M. tenuiflora* com tricomas tectores unicelulares e glandulares do tipo captado (Fig. 2). Na amostra de própolis foi possível identificar também os estômatos paracíticos (Fig. 2D e E). Muitos fragmentos dos tricomas glandulares foram encontrados em todas as amostras (Fig. 2A, B e D). Estes se desprenderam mais facilmente da epiderme foliar devido ao tratamento prévio que foram submetidos.

Os tricomas tectores estavam presentes em abundância e aderidos à epiderme dos fragmentos dos folíolos encontrados nas amostras de própolis e geoprópolis verde do semiárido (Fig. 2A, B, C e E). Não houve diferença morfológica significativa das estruturas entre os folíolos jovens e maduros analisados.

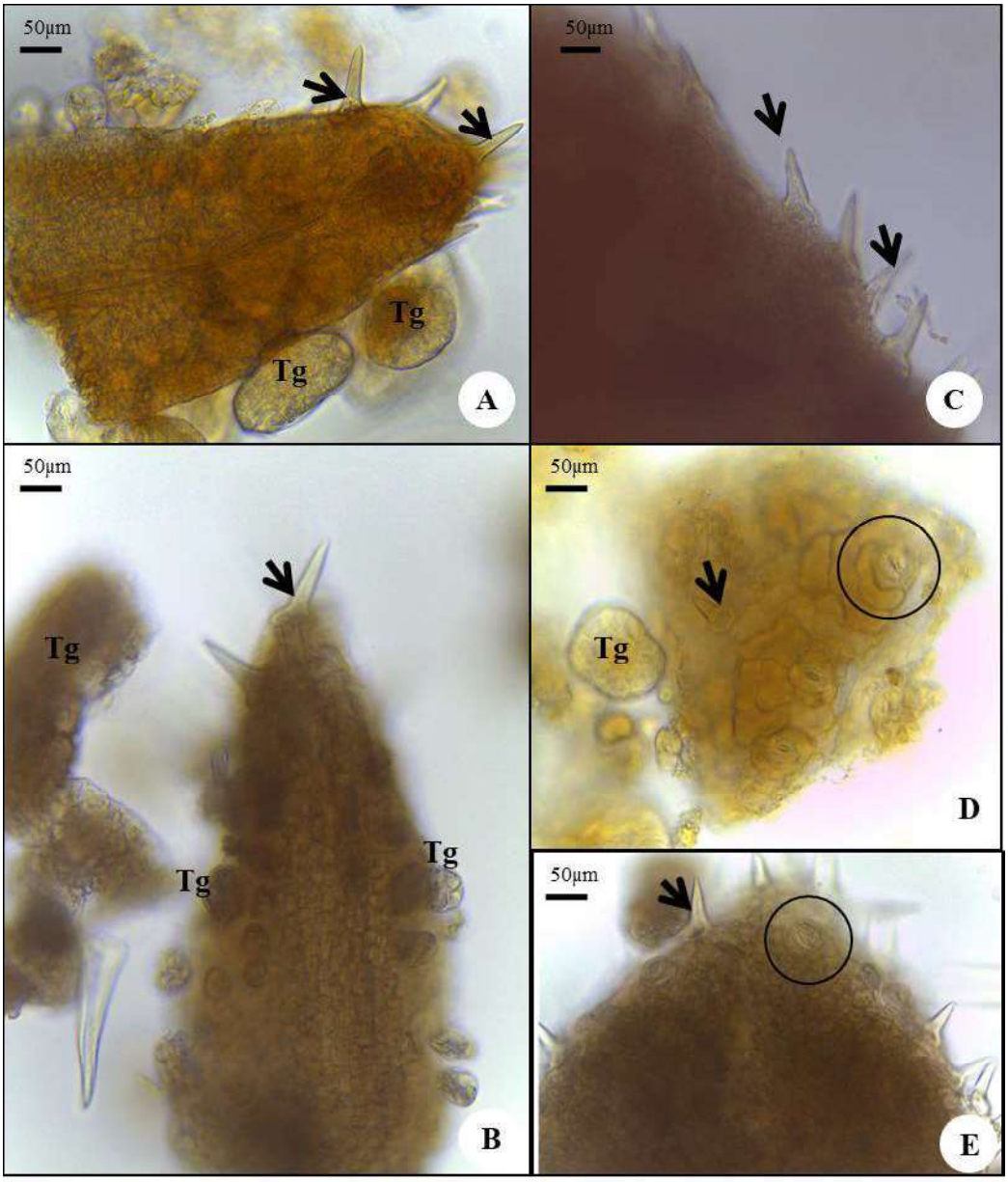

Figura 2. Folíolos de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) encontrados em amostras dissociadas de própolis e geoprópolis verde do semiárido, nos municípios de Mossoró, Lajes e Alto do Rodrigues, RN, Brasil. A e B. Aspecto do folíolo de *M. Tenuiflora* evidenciando o corte basal realizado pelas mandíbulas das abelhas, bem como seus tricomas tectores e glandulares. C. Detalhe da disposição dos tricomas unicelulares tectores (setas) na epiderme de *M. tenuiflora*. D e E. Detalhe dos estômatos paraciticos (círculos) da epiderme, tricomas glandulares captados (Tg) e tricomas unicelulares tectores (setas), idênticos ao da folha de *M. tenuiflora*. Técnica: Dissociação epidérmica. Estômatos paracíticos (círculos); Tricoma glandular captado (Tg); Tricoma tector (setas).

Foi possível observar a presença de fragmentos de folíolos e alguns tricomas soltos de outras espécies não identificadas nas amostras de própolis e de geoprópolis, mas esses foram menos frequentes.

É comum as abelhas escolherem plantas da família Leguminosae (Fabaceae) para produção de própolis. Por exemplo, *Acacia paradoxa* (Leguminosae, Mimosoideae) foi identificada como a fonte da própolis australiana (Tran *et al.*, 2012) e *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae, Faboideae) é a principal fonte da própolis vermelha brasileira e cubana (Piccinelli *et al.*, 2011). Essa escolha das abelhas está relacionada a produção de grandes quantidades de metabólitos secundários produzidos por esta família, principalmente do tipo flavonoides (Lima, Santos and La Porta, 2018).

Um exemplo de planta que, assim como *M. tenuiflora*, também possui tricomas glandulares com potencial de atrair abelhas é a *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), fonte da própolis verde das regiões sul e sudeste do país. Assim como *M. tenuiflora*, essa planta também possui uma epiderme repleta de tricomas glandulares específicos tanto na região abaxial, quanto na adaxial (Oliveira and Bastos, 1998), porém possuindo estômatos do tipo anomocíticos, tricomas tectores unicelulares ramificados e alguns sendo pluricelulares isolados (Budel *et al.*, 2004).

Em estudo recente, Barth e Freitas (2015) chegaram à conclusão que própolis e geoprópolis diferiram significativamente entre si em seus elementos acessórios, tendo a geoprópolis uma quantidade maior desses elementos (esporos de fungos, matéria orgânica amorfa, areia e argila). No entanto, em ambas foram encontrados tricomas vegetais e fragmentos de tecidos, embora na própolis tenha sido encontrado um percentual maior (Barth and Freitas, 2015). Esses dados corroboram com o presente trabalho, pois, fragmentos de *M. tenuiflora* foram encontrados em maior densidade nas lâminas de própolis quando comparado com as lâminas de geoprópolis.

Em trabalhos anteriores foi verificado que os 18 compostos fenólicos encontrados em extrato etanólico de ápices vegetativos de *M. tenuiflora* também estavam presentes em amostras de própolis verde do semiárido e 10 estavam presentes na geoprópolis (Ferreira *et al.*, 2017a; Ferreira *et al.*, 2017b). Outros seis compostos distintos foram encontrados na geoprópolis, mas não estavam presentes em *M. tenuiflora*. Essa diferença na composição química pode estar relacionada aos tipos de fontes variadas coletadas por abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona* aff. *depillis*) ou mesmo pela variação na disponibilidade de ápices de *M. tenuiflora* nas diferentes áreas em que foram coletadas. Variações na quantificação desses

compostos podem estar relacionadas a quantidade de folíolos disponíveis e, consequentemente, de estruturas glandulares utilizados para compor a própolis e geoprópolis do semiárido.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados anatômicos deste trabalho, pode-se concluir que jurema-preta (*M. tenuiflora*) é a principal fonte de resina para a fabricação de própolis e geoprópolis verde do semiárido brasileiro, corroborando com os resultados químicos obtidos anteriormente. As abelhas também agregam outros tipos de tecidos vegetais não identificados nas amostras de própolis e geoprópolis, porém, em menor densidade. Esse trabalho servirá como base para pesquisas futuras que visem o incentivo à apicultura local e a preservação de *M. tenuiflora*, espécie ainda pouco conhecida e endêmica do semiárido brasileiro.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

Azevêdo, S. M. et al. (2012) ‘Crescimento de plântulas de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Wild Poiret) em solos de áreas degradadas da caatinga’, *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, 9(3), pp. 150–160.

Bankova, V. et al. (2016) ‘Standard methods for *Apis mellifera* propolis research’, *Journal of Apicultural Research*. Taylor & Francis, 8839(October), pp. 1–49. doi: 10.1080/00218839.2016.1222661.

Barth, O. M. and Freitas, A. da S. de (2015) ‘Palynology as a Tool to Distinguish between Propolis and Geopropolis: Southern Brazilian Samples’, *OALib*, 02(12), pp. 1–10. doi: 10.4236/oalib.1102217.

Bersier, J.-D. and Bocquet, G. (1960) ‘Lés méthodes d´éclaircissement e vascularisation et en morphogéne végétales comparées’, *Archives des Sciences*, 13, pp. 555–566.

Budel, J. M. et al. (2004) ‘Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae Jane’, *Acta Farm. Bonaerense*, 23(4), pp. 477–483.

Bukatsch, F. (1972) ‘Bemerkungen zur doppelfärbung: Astrablau-Safranin’, *Mikrokosmos*, 61, p. 255.

Burdock, G. A. (1998) ‘Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)’, *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), pp. 347–363. doi: 10.1016/S0278-6915(97)00145-2.

Coelho, G. R. et al. (2018) ‘Antiviral Activity of Geopropolis Extract from *Scaptotrigona* aff. *postica* against Rubella Virus’, Journal of Food Research, 7(6), p. 91. doi: 10.5539/jfr.v7n6p91.

Cunha, M. G. et al. (2015) ‘Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris’*, *Planta Medica*. doi: 10.1055/s-0035-1558142.

Ferreira, J. M., Fernandes-Silva, C. C., Salatino, A., Message, D., et al. (2017) ‘Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin’, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. doi: 10.1155/2017/4024721.

Ferreira, J. M., Fernandes-Silva, C. C., Salatino, A., Negri, G., et al. (2017) ‘New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), pp. 3552–3558. doi: 10.1002/jsfa.8210.

Johansen, D. A. (1940) ‘*Plant microtechnique’*. 1st edn. Edited by I. McGraw-Hill Book Company. New York and London.

Kraus, E. J. and Arduin, M. (1997) ‘*Manual básico de métodos em morfologia vegetal’*. 1st edn. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Leme, C. L. D., Cartwright, C. and Gasson, P. (2010) ‘Anatomical changes to the wood of *Mimosa ophthalmocentra* and *Mimosa tenuiflora* when charred at different temperatures’, *IAWA Journal*.

Levin, D. A. (1973) ‘The Role of Trichomes in Plant Defense’, The Quarterly Review of Biology. doi: 10.1086/407484.

Lima, N. M., Santos, V. N. C. and La Porta, F. A. (2018) ‘Chemodiversity, bioactivity and chemosystematics of the genus Inga (FABACEAE): A brief review’, *Revista Virtual de Quimica,* 10(3), pp. 459–473. doi: 10.21577/1984-6835.20180035.

Maia-Silva, C. et al. (2012). ‘Guia de Plantas’. Acesso em: http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/livro_203.pdf%0A. Acesso em: 23 abr. de 2019.

Maia, G. N. (2004). ‘Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades’. 1st edn. Edited by GERDA NICKEL MAIA. São Paulo.

Montenegro, G. et al. (2001) ‘Botanical origin and seasonal production of própolis in hives of central Chile’, *Boletim de Botânica da Universidade de* São *Paulo*, 19, pp. 1–6.

Oliveira, V. C. and Bastos, E. M. (1998) ‘Aspectos Morfo-Anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis’, *Acta Botanica Brasilica*, 12(3), pp. 431–439. doi: https://doi.org/10.1590/S0102-33061998000400012.

Piccinelli, A. L. et al. (2011) ‘Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), pp. 6484–6491. doi: 10.1021/jf201280z.

Purvis, M. J., Collier, D. C. and Walls, D. (1964) *Laboratory techniques in botany.* 1st edn. London: Butterworths.

Santos Silva, A. et al. (2015) ‘Florescimento induzido da jurema preta para fornecer pólen à abelha melífera na estiagem da caatinga’, *Revista Caatinga*, 28(2), pp. 197-206.

Souza, R. S. O. et al. (2008) ‘Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): A review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology’, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), pp. 937–947. doi: 10.1590/S1516-89132008000500010.

Souza, T. A. F. et al. (2016) ‘Arbuscular mycorrhizal fungi in *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir from Brazilian semi-arid’, *Brazilian Journal of Microbiology*. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.023.

Teixeira, É. W. et al. (2005) ‘Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry’*, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), pp. 85–92. doi: 10.1093/ecam/neh055.

Tran, V. H. et al. (2012) ‘Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*’, *Phytochemistry.* Elsevier Ltd, 81, pp. 123–132. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.06.002.

Warakomska, Z. and Maciejewic, W. (1992) ‘Microscopic analysis of propolis from Polish regions’, *Apidologie*, 23(4), pp. 277–283.

Zanella, F. C. V. and Martins, C. F. (2003) ‘Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação’, in Leal, I. R., Tabarelli, M., and Silva, J. M. C. (eds) *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife: Editora Universitária UFPE, pp. 75–134.

APÊNDICE A – Artigo Primeiro: New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin

Research Article

Received: 11 August 2016 Revised: 27 December 2016 Accepted article published: 11 January 2017 Published online in Wiley Online Library: 8 February 2017

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.8210

New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin

Joselena M Ferreira,[a,†] Caroline C Fernandes-Silva,[a] Antonio Salatino,[a*] Giuseppina Negri[a,‡] and Dejair Message[b]

Abstract

BACKGROUND: Propolis is a bee product with wide diversity of biological activity. It has a complex composition, which is dependent on its botanical source. The present study aimed to determine the chemical profile, antioxidant activity and botanical origin of two samples of a propolis type from two locations of the state of Rio Grande do Norte (RN, north-east Brazil).

RESULTS: The standard chemical characteristics of the RN propolis are similar or superior to the internationally marketed Brazilian green propolis. RN propolis from two locations have high antioxidant activity, corresponding to 10% (municipality of Afonso Bezerra) and 13% (municipality of Alto do Rodrigues) of quercetin activity by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method and to 15% (both locations) by the β-carotene discoloration method. High-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)-electrospray ionization-tandem mass spectrometry analyses revealed that most constituents of the RN propolis are flavonoids, mainly flavonols and chalcones. HPLC-DAD analysis of ethanol extracts revealed a great similarity between the chemical profile of RN propolis and shoot apices of 'jurema-preta' (*Mimosa tenuiflora*, Leguminosae, Mimosoideae).

CONCLUSION: 'Jurema-preta' shoot apices are likely resin sources of RN propolis. The chemical characteristics and antioxidant property of RN propolis provide promising prospects for the introduction of this type of propolis into the apicultural market.
© 2017 Society of Chemical Industry

Keywords: *Mimosa tenuiflora*; propolis; HPLC-DAD-MS/MS; phenolic substances; flavonoids; chalcones

INTRODUCTION

Propolis is a honeybee product with a complex composition. Beeswax and plant resins are major constituents of propolis. Other materials normally found in propolis are pollen, sugars and amino acids. The medicinal uses of propolis date back to the ancient Egyptians, Greeks and Romans. Over the last few decades, interest in propolis has increased considerably in several parts of the world as a result of the publication of scientific evidence revealing that propolis has diverse properties beneficial to health, including antioxidant, antimicrobial, immune-stimulating and anti-tumoral effects.[1] The biological properties of propolis are a result of substances present in the plant material (resin) collected by honeybees. Propolis in the hive is considered to reduce the risk of disease and parasite transmission through the colony.[2] In several countries, propolis is an important raw material in the manufacture of food and hygiene products (e.g. toothpaste, soap and shampoo). It has been advocated that some propolis constituents (e.g. caffeic acid phenethyl ester from European propolis and artepillin c from green Brazilian propolis) may have use as lead compounds in modern medicines.[3]

The composition of propolis is dependent on the plant species used as a resin source. Honeybees exhibit a marked preference for some plant species with respect to propolis production. For example, most of the propolis produced in south-east Brazil belongs to the green type derived from buds of *Baccharis dracunculifolia* DC.[4,5] Commercially, Brazilian green propolis ranks among the most important in the world, being exported to China, Japan and Germany. Another commercially important Brazilian propolis is the red type from the littoral of the north-east Brazil, which is derived from exudates of *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub.[6]

Data concerning chemical composition are also available for propolis from other Brazilian North-eastern states, such as Piauí and Bahia,[7] as well as from Ceará.[8] To our knowledge, nothing has been published about the chemistry of propolis from Rio Grande do Norte (RN), a state in the most eastern part of South America. It is situated in the Brazilian semi-arid 'drought polygon',[9] a north-eastern region with serious social and economic problems, which, for centuries, have ranked among the worst in the

* *Correspondence to: A Salatino, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Rua do Matão 277, BR-05508-090, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: asalatin@ib.usp.br*

† *Current address: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil*

‡ *Current address: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Psicobiologia, São Paulo, SP, Brazil*

a *Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, SP, Brazil*

b *Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil*

country.[10] The typical vegetation of the area is exclusive and is referred to as caatinga, a dry forest dominated by small spiny trees and shrubs, euphorbs and cacti.

Bee keeping is economically important in RN. However, propolis production is still neglected by most local apiculturists. This is unfortunate, especially considering that the peak of propolis production in the area takes place during the drier months, when farming and cattle ranching are hampered. To introduce RN propolis into the apiculture market, several procedures are necessary, including the determination of standard parameters (odor, color, texture, total phenolic substances, total flavonoids), analysis of the chemical profile, evaluation of biological activity and identification of the plant source. It has been speculated that, in north-east Brazil, an abundant and hardy leguminous plant, popularly known as 'jurema-preta' might represent the botanical origin of the local propolis.

The present study aimed to determine standard parameters, characterize chemical constituents and evaluate the biological activity of propolis samples from the apiaries of two municipalities in RN, in addition to testing the hypothesis that 'jurema-preta' is their resin source.

MATERIALS AND METHODS

Collection of propolis and plant material

Propolis samples were collected in apiaries located in the municipalities of Afonso Bezerra (5°29′45.7′′S; 36°31′10.3′′W) in February 2014, during a prolonged dry period, and Alto do Rodrigues (5°15′21′′S; 36°45′29′′W) in June/July 2013. Both apiaries were surrounded by caatinga vegetation, affected by the invasion of the Asiatic *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Leguminosae, Mimosoideae) and areas of melon plantation. The samples were obtained from Langstroth rational hives of Africanized *Apis mellifera* L. Samples were collected in Alto do Rodrigues in June/July 2013, and in Afonso Bezerra in February 2014, amidst a prolonged dry period. The method to stimulate propolis production was a system of wooden battens (370 × 20 × 20 mm) on the front and back of the boxes, between the super and the hive, maintaining a gap of 20 cm on both sides. The samples were collected by scraping the product accumulated in the gaps on both sides. Propolis deposited in other parts of the hive was ignored. The samples were placed inside non-toxic plastic bags and kept in freezer. Shoot apices and flowering specimens of 'jurema-preta' were collected in a caatinga area in the municipality of Afonso Bezerra. The apices were air dried and kept in freezer inside plastic bags. Voucher specimens were prepared and deposited in the SPF Herbarium (Department of Botany, University of São Paulo, Brazil). The species was identified by Dr Luciano Paganucci de Queiroz (State University of Feira de Santana, state of Bahia, Brazil) as *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (syn. *Mimosa hostilis* Benth.).

Preparation of ethanol extracts

Propolis samples from both localities were powdered using liquid nitrogen, mortar and pestle. Triplicates of 10 g of propolis from each locality were treated with 150 mL of ethanol in Soxhlet for 6 h. The extracts were filtered and kept overnight in dark vials in freezer at −20 °C. The extract was filtered again to eliminate wax excess. Dried apices of 'jurema-preta' were also powdered with liquid nitrogen in a mortar and pestle. A portion of 1 g of the powder was extracted in Soxhlet with ethanol for 6 h. For high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/DAD) and HPLC-DAD-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analyses, aliquots of extracts from propolis of both localities and jurema-preta apices were evaporated to dryness under nitrogen flow and the residue dissolved in methanol to obtain solutions at 10 mg mL^{-1}.

Standard chemical parameters

For determination of total solids and wax, pooled extracts from each locality were used. The solvent was evaporated to dryness under nitrogen flow and weighed for determination of total solids. The content of wax was also determined using pooled extracts. Triplicates of samples from each locality were used for determination of the contents of total phenolic substances and total flavonoids: the former by the method of Folin–Ciocalteau and the latter by the method of aluminum chloride. The procedures are described elsewhere.[11] *p*-Coumaric acid was used as reference for the determination of total phenolic substances, and quercetin for total flavonoids.

Antioxidant activity

Procedures employing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and *β*-carotene discoloration (*β*-carotene/linoleic acid) were carried out with triplicate samples from each locality as described previously,[12] with some modifications. For the former method, methanol solutions were prepared at 15, 30, 45 and 60 μg mL^{-1} of the propolis extracts. Methanol solutions of quercetin at 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 and 30.0 μg mL^{-1} were used as reference. For the *β*-carotene/linoleic acid method, methanol solutions at 40, 80 and 120 μg mL^{-1} of the extracts and quercetin methanol solutions at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 μg mL^{-1} were used. Methanol was used as blank for both methods. The results are expressed as EC_{50} (μg mL^{-1}).[13]

HPLC/DAD and HPLC-DAD-ESI-MS/MS analyses

The methanol extracts of both propolis samples were purified through 0.45-μm filters. An aliquot of 5 μL of the solutions of the two samples of 'jurema-preta' apices was analyzed with a HPLC HP 1260 chromatograph (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with a diode array detector, using a Zorbax 5B-RP-18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) at 40 °C. The solvents used were 0.1% acetic acid (A) and methanol (B), with the B concentration gradient: 0–10 min, 10–20%; 10–20 min, 20–40%; 20–30 min, 40–50%; 30–38 min, 50–60%; 38–47.9 min, 60%; 47.9–48 min, 60–65%; 48–55 min, 65–70%. The flow rate was set at 0.5 mL min^{-1} and the column temperature was 40 °C. The diode array detector was adjusted for detection at 254 and 352 nm.

The constituents of the two propolis samples were characterized using 10 μL of the filtered solution and the technique HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The equipment used was a DADSPD-M10AVP chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), equipped with a degasser, two LC-20 AC pumps, a CTO-20A column oven, a SIL 20 AC auto-injector and a SPD-20A diode array detector, adjusted to operate at 254 and 352 nm. The chromatograph was coupled to an Esquire 3000 Plus mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), equipped with a quadrupole ion trap mass analyzer. All hardware components were controlled by CBM-20A software (Shimadzu Corp.). The analyses were run with a reverse phase column Gemini C-18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (4.6 × 250 mm, 5 μm), protected by a guard column. The solvents, gradient program and flow rate used were the same as described above. The full scan mass acquisition was performed

 © 2017 Society of Chemical Industry

Table 1. Chemical parameters (g kg^{-1}) of samples of green propolis from two localities of the state of Rio Grande do Norte (north-east Brazil) and official limits by TRPIQ

Propolis location	Soluble solids	Wax	Total phenolic substances	Total flavonoids
Afonso Bezerra	530	54	137 ± 3.2 a	117 ± 1.4 a
Alto do Rodrigues	544	81	143 ± 1.6 a	94 ± 2.3 b
TRPIQ	Minimum 350	Maximum 250	Minimum 50	Minimum 5

The same lowercase letters within a column indicate that the means are not significantly different.

using electrospray ionization in the positive ionization mode by scanning in the *m/z* range 100–1200. Helium was used as collision and nitrogen as nebulizing gas, respectively. Nebulization was aided with a coaxial nitrogen sheath gas provided at a pressure of 27 psi. Desolvation was assisted using a counter current nitrogen flow set at 7.0 L min^{-1} flux and a capillary temperature of 320 °C. The data dependent MS/MS events were performed on the most intense ions detected in MS full scan. Maximum accumulation time of the ion trap and the numbers of MS to obtain the MS average spectra were set at 30 and 3 MS, respectively.

All compounds were characterized by interpretation of the respective ultraviolet (UV) and mass spectra, MS literature data and on-line chemical databases Scifinder® (http://www.scifinder.org), Reaxys® (http://www.reaxys.com), Riken MSn Spectral database for Phytochemicals (Respect) (http://www.reaxys.riken.jp), Phenol-Explorer (http://phenol-explorer.eu), Chem.Spider (http://www.chemspider.com) and HMDB (http://www.hmdb.ca). Quercetin was identified by direct comparison with a standard.

Flavonols were characterized by UV-visible bands at 345–360 nm (band I) and 250–280 nm (band II); flavones by bands at 330–345 nm (band I) and 254–272 nm (band II); chalcones by band I at 370 nm; and dihydroflavonols and dihydroflavones by bands at 328 and 290 nm.[14] In addition to molecular ions, MS characterization of flavonoids were based on fragments generated by the Retro-Diels–Alder reaction, providing data about the numbers and types of substituents on the A and B rings.[15–17] Whenever possible, compound characterization relied on fragmentation by both negative and positive ionization modes and literature data were used to add in the characterization of phenylpropanoids and flavonoids.[18,19] Methoxylated flavonoids yielded fragments generated by loss of methyl radicals.[19,20] A rhamnosyl glycoside was characterized on the basis of the loss of rhamnose. Violanthin was characterized by comparison of MS spectrum with the literature.[21] Chalcones characterization relied on their characteristic long UV length Band I (365–370 nm) and fragments obtained by losses of hydroxyvynyl benzenes generated by the Retro-Diels–Alder reaction.[17–19,22] The corresponding isomeric flavonones with similar MS spectra were characterized by the shorter UV length Band I (340 nm).

Statistical analysis

The significance of the differences between means of standard chemical parameters and antioxidant activity were evaluated using Student's *t*-test.

RESULTS

Standard chemical parameters and antioxidant activity

Propolis from both localities have a green color. The samples from Alto do Rodrigues have a darker hue than those from Afonso Bezerra. All samples are odorless, with a relatively moldable texture and resinous taste. Table 1 gives the contents of soluble solids, wax, total phenolic substances and total flavonoids, as well as the respective Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis (TRPIQ) limits,[23] with respect to the physical and chemical characteristics of propolis produced in Brazil. The sample from Afonso Bezerra has a lower content of wax and a higher content of flavonoids compared to the sample from Alto do Rodrigues.

Table 2. Antioxidant activity (EC_{50}, μg mL^{-1}), evaluated by two methods, of samples of green propolis from two municipalities of Rio Grande do Norte (north-east Brazil) and quercetin

Samples	DPPH	β-carotene discoloration
Afonso Bezerra	56.2 ± 0.4 a	101.1 ± 2.7 a
Alto do Rodrigues	72.9 ± 0.3 b	106.4 ± 4.0 a
Quercetin	7.4 ± 0.1 c	15.5 ± 2.9 b

The same lowercase letters within a column indicate that the means are not significantly different.

Antioxidant activity

The EC_{50} values of antioxidant activity of the two propolis samples are shown in Table 2, together with the EC_{50} values of quercetin solutions. The capacity of the sample from Afonso Bezerra to sequester the DPPH radical was higher than the sample from Alto do Rodrigues but, regarding β-carotene discoloration, the capacity of propolis from both locations is not significantly different. The activity of the propolis samples to sequester the DPPH radical corresponds to approximately 10% (Alto do Rodrigues) and 13% (Afonso Bezerra) of the activity of pure quercetin. Regarding the method of β-carotene discoloration, the activity of the two samples is close to 15% of the activity of quercetin.

Constituents of propolis samples and apices of 'jurema-preta'

The chemical profiles of the propolis samples of the two locations and of the plant apices are very similar (Fig. 1). Differences were noted only regarding the relative abundances of the constituents of the extracts. Only phenolic compounds were characterized as constituents of the analyzed extracts of propolis and plant apices (Table 3). With the exception of compound **1** (a phenylpropanoid), all other constituents are flavonoids. Compounds **3**, **6** and **18** are flavones; among them, **3** is a di-*C*-glycoside and the others are aglycones. Compounds **2**, **4**, **5**, **8**, **9** and **12–15** are flavonols; the first two are glycosides and the others are aglycones. Compound **11** is a flavonone. An important chemical characteristic of the propolis samples analyzed are chalcones: among the constituents detected in the samples analyzed, four (**7**, **10**, **16** and **17**) correspond to this flavonoid category. Compound **17** is apparently the

 © 2017 Society of Chemical Industry

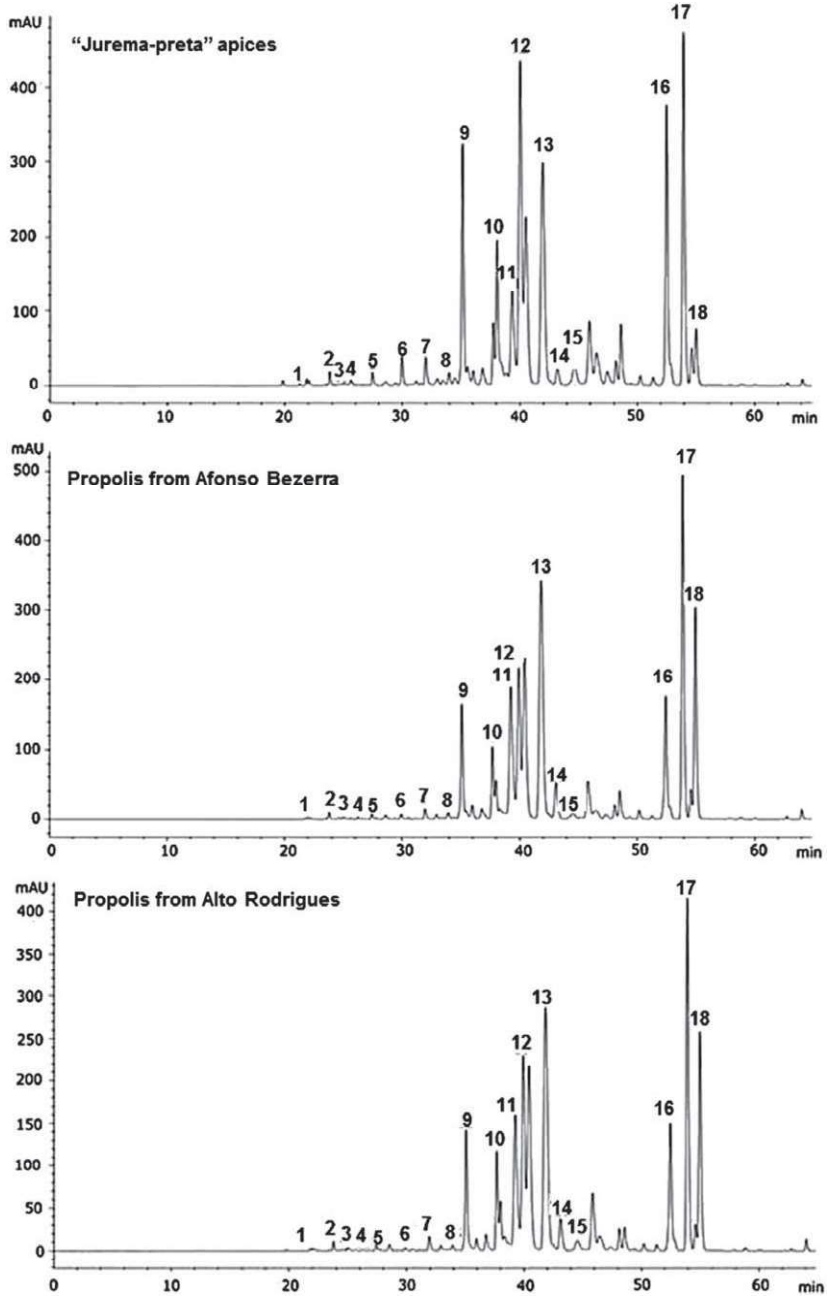

Figure 1. HPLC chromatograms of ethanol extracts of shoot apices of 'jurema-preta' [*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., Leguminosae, Mimosoideae] and propolis samples from two localities of Rio Grande do Norte (north-east Brazil).

most abundant constituent of both propolis samples analyzed (Fig. 1).

DISCUSSION

Standard chemical parameters and antioxidant activity

RN green propolis has organoleptic and physical characteristics distinct from other types of Brazilian propolis. The chemical parameters regarding the contents of wax, soluble residue, total phenolic substances and total flavonoids comply with the TRPIQ standards of quality. The data in Table 1 indicate that the two proplis samples have highly positive standard chemical characteristics, such as a low wax content and a high content of phenolic substances (corresponding to approximately 25% of the soluble solids) and a high flavonoid content (approximately 70% of the total phenolic substances). Contents in the range 88–126 g kg^{-1} and 8–27 g kg^{-1} of total phenolic substances and flavonoids, respectively, have been reported for south-east Brazilian green propolis.[11] These values are lower than the respective data from RN propolis (Table 1). The wax contents reported for south-east Brazilian green propolis (46–78 g kg^{-1})[11] are similar to the data of Table 1.

Among the constituents of propolis, most compounds with biological activity are phenolic substances. For example, pinocembrin (constituent of European propolis) is active toward a diversity of biological effects.[24] Chrysin is a relevant biologically active flavone from Chinese propolis.[25] Regarding the phenylpropanoids from

 © 2017 Society of Chemical Industry

© 2017 Society of Chemical Industry

Table 3. Distribution of phenolic substances in apices of 'jurema-preta' [*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir., Leguminosae, Mimosoideae] and propolis samples from Afonso Bezerra (Af. Bez.) and Alto do Rodrigues (Alt. Rodr.), two municipalities from the state Rio Grande do Norte (north-east Brazil), as characterized by HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis or comparison with standard

Compound number	Rt	UV (nm)	MS^- (*m/z*, %)	MS^+ (*m/z*, %)	Proposed characterization	Reference/standard used
1	21.2		197 $[M-H]^-$		Trihydroxy-dihydrocinnamic acid	19,20
2	23.8	260, 300 sh, 355	539 $[M-H]^{-1}$, 521 (10), 387 (100)		Pentahydroxy-flavone-malonyl gallate	19,20
3	24.7	270, 335	577 $[M-H]^-$		Violanthin	21
4	25.6	255, 370	463 $[M-H]^-$		Myricetin-3-*O*-rhamnoside	19,20
5	27.5	255, 355	629 $[M-H]^-$		Isorhamnetin-3-*O*-glucosylgallate	19,20
6	29.9	270, 340	369 $[M-H]^-$		Prenyl-pentahydroxy-flavone	–*
7	31.9	255, 370	285 $[M-H]^-$	287 $[M+H]^+$, 167	Dihydroxy-methoxy chalcone	17–19,22
8	33.9	260, 365	303 $[M-H]^-$, 183	301 $[M+H]^+$	Quercetin	Standard
9	35.1	260, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 302 (40)	Quercetin-methyl ether	19,20
10	38.1	270, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 197 (100)	Trihydroxy-dimethoxy chalcone	17–19,22
11	39.3	270, 340	285 $[M-H]^-$	287 $[M+H]^+$, 167	Dihydroxy-methoxy flavanone	19,20
12	40.02	260, 360	299 $[M-H]^-$	323 $[M+Na]^+$, 301 $[M+H]^+$, 286	Kaempferol-methyl ether	19,20
13	41.9	250, 270sh, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$, 316	Quercetin-dimethyl ether	19,20
14	43.2	255, 355	313 $[M-H]^-$	337 $[M+Na]^+$, 315 $[M+H]^+$, 300 (60), 282 (100)	Kaempferol-dimethyl ether	19,20
15	48.6	255, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$	Quercetin dimethyl ether	19,20
16	52.4	370	269 $[M-H]^-$	271 $[M+H]^+$, 161 (100), 137 (70)	Methoxy-dihydroxychalcone	17–19,22
17	53.9	370	299 $[M-H]^-$	301 $[M+H]^+$, 167	Dimethoxy-dihydroxychalcone	17–19,22
18	55.0	270, 340	343 $[M-H]^-$	367 $[M+Na]^+$, 345 $[M+H]^+$, 345	Dihydroxy-trimethoxyflavone	17–19,22

*Tentative characterization based on UV spectrum and molecular ion. Rt, retention time.

propolis, a high diversity of effects has been attributed to caffeic acid phenethyl ester from European propolis[26] and artepillin C from Brazilian green propolis.[2] Flavonoids and other propolis phenolic constituents are strong antioxidant substances.[27] The chemistry of Bolivian propolis comprises two patterns: either highly phenolic or highly triterpenoidal. The former have high antioxidant and antibacterial activities, whereas the latter are weakly active.[20] Similar results were obtained for Brazilian propolis.[27] Anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antioxidant, cytotoxic, antitumoral and chemopreventive activities of chalcones have been recognized.[28–32]

Taking these comments into consideration, the results of the present study indicate that the green RN propolis is a promising apicultural product, with a low content of wax and a high content of phenolic substances, mostly chalcones and other flavonoids (Table 1). Accordingly, the two samples possess high antioxidant activity (Table 2). The product from Afonso Bezerra has a lower wax and higher flavonoid content (Table 1), as well as a higher radical scavenging activity (Table 2), than the sample from Alto do Rodrigues.

Chemical constituents and botanical origin

A peculiarity of the chemical profile of the samples analyzed is the relatively high content of chalcones. Such metabolites are biosynthetic precursors of other flavonoid classes. However, they rarely accumulate in plant tissues. In particular, dihydrochalcones are uncommon in natural sources.[32] Frequent resin sources for propolis are Leguminosae species, such as 'jurema-preta' (present work) and *Acacia paradoxa* (Leguminosae, Mimosoideae).[33]

Chemical analyses are crucial for determination of the botanical origin of propolis.[34] The similarity of the chromatograms of the propolis and plant apices shown in Fig. 1 is strong evidence indicating that 'jurema-preta' is a major resin source of RN green propolis. Both the botanical origin and chemical composition set apart the green propolis analyzed in the present study from all other types of Brazilian propolis. Screenings aiming to characterize propolis from distinct regions of Brazil have reported no chemical profiles similar to RN propolis.[7,35]

In Brazil, *M. tenuiflora* occurs in most states of the drought polygon and in Minas Gerais (south-east). Outside Brazil, it occurs in Venezuela, Colombia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Panama and southern Mexico.[36] 'Jurema-preta' has been used in rituals by native Brazilian indians.[37] The bark of 'jurema-preta' is the main ingredient of jurema-wine, a psychedelic drink used in Afro-Brazilian rituals and entheogen cults.[38,39] The main active substance in 'jurema-preta' bark is dimethyltryptamine.[40] However, nitrogen-containing compounds were not detected in either the apices or the propolis extracts (Table 3). 'Jurema-preta' has been reported to have toxic effects in bovines, sheep and goats,[41] although its pollen is nontoxic to *A. mellifera* and is a relevant resource in the Brazilian semi-arid for honeybee nourishment.[42]

Taking into consideration the biological activity of flavonoids, including chalcones, the results of the present study suggest that RN green propolis has promising prospects in the apicultural market. The implementation of actions aiming to stimulate the production of propolis in RN might afford benefits to the local economy, particularly during the harsher dry seasons.

ACKNOWLEDGEMENTS

The presente work was supported by FAPESP (grants 2013/07308-0 and 2013/21813-0). AS is research fellow of CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

REFERENCES

1 Burdock GA, Review of the biological properties and toxicicty of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* **36**:347–363 (1998).
2 Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA and Salatino MLF, Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* **28**:925–936 (2011).
3 Sforcin JM and Bankova V, Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmac***133**:253–260 (2011).
4 Salatino A, Teixeira EW, Negri G and Message D, Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:33–38 (2005).
5 Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D and Salatino A, Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:85–92 (2005).
6 Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A *et al.*, Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* **5**:313–316 (2008).
7 Righi AA, Negri G and Salatino A, Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:267878 (2013).
8 Albuquerque IL, Alves LA, Lemos TLG, Monte FJQ and Braz Filho R, Canaric acid (3,4-seco-lupane derivative) isolated from propolis of Ceará. *Quimica Nova* **30**:828–831 (2007).
9 Crocitti JJ and Vallance MM, *Brazil Today*. ABC-CLIO, Santa Barbara (2012).
10 Alves J, *História das secas*, 2nd edn. Fundação Guimarães Duque/ESAM, Mossoró (1982).
11 Woisky RG and Salatino A, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* **37**:99–105 (1998).
12 Righi AA, Negri G, Marques LM, Breyer H and Salatino A, Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* **91**:2363–2370 (2010).
13 Sun LP, Chen AL, Hung HC, Chien YH, Huang JS, Huang CY *et al.*, Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* **60**:11748–11758 (2012).
14 Markham KR, *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London (1982).
15 Abad-Garcia B, Berrueta LA, Garmon-Lobato S, Gallo B and Vicente F, A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* **28**:5398–5415 (2009).
16 Engels C, Gräter D, Esquivel P, Jiménez VM, Gänzle MG and Schieber A, Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatograpgy/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Res Int* **46**:557–562 (2012).
17 Portet B, Fabre N, Rozenberg R, Habib-Jiwan JL, Moulis C and Quetin-Leclercq J, Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromat A* **1210**:45–54 (2008).
18 Zhang JY, Che YY, Zhang Y, Liang SX, Zhao YJ and Tu PF, Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **56**:950–961 (2011).
19 Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M and Swierczek-Zieba G, Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* **19**:78–101 (2014).
20 Nina N, Quispe C, Jimenez-Aspee F, Theoduloz C, Gimenez A and Schmeda-Hirschmann G, Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *J Sci Food Agricult* **96**:2142–2153 (2016).
21 Vukics V, Toth BH, Ringer T, Ludanyi K, Kery A, Bonn GK *et al.*, Quantitative and qualitative investigation of the main flavonoids in heartsease (*Viola tricolor* L.). *J Chromatogr Sci* **46**:97–101 (2008).
22 Popova M, Bankova V, Spassov S, Tsvetkova I, Naydenski C, Silva MV *et al.*, New bioactive chalcones in propolis from El Salvador. *Z Naturforsch C* **56**:593–596 (2001).
23 Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis, *Portaria n. 3, Instrução Normativa n. 3, 19/01/2001*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília (2001).

 © 2017 Society of Chemical Industry

24 Liu R, Wu C, Zhou D, Yang F, Tian S and Zhang L, Pinocembrin protects against β-amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *BMC Med* **10**:105 (2012).

25 Sun LP, Chen AL, Hung HC, Chien YH, Huang JS, Huang CY *et al.*, Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* **60**:11748–11758 (2012).

26 Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ and Abdel-Naim AB, Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* **65**:699–709 (2013).

27 Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A and Stringheta PC, Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med* **7**:307–315 (2010).

28 Ni LM, Meng DQ and Sikorski JA, Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin Ther Patents* **14**:1669–1691 (2004).

29 Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J and Kohli DV, Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr Med Chem* **19**:209–225 (2012).

30 Singh P, Anand A and Kumar V, Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *Eur J Med Chem* **85**:758–777 (2014).

31 Rozmer Z and Perjesi P, Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem Rev* **15**:87–120 (2016).

32 Awouafack MD, Tane P, Spiteller M and Eloff JN, *Eriosema* (Fabaceae) species represent a rich source of flavonoids with interesting pharmacological activities. *Nat Prod Commun* **10**:1325–1330 (2015).

33 Tran VH, Duke RK, Abu-Mellal A and Duke CC, Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry* **81**:126–132 (2012).

34 Bankova V, Castro SL and Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**:3–15 (2000).

35 Fernandes-Silva CC, Salatino A and Salatino MLF, Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Quim Nova* **36**:237–240 (2013).

36 US National Plant Germplasm System, *Taxon:* Mimosa tenuiflora *(Willd.) Poir* (2003). [Online]. Available: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?24430 [28 July 2016].

37 Souza RSO, Ulysses PA, Albuquerque UP, Monteiro JM and Amorim ELC, Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* [Wild.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz Arch Bio Techn* **51**:937–947 (2008).

38 Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG *et al.*, Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* **114**:325–354 (2007).

39 Gaujac A, Martinez ST, Gomes AA, Andrade SJ, Pinto AC, David JM *et al.*, Application of analytical methods for the structural characterization an purity assessment of *N,N*-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. *Microchem J* **109**:78–83 (2013).

40 Gaujac A, Aquino A, Navickiene S and Andrade JB, Determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC-MS. *J Chromat B* **881/882**:107–110 (2012).

41 Bezerra CWC, Medeiros RMT, Rivero BRC, Dantas AFM and Amaral FRC, Plant poisoning in ruminants and horses in Southern Ceara, Northeastern Brazil. *Cienc Rural* **42**:1070–1076 (2012).

42 Silva CV, Mesquita LX, Maracaja PB and Soto-Blanco B, Toxicity of *Mimosa tenuiflora* pollen to Africanized honey bees (*Apis melífera* L.). *Acta Sci Vet* **38**:161–163 (2010).

 © 2017 Society of Chemical Industry

APÊNDICE B – Artigo Segundo: Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2017, Article ID 4024721, 6 pages
https://doi.org/10.1155/2017/4024721

Research Article

Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin

Joselena M. Ferreira,[1] Caroline C. Fernandes-Silva,[2] Antonio Salatino,[2] Dejair Message,[1] and Giuseppina Negri[3]

[1]*Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil*
[2]*Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*
[3]*Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to Antonio Salatino; asalatin@ib.usp.br

Received 30 May 2017; Revised 27 September 2017; Accepted 8 October 2017; Published 31 October 2017

Academic Editor: Kuttulebbai N. S. Sirajudeen

Copyright © 2017 Joselena M. Ferreira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Geopropolis is a product containing wax, plant resin, and soil particles. It is elaborated by stingless bees of tribe Meliponini. Methanol extracts of sample of geopropolis produced by *Scaptotrigona postica* ("mandaguari") in the state of Rio Grande do Norte (RN, northeast Brazil) were analyzed for the determination of standard parameters (total phenols, total flavonoids, and radical scavenging activity) and chemical characterization by HPLC-DAD-MS/MS analysis. The sample analyzed has high contents of total phenols and flavonoids, as well as high antioxidant activity. The constituents characterized were mainly flavonols, such as quercetin methyl ethers, and methoxychalcones. Such chemical profile is similar to the composition of a green propolis from the same area of RN, which is produced by Africanized *Apis mellifera*, using shoot apices of *Mimosa tenuiflora*, popularly known as "jurema-preta." This finding provides evidence that "mandaguari" geopropolis and honeybee propolis have the same botanical origin in RN. The sharing of a plant resin source by phylogenetically distant bees (Apinae and Meliponinae) suggests that bee genetic factors play little role in the choice of plants for resin collection and that the availability of potential botanical sources plays a decisive role.

1. Introduction

Apidae and Meliponinae correspond, respectively, to a family and a subfamily of tropical bees. An important tribe in the group is Meliponini, whose members are known as stingless bees. There are over 300 species of Meliponini, distributed into several genera, including *Melipona* and *Trigona*. The former genus comprises about 50 exclusively neotropical species, while the former is a larger group, represented by over 130 pantropical species. They are valuable pollinators of either native or crop plants [1]. The hives of stingless bees are built as honeycombs for the larvae and as pots for honey and pollen keeping [2, 3].

Geopropolis is a product elaborated by stingless bees. It is similar to honeybee propolis, since both products contain plant resin and beeswax. They are distinct, however, because geopropolis contains variable content of soil material. As is the case with propolis, geopropolis is used to line the entrance of the hive and seal holes on the hive nest. Much have been published about chemistry of propolis, its botanical origin, and biological activity [4–6]. In comparison, considerably less has been done on geopropolis, in spite of the huge biological diversity of stingless bees [7, 8]. In Brazil, geopropolis has been used for the treatment of respiratory diseases and dermatoses [9]. Brazilian geopropolis revealed antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, and antimicrobial activities [10], while Indonesian geopropolis has cytotoxic activity against several human cancer cell lines [11]. Most papers about chemistry of Brazilian geopropolis have dealt with *Melipona* species. *Melipona fasciculata* produces different types of geopropolis: carbohydrates, triterpenes, anacardic acid, alkylresorcinols, and sugar alcohols characterize a

geopropolis from the northeast Brazil [7], while phenolic acids, gallo- and ellagitannins, are constituents of a geopropolis from the lowlands of the state of Maranhão (western northeast Brazil) [2, 3]. *Melipona subnitida* from the state of Paraíba (northeast Brazil) produces geopropolis containing phenylpropanoids and flavonoids [12]. *Melipona scutellaris* from the state of Bahia (southern northeast Brazil) produces distinct types of geopropolis, for example, a sample containing benzophenones as main constituents [13] and another one characterized by cinnamic acid esters and coumarins [8]. Flavonoid glycosides were detected in geopropolis of two Amazonian stingless bees, *Melipona interrupta* and *M. seminigra* [14], and phenolic compounds and terpenes were reported for a geopropolis of *M. orbignyi* from Mato Grosso do Sul (central-west Brazil) [15]. Much less has been published about geopropolis of other species of stingless bees. A geopropolis of *Trigona spinipes* contains triterpenes and magniferolic acid, among other constituents [9]. A geopropolis of *Scaptotrigona postica* from Maranhão has a peculiar chemical profile: in addition to caffeoyl-quinic acids, it contains flavone-*C*-glycosides (chiefly vicenin-2) and a pyrrolizidine alkaloid derived from retronecine [16].

Studies about botanical origin of geopropolis are scarce. Evidence has been raised that fruits of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae) provide resin for the production of geopropolis by the Australian *Tetragonula carbonaria* (Meliponini), due to a great similarity in the methylated flavanone profiles of both materials [17].

To our knowledge, nothing has been published about the chemistry of geopropolis of *Scaptotrigona* from the Brazilian Semiarid, a region designated as the "drought polygon." It has been shown recently that a dark green honeybee propolis from Rio Grande do Norte (RN) is produced with shoot apices of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae, Mimosoideae), a plant locally known as "jurema-preta" [18]. It is a hardy and abundant species in the caatinga biome, a typical dry forest of Brazilian northeast, characterized by spiny small trees and shrubs, cacti, and euphorbs. Most caatinga plants are devoid of leaves over the long dry season, but "jurema-preta" remains green all year long. In the same area, a geopropolis with dark green color is produced by bees of *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807, popularly known as "mandaguari." It is a highly adaptable and active pollinator stingless bee widespread in several parts of Brazil. Many meliponaries produce "mandaguari" pollen and propolis, the latter being reputed as having quality superior to the green propolis from southeast Brazil. The aim of the present study was to determine standard parameters (total phenolic substances, total flavonoids, and antioxidant activity) of *S. postica* geopropolis, characterize its constituents, and test the hypothesis that "jurema-preta" might be its resin source.

2. Material and Methods

2.1. Material. A geopropolis sample of *S. postica* was collected in January 2014 in the meliponary at UFERSA (Rural Federal University of the Semiarid), municipality of Mossoró, RN state (eastern northeast Brazil; 05°11′16″S 37°20′38″W). Nearly 3 g of material was collected from three boxes, by scraping the product accumulated between the hive and its cover. The geopropolis collected is dark green and somewhat sticky, with resinous smell and moldable texture. The sample was cleaned of impurities, placed inside plastic bags, and kept in freezer.

2.2. Preparation of Ethanol Extracts. The geopropolis sample was powdered using liquid nitrogen, mortar, and pestle. Powdered material (1 g) was treated with 150 mL of ethanol in Soxhlet for 6 h. The extract was filtered and kept overnight in a dark flask in freezer at −20°C. The cold extract was filtered again to eliminate wax excess.

2.3. Standard Chemical Parameters. An aliquot of 20 mL of the wax free extract (WFE) was evaporated to dryness under nitrogen flow and weighed for determination of total solids. Triplicates of 5 mL of WFE were used for determination of the contents of total phenolic substances and total flavonoids, the former by the method of Folin–Ciocalteu and the latter by the method of the aluminum chloride. The procedures were described elsewhere [19]. Reference compounds used were *p*-coumaric (total phenols) and quercetin (total flavonoids).

2.4. Antioxidant Activity. Triplicates of 5 mL of WFE were used for analysis of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, according to Righi and collaborators [21], with modifications. Detailed procedure is available in a recent publication [18].

2.5. HPLC/DAD and HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analyses. Aliquots of 1 mL of WFE were evaporated to dryness under nitrogen flow and the residue was dissolved in HPLC grade methanol to obtain solutions at 10 mg mL^{-1}. The solutions were purified through 0.45 μm filters. Aliquots (10 μL) were analyzed by HPLC-DAD with a HPLC HP 1260 chromatograph (Agilent Technologies), using a Zorbax 5B-RP-18 column. Analysis was also carried out by HPLC-DAD-ESI-MS/MS with a DADSPD-M10AVP Shimadzu chromatograph equipped with degasser, two LC-20AC pumps, CTO-20A column oven, SIL 20AC autoinjector and SPD-20A, and a reverse phase column Phenomenex Gemini C-18, protected by a guard column. The chromatograph was coupled to an esquire 2000 Plus Bruker Daltonics spectrometer, equipped with a quadrupole ion trap mass analyzer. Details of the analysis procedures, such as gas flows, oven temperatures, solvent gradients, and databases for chemical characterization of constituents, are available in a recent publication [18]. Constituents' characterization was based on UV-DAD and MS data in the negative and positive ionization modes and comparison with previously published data [22–25].

3. Results and Discussion

3.1. Standardization and Antioxidant Activity. The contents of soluble solids, total phenolic compounds, and total flavonoids are shown in Table 1, in addition to the minimum acceptable values given by the Technical Regulation of Propolis Identity and Quality (TRPIQ) (standards for comparison of physical

Table 1: Chemical parameters (g kg^{-1}) and DPPH radical scavenging activity (μg mL^{-1}) of a sample of geopropolis of *Scaptotrigona postica* from Mossoró (state of Rio Grande do Norte, northeast Brazil), compared with mean values of "jurema-preta" propolis [18] and limit values of the Technical Regulation of Propolis Identity and Quality (TRPIQ) [20].

Sample	Soluble solids	Total phenols	Total flavonoids	EC_{50}
Geopropolis	550	111.5 ± 5.4	98.5 ± 8.6	74.1 ± 0.5
"Jurema-preta" propolis	537	140	105	65
TRPIQ	Minimum 350	Minimum 50	Minimum 5	—
Quercetin	—	—	—	7.4 ± 0.1

and chemical characteristics of propolis produced in Brazil) [20]. All parameters analyzed comply with TRPIQ standards. As apparent in the table, they are similar to values reported for RN green propolis derived from "jurema-preta" [18] and considerably higher than the corresponding parameters of the internationally marketed green propolis from southeast Brazil [19]. The EC_{50} antioxidant activity of the geopropolis sample is also shown in Table 1. As expected from the similarity between RN green geopropolis and "jurema-preta" propolis, the DPPH radical scavenging capacity of both bee products is also similar. The antioxidant activity of propolis has been attributed to its phenolic profile [26].

3.2. Chemical Characterization and Comparison with "Jurema-Preta" Propolis. Table 2 summarizes UV-DAD and MS data in the negative and positive ionization modes. Flavonoids were characterized by UV/vis bands at 345–360 nm (band I) and 255–280 nm (band II); chalcones were characterized by bands at 340–370 nm (band I) and flavanones by band at 280 nm [22]. The characterization of methoxylated flavonoids was based on fragments generated by loss of a methoxyl radical ($^{\bullet}CH3$) and chalcones were characterized by fragments generated by Retro-Diels-Alder reaction [23–25]. Details about characterization of the compounds based on UV/vis, MS^{-}, MS^{+}, and sodium adducts ($[M + Na]^{+}$) are available in the paper by Ferreira and collaborators [18].

Only phenolic compounds, virtually only flavonoids, were characterized as constituents of the analyzed extracts of geopropolis (Table 2). This observation is consistent with the exceptionally high flavonoid content shown in Table 1. Biological properties of propolis are often attributed to their flavonoid constituents. Compounds **1**, **4,** and **11** are simple flavonol aglycones. Compounds **2**, **5**, **7,** and **9** are flavonol methyl ethers, compounds **3**, **6**, **8**, and **13–15** are chalcones, compound **11** is a flavanone, and compounds **12** and **16** are flavones. Thus, the main constituents of the analyzed *S. postica* geopropolis are flavonols and chalcones. Figure 1 depicts the HPLC-DAD chromatogram of the geopropolis ethanol extract. So far the origin of resin of propolis containing chalcones has been attributed to Leguminosae species, for example, *Dalbergia ecastophyllum*, the plant source of Brazilian red propolis [21, 27, 28]. The main plant sources of chalcones are species of Asteraceae, Leguminosae, and Moraceae [29]. The present report of chalcones as major constituents of both geopropolis of *S. postica* and green propolis of *Apis mellifera* from RN is coherent with the hypothesis that "jurema-preta" is one of their relevant botanical sources [18]. Data of Table 2 evidences the high similarity between chemical compositions of both products. Among the 16 constituents detected in the ethanol extract of the geopropolis, 10 were also detected as constituents of the green propolis from the same area (Table 2). "Jurema-preta" is abundant in the caatinga vegetation and its pollen is an important nutritional resource for the local bees.

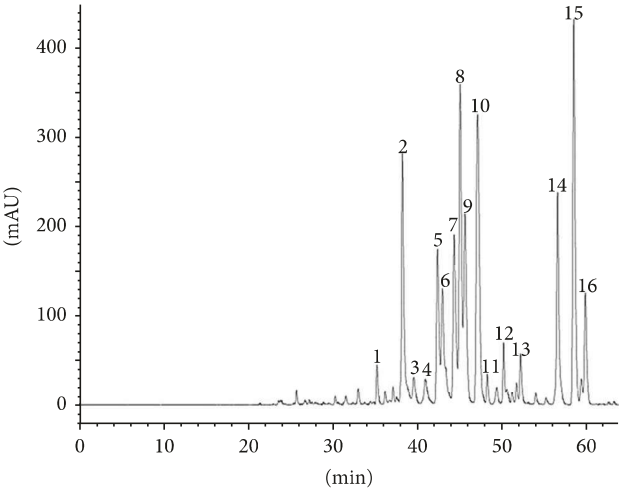

Figure 1: HPLC chromatogram of ethanol extracts of geopropolis of *Scaptotrigona postica* ("mandaguari"; Meliponini) from the meliponary at the University of Mossoró (state of Rio Grande do Norte, northeast Brazil), as characterized by HPLC-DAD. Digits of the chromatogram peaks correspond to the numbers seen in Table 2, used to indicate compounds characterized by HPLC-DAD-MS/MS.

3.3. Comparison with Other Geopropolis. The chemical profile seen in Table 2 is distinct from the composition reported for other Brazilian geopropolis. To our knowledge, no chalcones have so far been detected in geopropolis. A geopropolis of *Plebeia* aff. *flavocincta* from RN has been reported to contain high contents of phenols and flavonoids, but no detailed analysis was carried out for characterization of individual constituents [30]. The geopropolis analyzed in the present work is much distinct from a geopropolis produced by *Scaptotrigona postica* from Maranhão [16]. It is worth observing that stingless bee colonies of the same species may produce geopropolis much distinct from one another

Table 2: Distribution of constituents of ethanol extracts of geopropolis of *Scaptotrigona postica* (Meliponini) from the meliponary at the University of Mossoró (state of Rio Grande do Norte, northeast Brazil), as characterized by HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis. Data are also given about presence/absence of the constituents in propolis of *Apis mellifera* from the same area, derived from shoot apices of "jurema-preta" (*Mimosa tenuiflora*, Leguminosae), according to published data [18].

Compound number	Retention time	UV (nm)	MS^- (*m/z*, %)	MS^+ (*m/z*, %)	Proposed characterization	References	Presence/absence in "jurema" propolis
1	35.2	260, 365	301 $[M-H]^-$	303 $[M+H]^+$	Quercetin	Comparison with standard	+
2	38.2	260, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 302 (100)	Quercetin methyl ether	[19, 21]	+
3	39.6	270, 365	315 $[M-H]^-$	339 $[M+Na]^+$, 317 $[M+H]^+$, 197 (100)	Trihydroxy-dimethoxy chalcone	[17–19, 22]	+
4	41.0	260, 360	285 $[M-H]^-$	287 $[M+H]^+$	Kaempferol	Comparison with standard	–
5	42.4	260, 360	299 $[M+H]^-$	323 $[M+Na]^+$, 301 $[M+H]^+$, 286 (100)	Kaempferol methyl ether	[19, 21]	+
6	43.0	250, 270sh, 365	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$, 316 (100)	Dihydroxy-trimethoxy chalcone	[19, 21]	+
7	44.4	255, 355	313 $[M-H]^-$	337 $[M+Na]^+$, 315 $[M+H]^+$, 300 (60), 282 (100)	Kaempferol dimethyl ether	[19, 21]	+
8	45.1	370	315 $[M-H]^-$	317 $[M+H]^-$	Uncharacterized chalcone	—	–
9	45.6	255, 355	329 $[M-H]^-$	353 $[M+Na]^+$, 331 $[M+H]^+$	Quercetin dimethyl ether	[19, 21]	+
10	47.1	255, 355	327 $[M-H]^-$	329 $[M+H]^+$	Uncharacterized flavonol	—	–
11	48.3	260, 360	271 $[M-H]^-$	273 $[M+H]^+$	Trihydroxy flavonol	[19, 21]	–
12	50.2	270, 340	329 $[M-H]^-$	331 $[M+H]^+$	Trihydroxy-dimethoxy flavone	[19, 21]	–
13	52.2	370	269 $[M-H]^-$	271 $[M+H]^+$, 161 (100), 137 (70)	Methoxy-dihydroxy chalcone	[17–19, 22]	+
14	56.6	370	299 $[M-H]^-$	301 $[M+H]^+$, 167 (100)	Dimethoxy-dihydroxy chalcone	[17–19, 22]	+
15	58.5	370	313 $[M-H]^-$	315 $[M+H]^+$	Hydroxy-trimethoxy chalcone	[17–19, 22]	–
16	59.9	270, 340	343 $[M-H]^-$	367 $[M+Na]^+$, 345 $[M+H]^+$	Dihydroxy-trimethoxy flavone	[17–19, 22]	+

(as noted with *S. postica* from Maranhão and RN), while bees phylogenetically far apart (such as *Scaptotrigona* and *Apis*) may elaborate products with similar chemical composition. This observation leads to the conclusion that bee genetic factors play little role (if any) in the choice of plant sources for geopropolis and propolis production. The availability of potential resin sources is probably decisive in this regard. "Jurema-preta" plants fit well as propolis and geopropolis sources due to their abundance in the caatinga, even during the severe dry periods. In addition, they provide fresh tissues amenable to be chewed by the small and relatively delicate mandibles of the mouth apparatus of bees [31].

3.4. Perspectives. Favorable prospects regarding biological activities are suggested by the high content of flavonols and chalcones and the expressive antioxidant activity of the RN "mandaguari" geopropolis. In addition to many other biological activities, flavonols such as quercetin and isorhamnetin derivatives exhibit coronary heart disease prevention, as well as antioxidant, hepatoprotective, anti-inflammatory, and anticancer effects [32, 33]. Chalcones are flavonoids recognized as possessing many activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, cytotoxic, antitumoral, and chemopreventive activities [29, 34–36].

4. Conclusion

Most propolis in the commerce derives from honeybees. Some stingless bees, however, may produce propolis in amounts commercially feasible, as is the case of "jataí" *(Tetragonisca angustula)*, from the northeast of Brazil. Bees of *S. postica* ("mandaguari") reveal promising prospects for becoming a relevant source of commercial geopropolis. The already reputed high quality of its geopropolis is consistent with results of the present paper, such as the high antioxidant activity and the exceptional predominance of flavonoids, including a high content of chalcones.

Taking into account the economic and social difficulties afflicting the population of northeast Brazil, including the population of RN, the implementation of actions stimulating the production of honeybee green propolis and "mandaguari" geopropolis, both products derived from "jurema-preta," might afford benefits for the local economy, mainly during the harsher dry seasons.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The present work was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) (Grants 2013-07398-0 and 2013/21813-0). Antonio Salatino is research fellow of CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

References

[1] T. A. Heard, "The role of stingless bees in crop pollination," *Annual Review of Entomology*, vol. 44, pp. 183–206, 1999.

[2] R. P. Dutra, B. V. D. Abreu, M. S. Cunha et al., "Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* smith," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 12, pp. 2549–2557, 2014.

[3] R. P. Dutra, A. M. C. Nogueira, R. R. D. O. Marques, M. C. P. Costa, and M. N. S. Ribeiro, "Pharmacognostic evaluation of geopropolis of Melipona fasciculata Smith from Baixada Maranhense, Brazil," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 4, pp. 557–562, 2008.

[4] V. Bankova, "Chemical diversity of propolis and the problem of standardization," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1-2, pp. 114–117, 2005.

[5] S. Huang, C.-P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li, and F.-L. Hu, "Recent advances in the chemical composition of propolis," *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 19610–19632, 2014.

[6] R. Silva-Carvalho, F. Baltazar, and C. Almeida-Aguiar, "Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 206439, 29 pages, 2015.

[7] M. J. A. M. Araújo, M. C. Búfalo, B. J. Conti et al., "The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by Melipona fasciculata Smith in northeast Brazil," *Journal of Molecular Pathophysiology*, vol. 4, no. 1, pp. 12–20, 2015.

[8] M. G. Da Cunha, P. L. Rosalen, M. Franchin et al., "Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee melipona scutellaris," *Planta Medica*, vol. 82, no. 3, pp. 190–194, 2015.

[9] M. O. Freitas, F. A. F. Ponte, M. A. S. Lima, and E. R. Silveira, "Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee Trigona spinipes," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19, no. 3, pp. 532–535, 2008.

[10] M. A. Sanches, A. M. S. Pereira, and J. E. Serrão, "Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini)," *Journal of Apicultural Research*, vol. 56, no. 1, pp. 50–57, 2017.

[11] P. M. Kustiawan, S. Puthong, E. T. Arung, and C. Chanchao, "In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, no. 7, pp. 549–556, 2014.

[12] S. Alves De Souza, C. A. Camara, E. Monica Sarmento Da Silva, and T. M. S. Silva, "Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 801383, 5 pages, 2013.

[13] M. G. da Cunha, M. Franchin, L. C. D. Galvão et al., "Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 23, 2013.

[14] E. C. C. da Silva, M. P. Muniz, R. D. C. S. Nunomura, S. M. Nunomura, and G. A. C. Zilse, "Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees," *Química Nova*, vol. 36, no. 5, pp. 628–633, 2013.

[15] J. F. Campos, U. P. dos Santos, L. F. B. Macorini et al., "Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, no. 1, pp. 374–380, 2014.

[16] G. R. Coelho, R. Z. Mendonça, K. D. Vilar et al., "Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 296086, 10 pages, 2015.

[17] C. F. Massaro, M. Katouli, T. Grkovic et al., "Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae)," *Fitoterapia*, vol. 95, no. 1, pp. 247–257, 2014.

[18] J. M. Ferreira, C. C. Fernandes-Silva, A. Salatino, G. Negri, and D. Message, "New propolis type from north-east Brazil: Chemical composition, antioxidant activity and botanical origin," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017.

[19] R. G. Woisky and A. Salatino, "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control," *Journal of Apicultural Research*, vol. 37, no. 2, pp. 99–105, 1998.

[20] "TRPIQ: Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis," Portaria n. 3, Instrução Normativa n.3, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2001, http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/mel_propolis.htm.

[21] A. A. Righi, T. R. Alves, G. Negri, L. M. Marques, H. Breyer, and A. Salatino, "Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, no. 13, pp. 2363–2370, 2011.

[22] B. Abad-García, L. A. Berrueta, S. Garmón-Lobato, B. Gallo, and F. Vicente, "A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no. 28, pp. 5398–5415, 2009.

[23] B. Portet, N. Fabre, R. Rozenberg, J.-L. Habib-Jiwan, C. Moulis, and J. Quetin-Leclercq, "Analysis of minor flavonoids in Piper hostmannianum var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1210, no. 1, pp. 45–54, 2008.

[24] C. Engels, D. Gräter, P. Esquivel, V. M. Jiménez, M. G. Gänzle, and A. Schieber, "Characterization of phenolic compounds in jocote (Spondias purpurea L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry," *Food Research International*, vol. 46, no. 2, pp. 557–562, 2012.

[25] J.-Y. Zhang, N. Li, Y.-Y. Che et al., "Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of Murraya paniculata by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, no. 5, pp. 950–961, 2011.

[26] M. G. Miguel, S. Nunes, S. A. Dandlen, A. M. Cavaco, and M. D. Antunes, "Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal," *Food Science and Technology*, vol. 34, no. 1, pp. 16–23, 2014.

[27] A. Daugsch, C. S. Moraes, P. Fort, and Y. K. Park, "Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 435–441, 2008.

[28] B. B. Silva, P. L. Rosalen, J. A. Cury et al., "Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 313–316, 2008.

[29] Z. Rozmer and P. Perjési, "Naturally occurring chalcones and their biological activities," *Phytochemistry Reviews*, 2014.

[30] J. B. Silva, K. M. Costa, W. A. Coelho et al., "Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de Plebeia aff. Flavocincta do Rio Grande do Norte," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 36, no. 9, pp. 874–880, 2016.

[31] A. Salatino and M. L. F. Salatino, "Why do honeybees exploit so few plant species as propolis sources?" *MOJ Food Processing & Technology*, vol. 4, no. 5, 3 pages, 2017.

[32] S. Kumar and A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, 2013.

[33] V. Georgiev, A. Ananga, and V. Tsolova, "Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals," *Nutrients*, vol. 6, no. 1, pp. 391–415, 2014.

[34] M. D. Awouafack, P. Tane, M. Spiteller, and J. N. Eloff, "Eriosema (Fabaceae) species represent a rich source of flavonoids with interesting pharmacological activities," *Natural Product Communications (NPC)*, vol. 10, no. 7, pp. 1325–1330, 2015.

[35] N. K. Sahu, S. S. Balbhadra, J. Choudhary, and D. V. Kohli, "Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 2, pp. 209–225, 2012.

[36] P. Singh, A. Anand, and V. Kumar, "Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 85, pp. 758–777, 2014.