



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE
MESTRADO ACADÊMICO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM COLÔNIAS DE ABELHAS**
***Apis mellifera* L. NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO CEARÁ**

LIMOEIRO DO NORTE – CE

2015

LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM COLÔNIAS DE ABELHAS *Apis*
mellifera L. NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Tecnologia de Alimentos do Instituto
Federal do Ceará Campus Limoeiro do Norte
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Otávio Portela
Pereira.

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA IFCE
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE**

DIS
L732c

Lima, Lidiania Souza Correia.

Caracterização físico-química e atividades antioxidante e antimicrobiana de própolis produzidas em colônias de abelhas *Apis mellifera* L. na região Noroeste do Estado do Ceará / Lidiania Souza Correia Lima. – Limoeiro do Norte, 2015.
79 fls.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus* Limoeiro do Norte, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira."
Referências.

1. Própolis. 2. *Apis mellifera* L. 3. Flavonóides. 4. Antioxidantes. 5. Atividade Antimicrobiana. I. Pereira, Júlio Otávio Portela. II. Título.

CDD 638.17

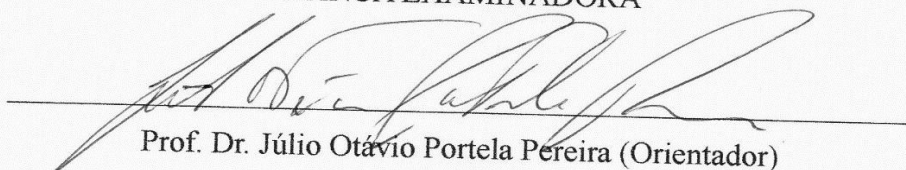
LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS EM COLÔNIAS DE ABELHAS *Apis*
mellifera L. NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Tecnologia de Alimentos do Instituto
Federal do Ceará Campus Limoeiro do Norte
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

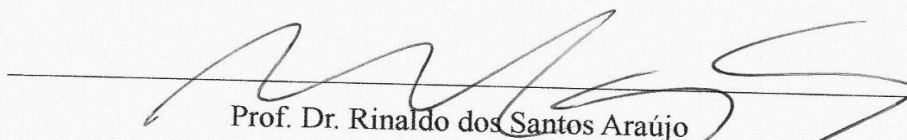
Aprovada em 01 / 08 / 15.

BANCA EXAMINADORA



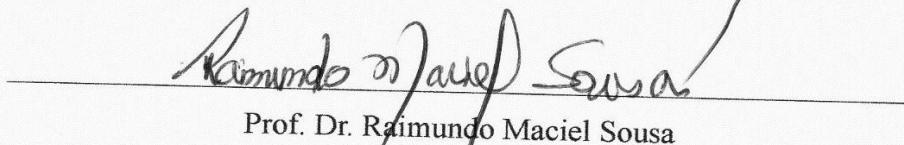
Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira (Orientador)

INSTITUTO FEDERAL DO CEARÁ – IFCE *CAMPUS* LIMOEIRO DO NORTE



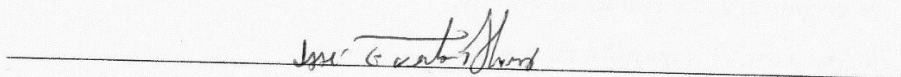
Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo

INSTITUTO FEDERAL DO CEARÁ – IFCE *CAMPUS* LIMOEIRO DO NORTE



Prof. Dr. Raimundo Maciel Sousa

INSTITUTO FEDERAL DO CEARÁ – IFCE *CAMPUS* FORTALEZA



Prof. Dr. José Everton Alves

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ – UVA – SOBRAL

*Aos meus amores que completam minha vida,
meus pais Mônica e Pedro Correia, meu
marido Cláudio Lima e meus filhos Cláudio
Henrique (in memorian) e José Bento Lima.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Santíssima por conceder a graça de proporcionar mais esse momento especial e por sempre me amparar nos momentos difíceis, dando-me forças nas horas de cansaço para levantar, continuar e não desistir.

À minha família, pai, mãe, irmãos, cunhadas, sogro, sogra, tias e marido, pois não mediram esforços para que eu pudesse realizar as minhas atividades no mestrado e por compreenderem a minha ausência. Certamente, sem a minha base familiar não poderia conseguir trilhar esse caminho acadêmico.

Ao meu orientador, professor Dr. Júlio Otávio Portela Pereira, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, depositando em mim a confiança para desenvolver esse trabalho sempre incentivando e disposto a contribuir em qualquer circunstância, com sua simplicidade e competência para a conclusão desta pesquisa.

Ao professor Dr. Rinaldo Araújo, co-orientador, que também desempenhou o papel de orientador, pelos inúmeros argumentos científicos, sugestões e críticas que enriqueceram imensamente meus conhecimentos, pelo bom convívio, tolerância e paciência em orientar-me nesses dois anos.

Ao professor Dr. José Everton Alves, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa e por fazer o elo com os apicultores para o fornecimento das própolis.

Aos professores do Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do IFCE *Campus* Limoeiro do Norte pelos ensinamentos transmitidos e total apoio e compreensão durante a trajetória de todo curso.

As amigas e professoras Delmira Rocha, Jackqueline Lemos, Susana Dantas, Georgia Moraes, Mirla Farias, Daiana Andrade, Joyce Andrade, Liana Ferreira e Terezinha Duarte que estimularam e torceram pela conclusão deste curso.

As colegas de mestrado, Anakláudia Sombra, Gilnara Bandeira, Monique Ellen Silva, Monique Maia, Ranielly Freitas, Izamara Norte, Auriana Regis e Hirllen Beserra, pelas vivências, frustrações, dificuldades, alegrias, brincadeiras, desabafos, conquistas e discussões às quais serviram também como aprendizado. Em suma, muito obrigada por se fazerem presente quando sempre precisei.

Aos companheiros de trabalho do Departamento de Turismo, Hospitalidade e Lazer do IFCE *Campus* - Fortaleza pelas sugestões, a troca de experiências e colaborações que me ajudaram na melhoria deste trabalho.

Aos bolsistas do Laboratório de Tecnologia em Química (LTQ) do IFCE *Campus* Fortaleza, Luanny Gadelha, Emanuele Batista e Lukas Angelim pela ajuda nas análises físico-químicas.

À Dra. Mariana Santiago, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFCE *Campus* Sobral, pelo enorme auxílio dado na realização dos experimentos.

Aos apicultores: Marcílio e Adriano Araújo das localidades de Timbira e Aguiar em Bela Cruz; Paulo Cavalcante e Tarcísio Tomás da localidade de Santo Elias na Meruoca, Simão Menezes e Vicente Paulo Batista da localidade de Caldeirão e Sítio Belém em Alcântaras, ao Prof. Everton Alves da localidade de Tuína, a Jorge Alberto no Morro do Barriga em Sobral, Antônio Marques (Cláudio) e Senhor Monteiro de Carqueijo e Lajes do Juca em Mucambo, à Liduína Rocha da localidade de Floresta em Santana do Acaraú e ao João Paulo Pereira do município de Granja e Paulo Michael Rodrigues Graça, pela gentileza em fornecer as própolis utilizadas nesta pesquisa.

A todos com quem convivi direta ou indiretamente durante esse período e que contribuíram para realização deste trabalho, pois sozinha não teria conseguido finalizá-lo.

*"A Cruz sagrada seja a minha Luz.
Não seja o Dragão meu guia.
Retira-te Satanás!
Nunca me aconselhes coisas vãs.
É mal o que tu me ofereces.
Bebe tu mesmo do teu veneno!"*

Oração da medalha de São Bento.

RESUMO

A própolis é um produto das abelhas *Apis mellifera* obtido a partir de resinas de plantas e cera e que possui propriedades terapêuticas. O poder bactericida, bacteriostático, antifúngico e a presença de antioxidantes, tem despertado o interesse da comunidade científica em todo mundo. Neste contexto, visando ampliar os conhecimentos da própolis apícola, objetivou-se neste trabalho caracterizar e avaliar a qualidade da própolis produzida por abelhas africanizadas *Apis melífera* L. na região Noroeste do Estado do Ceará, Brasil. As própolis foram coletadas por raspagem das tampas das colmeias em 15 localidades, acondicionadas individualmente em vasilhames plásticos, identificadas e armazenadas sob a refrigeração até o momento da caracterização analítica. Experimentalmente, foram avaliadas as características organolépticas, físico-químicas, os teores de flavonoides e fenois totais e as atividades antioxidante e antibacteriana das própolis coletadas. As características sensoriais de coloração variaram de verde a pardo, o aroma foi tipicamente balsâmico, o sabor de forte picante a suave balsâmico, e a consistência de maleável a rígida. Para as amostras em estudo, as perdas por dessecação variaram entre 2,1 e 11,4 %; o teor de ceras entre 1,7 e 26,6 %; a massa mecânica entre 23,6 e 45,5 % e o teor de solúveis em etanol entre 14,2 e 58,2%. Do ponto de vista da bioatividade todas as amostras apresentaram-se solúveis em acetado de chumbo e hidróxido de sódio em extratos nos quais o pH encontrava-se entre 4,01 a 5,55; os índices de oxidação variaram entre 2 e 48 segundos e o teor de atividade antioxidante (ABTS) apresentaram entre 8,61 a 84,9 mg de trolox/g. Os compostos fenólicos apresentaram maiores valores para amostras do Morro do Barriga com concentrações entre 9,64 e 17,1 % de equivalentes de ácido gálico. Os flavonoides apresentaram as maiores variabilidade com concentrações entre 0,08 e 31,1 mg quercetina/g. Avaliações da atividade antibacteriana mostraram ação inibitória frente a cepa de *Staphylococcus aureus* para as própolis das localidades de Caldeirão, Carqueijo, Floresta, Morro do Barriga I, Morro do Barriga II, Morro do Barriga III, Tuína e Timbira. Frente a *Escherichia coli* somente as provenientes do Morro do Barriga mostraram-se eficientes. Em geral, 53,33% dos resultados da qualidade das própolis são considerados satisfatórios para todos os padrões preconizados pela legislação brasileira vigente, bem como para a quantidade de antioxidantes e atividade antimicrobiana. Estes resultados podem ser considerados promissores para possíveis usos das própolis da região Noroeste do Estado do Ceará como aditivos na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Própolis. *Apis mellifera* L. Flavonóides. Antioxidantes. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Propolis is a product of bees obtained from plants and wax resins and it has therapeutic properties. The bactericidal, bacteriostatic, antifungal powers and the presence of antioxidants have aroused the international interest, including the scientific community. In this context, aiming to expand the knowledge of bee propolis, the objective of this study was to characterize and evaluate the quality of propolis produced by africanized bees *Apis mellifera* L. in the northwest of the State of Ceará, Brazil. The propolis were collected by scraping the lids of the hives in 15 locations, individually packed in plastic containers, identified and stored under refrigeration until the moment of analytical characterization. Experimentally, it was evaluated the organoleptic and physico-chemical characteristics, the contents of total flavonoids and phenols and antioxidant and antibacterial activities from the collected propolis. Sensory staining characteristics ranged from green to brown, the aroma was typically balsamic, the taste from strong spicy to soft balsamic, and the consistency from soft to hard. For the samples studied, the loss on drying ranged between 2.1 and 11.4%, the wax content between 1.7 and 26.6%, the mechanical mass from 23.6 to 45.5% and ethanol soluble content from 14.2 to 58.2%. From the point of view of bioactivity, all samples were soluble in lead acetat and sodium hydroxide in extracts with pH was from 4.01 to 5.55, the oxidation rates were found between 2 and 48 seconds and the antioxidant activity (ABTS) ranged between 11.2 to 84.9 mg of trolox/g. Phenolic compounds showed higher values for samples from Morros do Barriga with ith concentrations between 9.64 and 17.1% of galic acid equivalent. Flavonoids showed the highest variability with concentrations between 0.08 and 31.1 mg quercetin/g. Assessments of antibacterial activity showed inhibitory action against strain of *Staphylococcus aureus* for propolis from Caldeirão, Carqueijo, Floresta, Morro do Barriga I, Morro do Barriga II, Morro do Barriga III, Tuína and Timbira. *Escherichia coli* were effective only against those from Morro do Barriga. In general, 53.37% of the quality of propolis results can be considered satisfactory for the amount of antioxidants and antimicrobial activity. These results can be considered promising for possible uses of propolis the northwest region of the state of Ceará as additives in the food industry.

Key-words: Propolis. *Apis mellifera* L. Flavonoids. Antioxidants. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração da elaboração da própolis pelas abelhas africanizadas <i>Apis mellifera</i> L.e seu processo de produção na apicultura.	19
Figura 2 – Traças (<i>Galleria melonela</i>) embalsamadas com própolis na parede interna da colmeia.	20
Figura 3 – Apiário da localidade Aguiar no município de Bela Cruz.....	22
Figura 4 – Abelha operária da espécie <i>Apis mellifera</i> L. coletando resina em folhas de alecrim do campo (<i>Bracharis dracunculifolia</i>).....	23
Figura 5 - Estrutura do fenol comum, ou ácido fênico, considerado o mais simples dos compostos fenólicos.	26
Figura 6 - Estrutura química dos polifenóis.	27
Figura 7 - Estruturas químicas dos principais flavonoides encontrados na própolis.....	28
Figura 8 - Estrutura química básica de flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um intermediário (C).	28
Figura 9 - Estrutura genérica do flavonol quercetina.	29
Figura 10 - Formação do complexo flavonoide-Al em solução metanólica	30
Figura 11 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo perssulfato de potássio.....	32
Figura 12 - Mapa do Estado do Ceará com delimitação do Noroeste cearense indicando as cidades onde foram coletadas as própolis de <i>Apis mellifera</i> L. utilizadas na pesquisa.	35
Figura 13 - Coleta da própolis por raspagem na parte superior e interna da melgueira (A) e na parte interna da tampa da colmeia (B).	36
Figura 14 – Exemplo típico da amostra de própolis utilizada nos experimentos após trituração.....	37
Figura 15 – Imagens das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará	44
Figura 16 – Espectros no UV-Vis dos extratos das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.	51
Figura 17 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das própolis frente à cepa de <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 18 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das própolis frente à cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das própolis brasileiras conforme sua localização e característica físico-química.	25
Tabela 2 - Principais classes de flavonoides.	30
Tabela 3 - Bandas de absorção de flavonoides e ácidos fenólicos em solução metanólica e em presença de cloreto de alumínio (AlCl_3).	31
Tabela 4 - Locais de coleta das amostras de própolis de <i>Apis mellifera</i> L. nos 8 municípios da região Noroeste do Ceará.	34
Tabela 5 - Avaliação sensorial das amostras das própolis da região Noroeste do Estado do Ceará.	46
Tabela 6 - Caracterização físico-química das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.	48
Tabela 7 – Concentrações de flavonoides e fenois nas amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.	54
Tabela 8 - Capacidade antioxidante das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.	56
Tabela 9 - Padrão de qualidade das própolis investigadas na região Noroeste do Estado do Ceará.	60
Tabela 10 - Valores do halo de inibição (mm) para as diferentes concentrações do extrato de própolis sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	63

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2- azino – bis – 3- etil – benzotiazolina – 6- ácido sulfônico
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EEP	Extrato Etanólico da Própolis
GPS	Global Positioning System
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
TEAC	Capacidade Antioxidante em Equivalente de Trolox
UV	Ultravioleta – Visível
UFC	Unidade Formadora de Colônia
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Panorama da apicultura	17
3.2. Própolis apícola.....	18
3.3. A importância da flora apícola na elaboração da própolis.....	21
3.4. Composição química da própolis	23
3.5. Potencial bioativo das própolis.....	25
3.6. Importância da própolis para indústria alimentícia	32
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
4.1. Obtenção das amostras de própolis.....	34
4.2. Análises físico-químicas da própolis bruta	36
4.2.1. Características sensoriais	36
4.2.2. Preparo das própolis para realização das análises físico-químicas	37
4.2.3. Perdas por dessecação	37
4.2.4. Cinzas.....	37
4.2.5. Ceras	38
4.2.6. Massa mecânica (resíduos insolúveis em etanol).....	38
4.2.7. Solúveis em etanol (Resíduo seco).....	39
4.3. Obtenção do extrato etanólico de própolis (EEP).....	39
4.3.1. pH	40
4.3.2. Solubilidade em acetato de chumbo.....	40
4.3.3. Solubilidade em hidróxido de sódio	40
4.3.4. Absorção no ultravioleta-visível dos EEP	40
4.3.5. Determinação do teor de fenois totais.....	40
4.3.6. Determinação de Flavonoides totais	41
4.4. Atividade Antioxidante dos EEP	41
4.4.1. Método qualitativo do índice de oxidação	41
4.4.2. Atividade sequestrante pelo método do radical ABTS ⁺	42

4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	42
4.5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)	43
4.6. Análises estatísticas dos resultados.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1. Caracterização físico-químicas das própolis	44
5.1.1. Análise sensorial	44
5.1.2. Análises físico-químicas.....	47
5.2. Espectroscopia na região do ultravioleta–visível (UV-Vis) dos extratos de própolis	50
5.3. Avaliações de bioatividade das própolis	54
5.3.1. Fenois totais e flavonoides totais	54
5.3.3. Capacidade antioxidante	56
5. 4. Avaliação da atividade antibacteriana	61
6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENOIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS	76
ANEXO II – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO RADICAL ABTS ^{•+}	77

1. INTRODUÇÃO

O uso da própolis tem sido cada vez maior pela humanidade, sendo o mais comum, o de imitar as próprias abelhas utilizando este material resinoso para apropriar-se de suas propriedades antimicrobianas (LIMA, 2006; OLDONI *et al.*, 2011; VARGAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2013). A própolis por ser um antibiótico natural, tem ajudado pessoas a proporcionar um bem-estar físico e mental, vivendo com saúde e aumentando a qualidade de vida através da diminuição e prevenção de doenças.

A preocupação no estilo de vida tem despertado interesse por parte dos consumidores, indústrias e pesquisadores para a descoberta de um insumo natural que possa ajudar a população a alcançar esse tão almejado padrão saudável de vida. Albuquerque, Romeiro e Figueiredo (2013) relatam que empresas mobilizam-se em acompanhar a demanda por alimentos saudáveis, e muitas buscam na própolis uma fonte potencial para auxiliar a manutenção da saúde das pessoas.

Não se sabe ao certo como a própolis passou a ser usada pelos seres humanos, mas têm-se indícios do seu uso desde a antiguidade, em função de suas muitas propriedades biológicas, dentre elas: a antibacteriana, a antiviral, a fungicida e a antitumoral. Embora seja de forma empírica, a própolis é empregada há milhares de anos pela humanidade como um remédio tradicional popular. No antigo Egito, era utilizada como um dos componentes na mumificação, técnica esta estudada, aperfeiçoada e praticada ao se observar o poder de conservação das própolis (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; OLDONI *et al.*, 2011).

A própolis por sua composição química complexa, a qual sempre varia de acordo com sua procedência, possui componentes específicos ainda desconhecidos, capazes de conter benefícios à saúde do ser humano, com ampla aplicação nas áreas da medicina, farmacêutica e também na alimentícia.

As propriedades bioativas das própolis brasileiras já são confirmadas e vários relatos comprovam mais de trezentas substâncias identificadas como bioativas, incluindo: ésteres de ácidos fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonois, dihidroflavonois, chalconas), terpenos, β -esteroides, álcoois e aldeídos aromáticos, sesquiterpenos, naftalenos, etc. No entanto, não se pode atribuir esses constituintes somente a uma variedade de própolis, pois existem vários tipos e sua composição química não é fixa, sendo determinada diretamente e principalmente, pelas características fitogeográficas ao redor da colmeia, pelo

método de extração utilizado e pela idade das própolis (MARCUCCI *et al.*, 2001; BANKOVA, 2005; AHN *et al.*, 2007).

As própolis podem apresentar propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antifúngicas, todas já comprovadas em pesquisas científicas demonstrando o efeito dos extratos de própolis sobre determinadas bactérias e fungos, dentre estes, estão: os patógenos de interesse alimentício, além da capacidade de prevenir ou retardar reações de oxidação (PARK *et al.*, 2002; VARGAS-SÁNCHEZ; TORRESCANO-URRUTIA; SÁNCHEZ-ESCALANTE, 2013).

Própolis de regiões tropicais, em particular, as produzidas em nosso país, são objetos de muitos estudos científicos devido às suas elevadas atividades biológicas e em virtude de possuir uma flora exuberante e variada, além de extensas áreas com grande potencial apícola longe de fontes poluidoras ambientais, no Brasil há locais propícios para criação de abelhas que possam produzir própolis e mel de igualdades desejadas (LIMA, M., 2006). Entre estes locais, pode-se citar a região Noroeste cearense, onde habitam centenas de apicultores, em sua maioria, informais que exploram apenas o mel. No entanto, os estudos dos compostos químicos e biológicos dessas própolis ainda não foram realizados.

A procura por produtos naturais em substituição aos sintéticos tradicionais ou medicamentosos tem aumentado constantemente, despertando o interesse da indústria alimentícia na produção de alimentos saudáveis para o bem-estar dos seres humanos através da manutenção de suas propriedades nutricionais e microbiológicas. A alternativa para alcançar estes interesses, envolve a busca por novas fontes naturais de aditivos alimentares e conservantes naturais em substituição ao uso de compostos sintéticos.

Assim, nesta pesquisa, pretende-se caracterizar do ponto de vista físico-químico, da bioatividade e da atividade antimicrobiana, a própolis produzida por abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no Noroeste do Estado do Ceará, avaliando a possibilidade da mesma ser, futuramente, utilizada em aplicações industriais pelo setor alimentícios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar do ponto de vista físico-químico, do potencial bioativo e da atividade antimicrobiana as própolis de *Apis mellifera* L. encontradas na região Noroeste do Estado do Ceará, Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer o quantitativo dos componentes físico-químicos (umidade, cera, cinzas, massa mecânica e solúveis em etanol) da própolis de *Apis mellifera* L. obtida no Noroeste cearense.
- Realizar estudo químico (pH, solubilidade em acetato de chumbo e solubilidade em hidróxido de sódio) e espectroscópico dos extratos etanólicos das própolis obtidas.
- Avaliar a atividade antioxidante das própolis investigadas quanto aos teores de fenóis e flavonoides presentes na sua composição química.
- Avaliar a atividade antibacteriana das própolis em estudo frente aos microorganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Estabelecer um padrão de qualidade para as própolis produzidas na área em estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Panorama da apicultura

O Brasil é um país que apresenta características especiais e adequadas de flora e clima, que aliado à presença de abelhas africanizadas, lhe confere um grande potencial para a atividade apícola (EMBRAPA, 2003; LIMA, A., 2012). No Nordeste brasileiro, essa atividade representa uma alternativa de ocupação e renda por estar inserida na agricultura familiar, atualmente, não só para o homem do campo, mas para aqueles que veem nessa área uma oportunidade de fácil manutenção e de baixo custo inicial em relação às demais atividades agropecuárias (SILVA *et al.*, 2011).

Para Moreira (1996), a arte de criar abelhas *Apis mellifera* L. com o objetivo de beneficiar ao homem com produtos apícolas como o mel, cera, geléia real, própolis, pólen apícola e veneno, além de contribuir com a agricultura, fruticultura, com a polinização e mata silvestre, é definida como apicultura, a qual atende aos aspectos da sustentabilidade no sentido social, econômico e ambiental (SOUSA *et al.*, 2012)

A apicultra, em sua maioria, está voltada para a produção de mel, não só no Estado do Ceará, como igualmente em todo o Nordeste do Brasil. De acordo com o IBGE (2012), existem cerca de 5.000 pequenos apicultores que possuem um total de 300.000 colmeias, disseminados em 143 municípios. Atualmente, 70% destes encontram-se associados nas mais de 70 associações de apicultores presentes no Ceará. Apesar deste panorama de desenvolvimento, percebe-se uma carência em novos conhecimentos para diversificação da produção pela exploração de outros produtos das abelhas além do mel, como a própolis (LIMA, A., 2012).

No Brasil, a atividade do sistema apícola cresceu 10 vezes nos últimos 40 anos para produção de mel, situando-se em terceiro lugar no ranking mundial, em termos de produção. O Estado do Ceará faz parte dos nove estados brasileiros que mais produziram e exportaram este alimento. O semiárido apresenta excelentes condições à exploração apícola, pelo clima favorável e pela riqueza nectarífera de sua vegetação, com destaque para o cajueiro e a algarobeira que são plantas altamente melíferas. Além disso, conta com o bioma caatinga que possui uma flora rica em plantas medicinais (BOLETIM DO AGRONEGÓCIO DO SEBRAE, 2013; IBGE, 2012).

Dentre as regiões brasileiras com alto potencial apícola, a região Nordeste, em particular os Estados do Piauí e do Ceará, destacam-se por possuírem floradas características das espécies vegetais do bioma caatinga que são bastante apreciadas pelas abelhas, embora em certas épocas do ano, estejam vulneráveis a situações de estiagem prolongada que diminuem a produtividade (BARBOSA; SOUSA, 2013).

Um estudo feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), mostrou que mesmo apresentando condições climáticas adversas, o Ceará se destaca com o maior valor da produção de mel de abelha, estimado em 1.834,826 kg. A região Noroeste do Estado do Ceará contribuiu no ano de 2013 com 90.082 kg de mel e é bastante favorável ao bom desempenho da apicultura, por possuir uma vantagem de estar em uma área de registro de pouca utilização de agrotóxicos e pela existência de mata nativa, favorecendo produtos de qualidade (BARBOSA; SOUSA, 2013).

3.2. Própolis apícola

As abelhas possuem a habilidade de extrair substâncias resinosas de várias plantas que estejam ao redor da colmeia para auxiliar na sua sobrevivência. Essas substâncias contêm propriedades de elevado poder biológico para as atividades antimicrobiana e antioxidante. A própolis é um dos produtos apícolas elaborado de forma natural (Figura 1) pelas abelhas *Apis mellifera* L., a espécie de abelha mais explorada economicamente no Brasil (ANDRADE *et al.*, 2012).

A própolis é definida como o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas (BRASIL, 2001). Esses constituintes são biotransformados pela adição de cera e pela ação da enzima 1,3-glicosidase produzida nas glândulas salivares das abelhas para elaboração final do produto (GHISALBERTI, 1979).

Miguel e Antunes (2011) definem própolis (CAS number 9009-62-5) como cola da abelha, uma mistura heterogênea de muitas substâncias recolhidos e transformados para selar buracos na colmeia e nos favos de mel, além de suavizar as paredes internas e proteger a entrada de intrusos. Etimologicamente, a palavra própolis é de origem grega, da junção de *pro* - (em defesa de) e da palavra *polis* - (cidade ou comunidade) (SALATINO *et al.*, 2005). A própolis possui a característica de ser um material lipofílico macio, maleável e pegajoso no estado quente, mas quando submetido ao frio fica duro e quebradiço e de fácil manipulação (GHISALBERTI, 1979; GONÇALVES; SANTOS; SREBERNICH, 2011).

Figura 1 - Demonstração da elaboração da própolis pelas abelhas africanizadas *Apis mellifera* L.e seu processo de produção na apicultura.



Fonte: adaptado de http://www.mnpropolis.com.br/produtos_propolis.asp (2015).

A própolis, como subproduto das abelhas, possui a capacidade de proporcionar isolamento de umidade nas partes internas da colmeia a fim de manter a temperatura interna em torno de 35° C, vedar frestas na colmeia, madeiras e favos, proteger a colmeia contra proliferação de microorganismos e proteger a colmeia da entrada de luz, além de embalsamar animais (Figura 2) no interior da colmeia para garantir a assepsia prevenindo a decomposição dos organismos mortos. (MARCUCCI *et al.*, 2001; MENEZES, 2005; SALANTINO *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009).

Figura 2 – Traças (*Galleria melonela*) embalsamadas com própolis na parede interna da colmeia.



Fonte: Autor (2015).

Segundo Oldoni *et al.*, (2011) estudos recentes sobre os efeitos terapêuticos da própolis, demonstraram o aumento de sua popularidade como um suplemento alimentar saudável e que a mesma tem sido aplicada em vários tipos de alimentos e bebidas em diversas partes do mundo, com a alegação da melhoraria da saúde e prevenção de doenças, inclusive do câncer.

Por ser um produto com concentração de flavonoide dez vezes maior que qualquer outro vegetal, a própolis desperta interesse no mundo internacional e, em especial, na comunidade científica, principalmente quanto ao conhecimento da ação dos compostos fenólicos contra perigosos invasores ao corpo humano (JORNAL DA UNICAMP, 2003).

Os maiores produtores mundiais de própolis são China, Brasil, Austrália, Bulgária, Alemanha, França e Rússia, sendo os maiores importadores a União Europeia, o Japão e os EUA (LA PROPOLIS, 2009). A própolis deixou de ser descartada e passou a ser o principal produto das colmeias em algumas regiões produtoras, chegando muitas vezes a superar o mel. O interesse pela própolis no Brasil aconteceu na década de 80 quando pesquisas descobriram as propriedades terapêuticas e atividades biológicas da mesma (LIMA, M., 2006).

A diversidade da flora e suas características climáticas e geográficas favorecem a qualidade na produção e existência de diferentes variedades de própolis, o que leva cada região a possuir um produto diferenciado. Atualmente, existem 13 tipos catalogados de própolis descritos na literatura (BOLETIM AGRONEGÓCIO DO SEBRAE, 2013). Elas são diferenciadas pela cor, odor e consistência e suas propriedades biológicas estão associadas à planta de origem e à espécie de abelha produtora.

Segundo Belmiro, Oki e Fernandes (2011), no Brasil podem ser encontradas própolis nas cores verde, vermelha, marrom, preta e amarela. A própolis verde, também conhecida como própolis brasileira, tem um alto valor agregado. Em 2009, seu preço médio era mais de 20 vezes maior do que o do mel (IBGE, 2012).

No mercado existe um espaço amplo para o fortalecimento de marcas de própolis independentemente do tipo, no Brasil não há uma empresa possuidora de uma marca forte, pois o produto não é mais comercializado como medicamento, mas como forma de prevenção capaz de fornecer uma vida mais saudável (BOLETIM AGROPECUÁRIO DO SEBRAE, 2013). No entanto, há no país empresas em condições de avaliar adequadamente a própolis no momento da compra, levando em consideração a sua composição, mas há também quem encontre no mercado de própolis a valorização apenas do aspecto visual, sobressaindo alguns tipos como a própolis esverdeada (BREYER, 2000). Apesar de estudos revelarem que as própolis vermelhas são mais ativas biologicamente do que os outros tipos de própolis (verde, marrom, amarela), a opção por determinada cor de própolis não desfavorece as outras, o que as diferencia de fato será sua avaliação “holística”, não somente visual.

3.3. A importância da flora apícola na elaboração da própolis

Durante muitos anos o homem vem aprendendo com a natureza, mesmo assim ela ainda continua um mistério, todos os dias sempre há algo a ser revelado. As abelhas buscam seu ganho energético nas plantas, sendo que a flora apícola é um dos principais indicativos para o sucesso da atividade apícola e qualidade dos subprodutos das abelhas em qualquer região (SOUSA *et al.*, 2012).

A espécie de abelha mais explorada com finalidade econômica no Brasil é a *Apis mellifera* L. (SOUSA *et al.*, 2011), e o sucesso da polinização cruzada, aumentam o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e aumentando a produção de frutos e sementes (NASCIMENTO, 2011).

O conjunto de plantas que fornecem alimento às abelhas em uma determinada região, denomina-se flora apícola, sendo esta constituída por três extratos vegetais: herbáceo, arbustivo e arbóreo, destacando-se espécies como o mofumbo (*Combretum leprosum*), bamburral (*Hyptis suaveolens*), marmeleiro (*Croton sonderianus*), sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), vassorinha-de-botão (*Spermacoce verticilata*), juazeiro (*Zizyphus joazeiro*), mandacarú (*Cereus jamacaru*), pau-branco (*Auxemma oncocalix*), mulungu (*Erythrina velutina*), oiticica (*Licania rígida*), jucá

(*Caesalpinia ferrea*), pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*), imburana (*Bursera leptophlocos*), angico-de-bezerro (*Piptadenia moniliformis*), catingueira (*Caesalpina pyramidalis*), aroeira (*Astronium urundeuva*) e o cajueiro (*Anacardium occidentales*) (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2004). A Figura 3 ilustra a paisagem de um apiário caracterizada pela vegetação de grande porte (estrato arbóreo), como por exemplo, o cajueiro.

Figura 3 – Apiário da localidade Aguiar no município de Bela Cruz.



Fonte: Autor (2015).

Benevides e Carvalho (2009) ressaltam que, o florescimento, os recursos oferecidos para as abelhas e a importância apícola das espécies dependem das condições climáticas, fertilidade do solo, adensamento e a presença de flora competidora.

A vegetação ao redor das colmeias influencia na composição da própolis, que por sua vez é produzida a partir de resinas coletadas por abelhas da espécie *A. mellifera* L. por meio de diferentes partes de plantas como brotos, botões florais e exsudados resinosos (GHISALBERTI, 1979). O espectro de voo de uma abelha (*A. mellifera* L.) abrange um raio em torno de 4-5 km ao redor da colmeia. Não se sabe ao certo o que direciona a preferência de uma abelha por determinada planta (MENEZES, 2005) talvez, a escolha esteja direcionada à atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas precisam utilizar a própolis como um antisséptico (SFORCIN *et al.*, 2012). Outra hipótese de seletividade seria o fato das mesmas serem atraídas para as flores por fatores fisiológicos estimulantes, mecânicos-estruturais, tróficos e biológicos, que são peculiares a cada tipo de planta (NASCIMENTO, 2011).

O prof. Dr. Park, em reportagem ao Jornal da Unicamp em 2003, explica que os vegetais, no estágio broto, são susceptíveis a microorganismos e insetos e, como forma de

proteção, produzem, enzimas as quais têm função semelhante aos anticorpos presentes nos seres humanos.

No caso de alguma lesão na planta, a mesma libera uma resina com a intenção de evitar a perda de seiva e prevenir a infecção da ferida. É nesse momento que as abelhas se aproveitam do metabolismo secundário desses vegetais para capturar a resina (Figura 4) de caules, folhas, etc. Após a coleta, as abelhas adicionam enzimas salivares misturada com cera e outros materiais recolhidos durante a coleta para compor o processo de produção da própolis (FEDERAÇÃO NACIONAL DOS APICULTORES DE PORTUGAL, 2010).

Bastos *et al.*, (2011), explica a interação das abelhas *Apis mellifera* e a planta *Baccharis dracunculifolia* (popularmente conhecida como vassourinha, alecrim do campo ou de alecrim vassoura que ocorre com mais frequência do Sudeste para o sul do Brasil), no fornecimento de resina da espécie para a produção de própolis verde, sendo esta relacionada à oferta abundante de resina pela planta *Baccharis dracunculifolia*, parasitadas por essas “galhas” de insetos fitófagos, as quais induzem a produção de exsudado nas plantas como forma de defesa, no entanto, esse fato atrai as abelhas *Apis mellifera* para coletar a resina e, consequentemente, favorecer a produção de própolis verde.

Figura 4 – Abelha operária da espécie *Apis mellifera* L. coletando resina em folhas de alecrim do campo (*Bracharis dracunculifolia*).



Fonte: adaptado de http://www.mnpropolis.com.br/produtos_propolis.asp (2015).

3.4. Composição química da própolis

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a própolis é composta basicamente de resinas, produtos balsâmicos, cera, óleos essenciais, pólen e microelementos. A própolis deve possuir aroma

característico de bálsamo e resina, cor variando entre amarelada, parda, esverdeada e marrom, sabor característico alternando de suave balsâmico a forte e picante e consistência à temperatura ambiente entre maleável à rígida.

Todas as características e qualidade da própolis coletada podem ser alteradas dependendo do ecossistema da região, da variabilidade genética das abelhas rainhas, além do gênero e espécie das próprias abelhas que a produz. Estas variáveis poderão conduzir as preferências por resinas de diferentes plantas. A composição é bem complexa, podendo ser encontrada em uma mesma região, própolis com constituições químicas diferentes, devido principalmente, à variedade de plantas em um mesmo espaço. Contudo, em geral, as própolis são basicamente constituídas de 50% de resinas, 30 a 40% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen e 5% de outros compostos orgânicos. As ceras são secretadas juntamente com outras secreções glandulares, já os demais constituintes são obtidos a partir das plantas (MARCUCCI, 1995; PARK *et al.*, 1998; LIMA, M., 2006; LUSTOSA *et al.*, 2008; WAGH, 2013).

Em algumas amostras, já foram encontrados elementos como prata, cério, mercúrio, alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2 e B6 (MARCUCCI, 1995).

Tecnicamente, quanto maior a fração de resinas, maior será a qualidade da própolis com relação às suas propriedades terapêuticas. Assim, mais de 300 constituintes já foram identificados e caracterizados em diferentes amostras de própolis, dentre eles: flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis e aminoácidos. Somente uma amostra pode conter mais de 100 compostos, destacando-se os ácidos fenólicos, ésteres e flavanoides (flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, chalconas), terpenos, β -esteroides, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados de estilbeno. Os flavonoides são considerados como os principais compostos responsáveis pelos efeitos bioativos da própolis, exercendo função antimicrobiana e antioxidante (LIMA, M., 2006).

Park, Ikegaki e Alencar (2000), após analisarem 500 amostras de própolis *in natura* em todo o Brasil avaliando a morfologia, coloração, características sensoriais e características físico-químicas, classificaram-nas em 12 grupos (Tabela 1). Os mesmos autores sugerem a necessidade de realização de um controle mais rigoroso com relação à qualidade das própolis comercializadas no Brasil, visto que a grande diversidade do bioma podem alterar as caracterizações.

Tabela 1 - Classificação das própolis brasileiras conforme sua localização e característica físico-química.

EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS			
Grupo	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem
Grupo 1 (RS)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park *et al.* (2000).

A própolis brasileira é rica e reconhecida no exterior como de ótima qualidade por apresentar uma composição química incomum quando comparada às amostras do resto do mundo. Um dos compostos que, isolado e está presente na própolis brasileira, é o álcool 10, 11-di-o-acetil desidrodiconiferílico, uma lignana, relatada pela primeira vez existente em produtos naturais, e que possui um alto poder terapêutico ao metabolismo humano (BANKOVA, 2005; LIMA, M., 2006).

3.5. Potencial bioativo das própolis

As propriedades biológicas das própolis estão intimamente ligadas à sua composição química, principalmente, às quantidades de compostos fenólicos e flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas) componentes importantes que desempenham funções básicas no organismo humano contribuindo para promoção da saúde e aumentando a

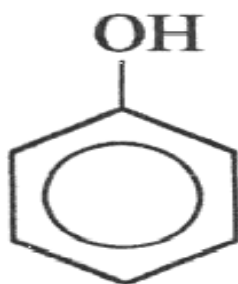
perspectiva de vida, pois ajudam no controle metabólico e na redução de radicais livres, os quais aceleram o envelhecimento e prejudicam a longevidade (SOARES; SÃO JOSÉ, 2013).

Os compostos fenólicos e os flavonoides presentes nas própolis são os principais responsáveis pelas ações antimicrobianas e antioxidantes. Essas atividades biológicas têm sido relatadas para o extrato etanólico de própolis também como antibacteriano, antiinflamatório, antiviral, antifúngico, anestésico, imunoestimulador e antitumoral (MARCUCCI, 1995; PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; BANKOVA, 2005).

Ângelo e Jorge (2006) descrevem os compostos fenólicos como produtos do metabolismo secundário das plantas, essenciais para o seu crescimento e reprodução, sendo facilmente formados quando submetidos a estresse por infecções, ferimentos ou radiações UV.

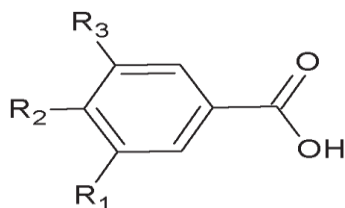
Um dos principais constituintes da própolis, os compostos fenólicos, são considerados antioxidantes naturais que reagem com espécies radiculares e são consumidos durante a reação (ÂNGELO; JORGE, 2006). Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de, pelo menos, um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático (Figura 5) com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

Figura 5 - Estrutura do fenol comum, ou ácido fênico, considerado o mais simples dos compostos fenólicos.



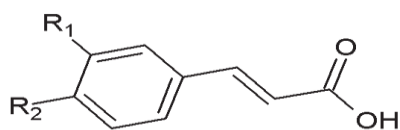
Fonte: Adaptado de Marcucci, Woisky e Salatino (1998).

Os polifenóis (Figura 6) compreendem àqueles compostos fenólicos que possuem múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura e podem ser divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que as ligam.

Figura 6 - Estrutura química dos polifenóis.**Ácido Hidroxidobenzóico**

$R_1=R_2=OH$, $R_3=H$: Ácido Protocatecuico

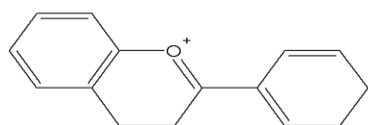
$R_1=R_2=R_3=OH$: Ácido Gálico

Ácido Hidroxicinâmico

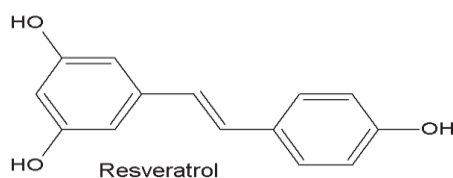
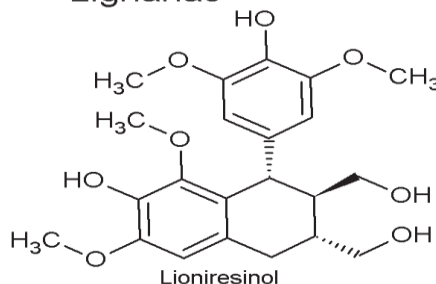
$R_1=OH$, $R_2=H$: Ácido Cumárico

$R_1=R_2=OH$: Ácido Caféico

$R_1=OCH_3$, $R_2=OH$: Ácido Ferúlico

Flavonóides

Ver Figura 2

Estilbenos**Lignanas**

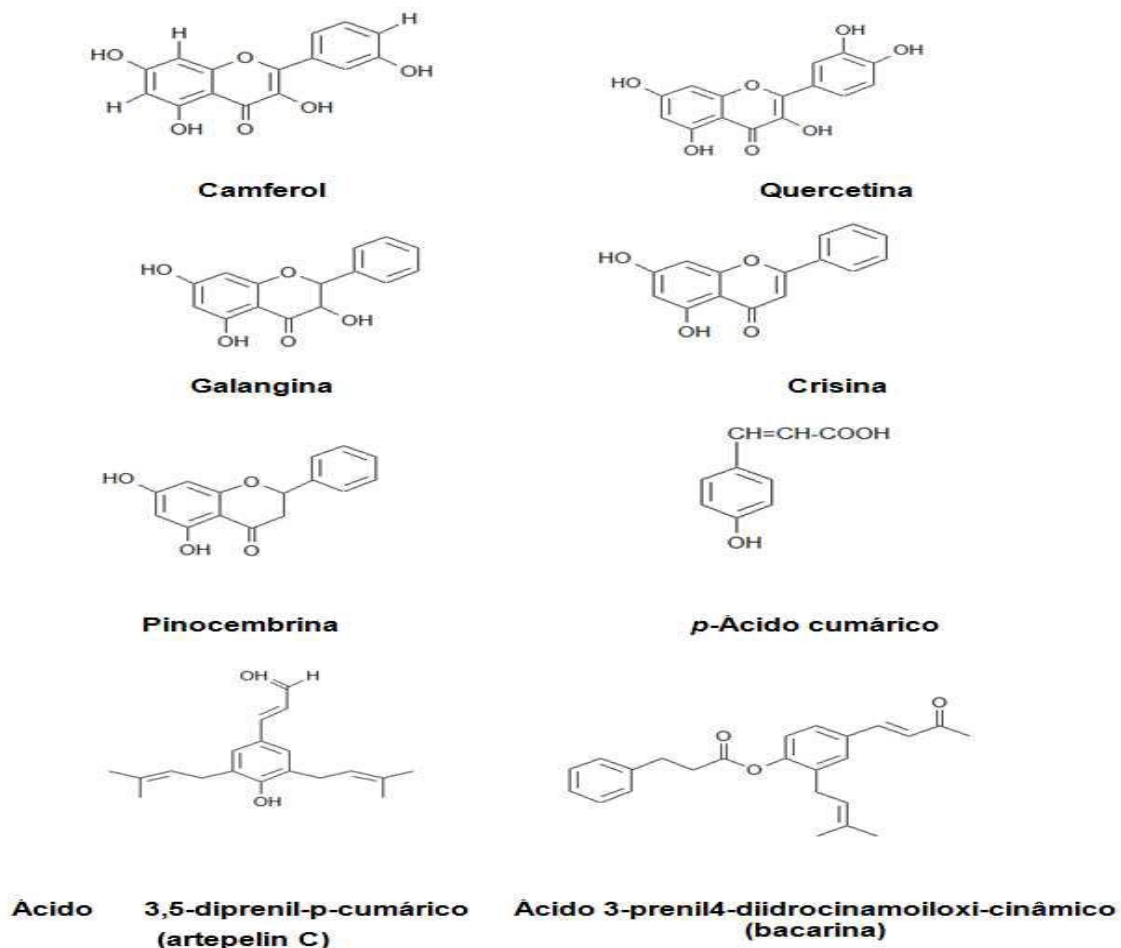
Fonte: adaptado de Archela e Dall'antonia (2013).

Dentre os cinco mil fenois existentes, destacam-se os ácidos fenólicos, como: ácidos benzóico, caféico, cumárico e ferúlico; os flavonoides, como a apigenina, o campferol e a quercetina, os fenois simples, as cumarinas, os taninos, as ligninas e os tocoferóis. Um destes compostos bem conhecido é a vanilina, composto fenólico de origem vegetal que confere aroma à baunilha. Particularmente, os flavonoides tem se destacado como um dos constituintes biologicamente ativos principais contidos nas própolis (CABRAL *et al.*, 2009), atribuindo às mesmas, a ação espasmolítica, antiinflamatória e antibacteriana (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

Na Figura 7, observam-se algumas estruturas químicas dos principais flavonoides encontrados na própolis. Marcucci, Woisky e Salatino (1998) reportam o camferol, quercetina, isorramnetina e galangina; as flavonas apigenina, luteolina, crisina e tectocrisina; flavanona pinocembrina e diidroflavonol pinobancsina, como os flavonoides mais comuns nas própolis. Os autores mencionam ainda o ácido ferúlico, ácido caféico, ácido gálico, ácido cumárico como ácidos fenólicos. Vargas-Sánchez; Torrescano-Urrutia e Sánchez-Escalante (2013), citam a rutina, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, crisina e

galangina, como os oitos flavonoides diferenciais que existem nas própolis que podem servir como parâmetro de qualidade das mesmas.

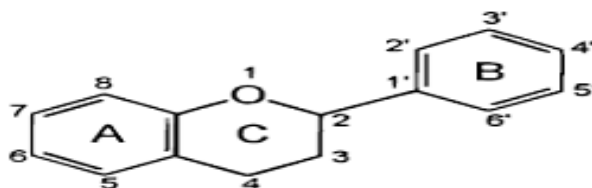
Figura 7 - Estruturas químicas dos principais flavonoides encontrados na própolis.



Fonte: adaptado de TORETI (2011).

Os flavonoides são classificados de acordo com a presença ou não de anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (Figura 8).

Figura 8 - Estrutura química básica de flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um intermediário (C).



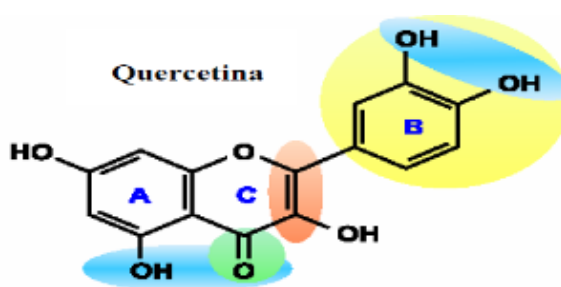
Fonte: adaptado de PIETTA (2000).

O potencial antioxidante de um composto é determinado pela reatividade dele como um doador de elétrons de hidrogênio, capacidade de deslocar ou estabilizar um elétron desemparelhado, reatividade com outro antioxidante e reatividade com oxigênio molecular. (MORAES; COLLA, 2006). Os flavonoides são facilmente oxidados pelo anel B, o que leva a abertura do mesmo no nível do átomo de oxigênio. Essa habilidade de seqüestrar radicais superóxidos é o principal mecanismo da proteção de flavonoides contra danos celulares mediados por radicais livres (OLDONI, 2007).

De todas as propriedades que a própolis possui, as atividades antimicrobiana e antioxidante são as mais extensivamente estudadas (BELMIRO; OKI; FERNANDES, 2011). O campo de ação da própolis ao nível antimicrobiano é amplo, conseguindo inibir o crescimento de bactérias, bolores e leveduras, mas a sua eficácia depende do microrganismo em causa, uma vez que estudos recentes evidenciam uma maior eficácia contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas (CABRAL *et al.*, 2009).

Oldoni (2007) relata que, a quercetina (Figura 9) apresenta atividade bioativa pela presença do grupo catecol no anel B em sua estrutura. Se houver a remoção do grupo 3-hidroxil do anel B, reduz-se a capacidade antioxidante no mesmo nível do canferol (que difere da quercetina porque tem somente um grupo hidroxil no anel B). O autor destaca a importância do catecol no anel B como determinante para a capacidade de sequestro de radicais.

Figura 9 - Estrutura genérica do flavonol quercetina.



Fonte: adaptado de OLDONI (2007).

A Figura 9 apresenta as características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonoides, envolvendo a importante presença do grupo catecol ou dihidroxil no anel B (destacado em amarelo). Outra característica é a presença da insaturação no anel C (destaque em vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (destaque em verde). Estes grupos podem explicar a habilidade dos flavonóides em quelar metais de transição como cobre e ferro (destaque em azul).

Na Tabela 2 estão apresentadas as principais classes de flavonoides com alguns exemplos e fontes de onde podem ser encontrados.

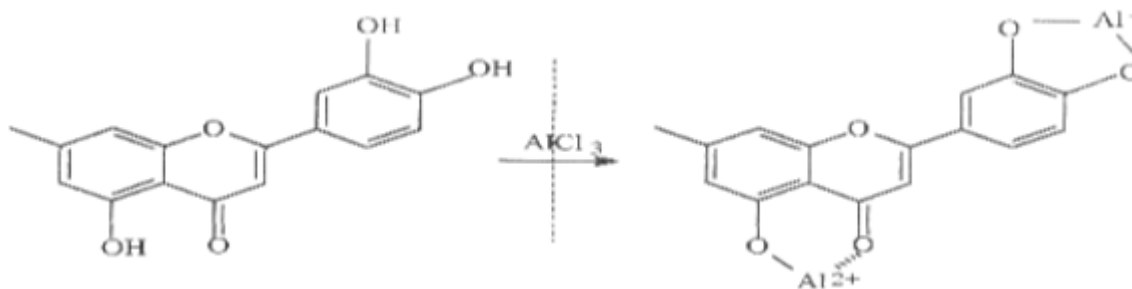
Tabela 2 - Principais classes de flavonoides.

CLASSES	EXEMPLOS	FONTES
Antocianinas	Cianidina, delphinidina	Frutas e flores
Flavanas (mono, bi e triflavanas)	Catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, thealfavina	Flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes chás e água de coco.
Flavononas	Hesperidina, narigenina	Frutas cítricas.
Flavonas	Apigenina, luteonina, diomestina, tangeretina, nobiletina, tricetina	Frutas cítricas, mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais.
Flavonois	Quercitina, rutina, miricetina	Vegetais e fruta.
Isoflavonoides	Daidzeínas, genisteína	Legumes, principalmente na soja.

Fonte: SILVA (2009).

Uma das possibilidades para quantificação de flavonoides é através do complexo flavonoide-Al (Figura 10) que tem a capacidade de absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide. A Tabela 3 apresenta as principais bandas de absorção dos compostos bioativos das própolis em presença do cloreto de alumínio.

Figura 10 - Formação do complexo flavonoide-Al em solução metanólica.



Fonte: adaptado de Marcucci, Woisky e Salatino (1998).

Tabela 3 - Bandas de absorção de flavonoides e ácidos fenólicos em solução metanólica e em presença de cloreto de alumínio (AlCl_3).

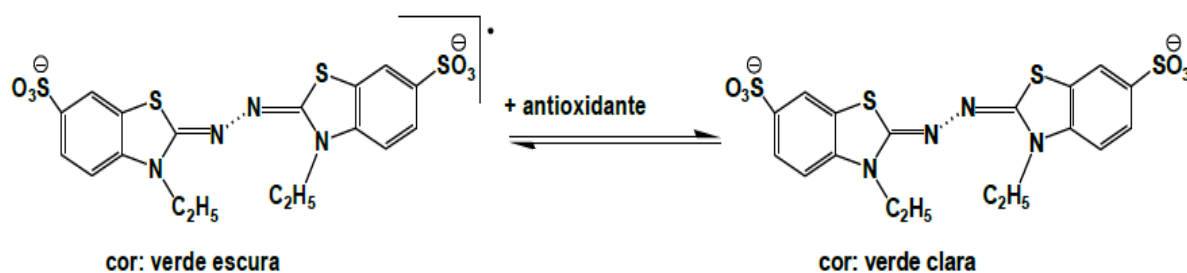
Tipo de flavonoide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl_3 (nm)
Flavonas	310-350	250-280	+ 35 – 55
Flavonois (3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50 - 60
Flavonois (sem 3-OH)	350-385	250-280	+ 35 – 55
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10 – 14
Isoflavonas (5-desoxi-6,7-dioxigenado)	320 pico	275-295	+ 11 - 30
Flavanonas e diidroflavonois	300-330 ombro	230-270	+ 20 – 26
Chalconas	340-390	230-270	+ 48 - 64
Auronas	465-560	270-280	+ 40 + 60 – 70

Fonte: adaptado de Marcucci, Woisky e Salatino (1998).

Métodos variados são utilizados para determinar a atividade antioxidante, a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas como lipídeos e DNA e a degradação de radicais. Dentre estes, destacam-se, os que envolvem a oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico e outras metodologias simples, mas com alto poder de relevância informativa, envolvendo o uso do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (cátion do 2,2 - azino - bis - 3 - etil - benzotiazolina - 6 - ácido sulfônico) (SILVA, A., 2009).

O método do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 11) sendo capaz de medir a atividade de compostos de natureza lipolítica e hidrofílica. Borges *et al.* (2014) relatam que o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pode ser determinado em unidades de concentração de trolox (6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) pois o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ será consumido reagindo com amostras contendo compostos fenólicos, dando uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante.

Figura 11 - Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: adaptado de Rufino *et al.* (2007).

3.6. Importância da própolis para indústria alimentícia

As indústrias alimentícias tem se preocupado em manter os alimentos cada vez mais naturais e, com isso, estão diminuindo o uso de aditivos sintéticos em alimentos industrializados. Os antioxidantes naturais, os mais procurados, já estão sendo testados gradativamente para entrar no mercado consumidor (VARGAS-SÁNCHEZ; TORRESCANO-URRUTIA; SÁNCHEZ-ESCALANTE, 2013).

As própolis podem ser utilizadas como conservantes naturais em alimentos industrializados por possuírem atividades antimicrobianas e antioxidantes, desde que cumpram os requisitos propostos pela legislação. Os produtos que as possuírem em sua composição são considerados alimentos funcionais por conferirem propriedades benéficas para a saúde humana (ALBUQUERQUE; ROMEIRO; ALBUQUERQUE., 2013).

Tem-se registro que, na década de 80, já havia uso em larga escala de própolis na indústria de alimentos, diferentemente do que se pensava que a sua utilização era restrita somente às indústrias de farmácias. As própolis eram usadas em bebidas, como alimento funcional, suplemento alimentar (conservação de alimentos, germicida e inseticida) por conter flavonoides (LUO *et al.*, 2011).

Observa-se que, com a preocupação dos consumidores em obter melhor qualidade de vida optando por hábitos saudáveis, as indústrias brasileiras estão investindo cada vez mais em produtos naturais, fator este que tem contribuído para o desenvolvimento de alimentos funcionais (MORAES; COLLA, 2006). No Brasil, algumas marcas já industrializam produtos assemelhando-os aos naturais, tais como: chá, chocolates, balas, pastilhas, cosméticos e de higiene pessoal feito à base de própolis ou extratos de própolis (COSTA *et al.*, 2013).

Evidências científicas apontam para os benefícios à saúde resultantes do consumo de alimentos contendo compostos fenólicos. O fato desses, poderem agir como antioxidantes

ou pró-oxidantes, dependendo das condições, indica que o seu consumo, na forma de suplemento alimentar ou mesmo em alguns alimentos, pode não ser prudente até existir um conhecimento mais aprofundado sobre os mesmos, já que ainda não são bem conhecidas as relações entre a sua bioatividade e as suas propriedades antioxidantes (COMPOSTOS, 2011).

Há, mundialmente, cerca de 240 patentes de produtos derivados de própolis, muitas delas associadas a produtos dermatológicos, odontológicos, cosméticos, alimentos e remédios (ALBUQUERQUE; ROMEIRO; FIGUEIREDO, 2013).

Albuquerque, Romeiro e Figueiredo (2013) descrevem os padrões para utilização da própolis em produtos alimentares. Além de estarem de acordo com a legislação elas devem seguir aos seguintes requisitos:

- 1) Devem estar na forma de extrato, livre dos componentes que não são solúveis em água ou não sejam digeríveis, como as ceras.
- 2) O extrato não poderá apresentar um alto teor alcoólico, como ocorre nos extratos destinados à indústria;
- 3) Não poderá conter substâncias em dosagem que possam ter efeito medicinal, terapêutico, funcional ou tóxico ao consumidor;
- 4) O extrato da própolis não poderá conter contaminantes externos, decorrentes de falta de higiene e de más práticas de fabricação como cabelos, sujidades, coliformes fecais e microrganismos em atividade;
- 5) O extrato deverá ter baixo custo de produção, para viabilizar a sua exploração econômica pelas indústrias alimentares.

Considerando que a extração dos componentes da própolis e sua solubilização são melhores em meio alcóolico, e por ter a própolis um sabor e aromas acentuados, o uso dos extratos etanólicos das própolis em produtos alimentares, torna-se limitado. Nori e colaboradores (2011) afirmam ser um possível aditivo natural para a indústria alimentícia as microcápsulas de própolis em forma de pó, livre de álcool e com boa solubilidade controlada em alimentos, mantendo os compostos fenólicos, flavonoides, a capacidade antioxidante, bem como a atividade antibacteriana sobre os *Staphylococcus aureus* obtidos em seus estudos.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção das amostras de própolis

As própolis foram coletadas de núcleos apícolas habitados por abelhas melíferas africanizadas localizados em áreas rurais na região Noroeste do Estado do Ceará, mais precisamente nos municípios de Sobral, Meruoca, Alcântaras, Mucambo, Santana do Acaraú, Graça, Granja e Bela Cruz, perfazendo um total de 15 amostras. O perímetro percorrido foi de 360 quilômetros totalizando uma área de aproximadamente 5.834 km². As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro, abril, maio e junho de 2015. As coordenadas das áreas rurais visitadas onde estavam localizados os apiários foram georreferenciadas a partir de levantamentos topográficos utilizando um GPS (Global Positioning System) Garmin, modelo Etrex, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Locais de coleta das amostras de própolis de *Apis mellifera* L. nos 8 municípios da região Noroeste do Ceará.

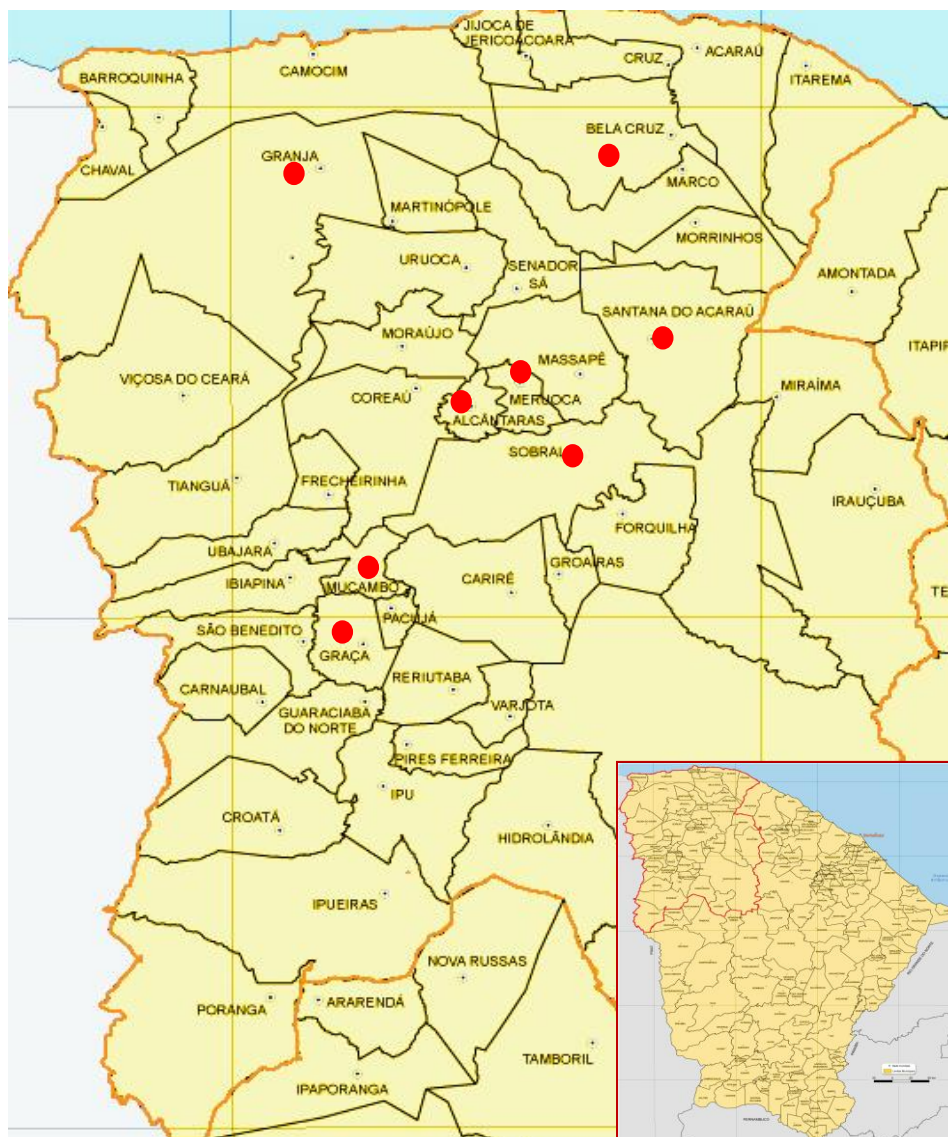
Município	Vegetação	Distrito	Latitude	Longitude	Mês de coleta
Alcântaras	Mata atlântica	Caldeirão	3°28'13.39"S	40°33'10.08"O	Maio/2015
		Sítio Belém I	3°36'21.76"S	40°34'45.66"O	Maio/2015
		Sítio Belém II	3°40'3.06"S	40°38'24.00"O	Maio/2015
Bela Cruz	Mata atlântica	Aguiar	3° 2'6.06"S	40°12'36.90"O	Abril/2015
		Timbira	3° 2'8.64"S	40°11'49.92"O	Abril/2015
Granja	Mata atlântica	Granja	3° 7'17.41"S	40°48'17.16"O	Maio/2015
Graça	Caatinga	Graça	4° 7'25.74"S	40° 5'49.88"O	Junho/2015
Meruoca	Mata atlântica	Santo Elias	3°36'55.50"S	40°18'31.80"O	Maio/2015
Mucambo	Caatinga	Carqueijo	3°50'16.86"S	40°44'19.80"O	Maio/2015
		Lajes do Juca	3°51'59.76"S	40°44'50.40"O	Maio/2015
Santana do Acaraú	Caatinga	Floresta	3°26'30.60"S	40°10'22.56"O	Junho/2015
Sobral	Caatinga	Morro do Barriga I	3°38'22.67"S	40°13'22.14"O	Fevereiro/2015
		Morro do Barriga II	3°38'13.59"S	40°11'50.51"O	Fevereiro/2015
		Morro do Barriga III	3°39'23.10"S	40°11'43.60"O	Maio/2015
		Tuína	3°34'59.07"S	40°18'53.52"O	Abril/2015

Fonte: Autor (2015).

Inicialmente, foram feitas em cada colmeia dos apiários, a limpeza da tampa e da melgueira, a fim de eliminar a própolis velha (oxidada) e garantir a coleta de própolis nova. Após essa limpeza, aguardou-se um período de 15 a 20 dias para produção das própolis e, em seguida, realizou-se a coleta.

Todas as amostras foram cedidas por apicultores que exploram somente o mel ou que possuem apiário somente para fins não comerciais e, que se propuseram em contribuir cedendo as própolis produzidas em seus apiários para avaliar a qualidade das mesmas. A Figura 12, ilustra a localização dos apiários da região Noroeste do Estado do Ceará, onde foram coletadas as própolis para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 12 - Mapa do Estado do Ceará com delimitação do Noroeste cearense, indicando as cidades onde foram coletadas as própolis de *Apis mellifera* L. utilizadas na pesquisa.



Fonte: adaptado de Guia geográfico (2015).

O material foi coletado diretamente nos apiários por raspagem das tampas (Figura 13 A) e das melgueiras, retirando-se das fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia (Figura 13 B), tendo o cuidado de não atingir a madeira de ambas as partes da colmeia. Após a raspagem, o material coletado foi acondicionado em depósitos plásticos devidamente etiquetados e acondicionados em isopor com gelo e encaminhado para o Laboratório de Tecnologia de Química (LTQ) do IFCE *Campus* Fortaleza onde permaneceu armazenado em freezer (-2 °C) até o momento do início de cada ensaio experimental.

Figura 13 - Coleta da própolis por raspagem na parte superior e interna da melgueira (A) e na parte interna da tampa da colmeia (B).



Fonte: Autor (2015).

4.2. Análises físico-químicas da própolis bruta

4.2.1. Características sensoriais

As análises sensoriais foram realizadas por cinco avaliadores não treinados no próprio Laboratório de Tecnologia Química do IFCE, *Campus* Fortaleza. As amostras de própolis foram apresentadas separadamente e, cada provador, avaliou a amostra quanto aos seguintes atributos: consistência (temperatura ambiente), cor, aroma, sabor e granulometria, procurando seguir os parâmetros preconizados pela Instrução Normativa nº03 de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, para o aroma, cor, sabor e consistência.

4.2.2. Preparo das própolis para realização das análises físico-químicas

Em laboratório, as própolis brutas passaram por uma limpeza manual, retirando-se quaisquer pedaços de madeira ou outros materiais visíveis não pertencentes à própolis como restos de abelhas ou outros insetos. Em seguida, foram trituradas em liquidificador convencional e depois por fricção em pistilo e almofariz até obtenção de uma massa seca aparentando um pó fino (Figura 14).

Figura 14 – Exemplo típico da amostra de própolis utilizada nos experimentos após trituração.



Fonte: Autor (2015).

4.2.3. Perdas por dessecação

Para esta análise, foram transferidas cerca de três gramas da amostra em pó para um cadinho de porcelana previamente dessecado. Após resfriamento em dessecador, anotou-se a massa dos cadinhos vazias e depois com a amostra, os quais foram levados a estufa e secos a 95 °C por 6 horas. Após dessecação até peso constante, o material foi finalmente levado à balança analítica onde a massa dessecada foi pesada (IAL, 2005). O experimento foi executado em triplicata e o resultado expresso em porcentagem.

4.2.4. Cinzas

Nesta determinação, cerca de dois gramas de cada amostra de própolis, foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, esfriados em dessecador e tarados. Em seguida o material foi aquecido até carbonização em mufla a uma temperatura de

550 °C $\pm$ 50 °C por 6 horas. Passado o tempo, os cadinhos foram retirados da mufla, esfriados em dessecador por mais ou menos 2 horas e depois pesados. Este procedimento foi repetido até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior que 0,5 mg. As determinações foram feitas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem (IAL, 2005).

4.2.5. Ceras

Para determinar o teor de cera, aproximadamente 1,5 gramas da amostra triturada (P1) foi colocada em cartucho de celulose previamente seco em estufa, esfriado em dessecador e pesado, em seguida, coberto com algodão e levado ao extrator Soxhlet onde permaneceu por 6 horas em refluxo com 150 mL de álcool etílico de grau alcoólico a 99,8°GL. Após resfriamento, o extrato foi levado à geladeira por 24 h e, posteriormente, ao freezer por 30 minutos. Finalmente, a solução foi filtrada em funil de vidro usando papel filtro nº4, previamente seco e pesado. A cera depositada sobre o papel filtro foi lavada a frio com porções de 20 mL de álcool etílico até sua clarificação. O volume de extrato livre de cera foi medido em proveta de 500 mL e acondicionado em recipiente de vidro âmbar vedado. O conjunto papel de filtro + cera foi levado à capela de exaustão, por 1 h, para eliminação do excesso do solvente em seguida seco em estufa a $\pm$ 90°C, por 30 minutos, resfriado em dessecador e pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do material foi repetido com intervalos de 1 h até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu a 5 mg). A análise foi realizada em triplicata e o teor de cera foi calculado pela razão entre a massa de material retido no filtro e a massa inicial de própolis utilizada na extração, sendo expresso em porcentagem (FUNARI; FERRO, 2006).

4.2.6. Massa mecânica (resíduos insolúveis em etanol)

O cartucho de celulose utilizado na extração por Soxhlet durante a determinação do teor de cera contendo substâncias foi colocado sobre vidro de relógio e levado à capela de exaustão para evaporação do excesso de solvente e, em seguida, a estufa a $\pm$ 90 °C por 2 h. O conjunto foi resfriado em dessecador e o cartucho (contendo o resíduo) foi pesado isoladamente. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do cartucho foi realizado até atingir peso constante. Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo insolúvel

foi calculado pela razão entre a massa do resíduo retido no cartucho e a massa inicial de própolis, sendo expresso em base percentual (FUNARI; FERRO, 2006).

4.2.7. Solúveis em etanol (Resíduo seco)

A partir do extrato etanólico da própolis do item 4.2.5 foi determinada a quantidade de substâncias solúveis em etanol pesando-se em béquer previamente seco e dessecado uma determinada massa (geralmente 10 g) do extrato etanólico ($P1$), a qual foi submetida à secura em banho-maria. Após completa evaporação, o resíduo foi levado à estufa a $\pm 90^{\circ}\text{C}$ para secagem e pesado até peso constante ($P2$). O procedimento foi realizado em triplicata e o valor de solúveis em etanol expresso em porcentagem utilizando as Equações 1 e 2 a seguir. Esta metodologia foi adaptada a partir de Melo, Matsuda e Muradian-Almeida (2012).

$$C \text{ (mg/mL)} = \frac{P2 \times 1000 \times D}{P1} \quad (1)$$

$$SE \text{ (\%)} = \frac{P2 \times 100}{P1} \quad (2)$$

Onde: $P1$ = peso inicial da amostra, $P2$ = peso do resíduo, D = densidade do extrato (g/mL), C = concentração de solúveis (mg/mL) e SE = % solúveis em etanol.

4.3. Obtenção do extrato etanólico de própolis (EEP)

Para a obtenção do extrato etanólico de própolis EEP, foram adicionados 15 mL de etanol a 70% em aproximadamente 0,5 g da amostra pulverizada deixando em contato por 10 minutos sob a agitação em banho-maria. O conjunto foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. O mesmo procedimento foi realizado por mais três vezes e, ao final, o volume do balão foi aferido com o solvente. O preparo dos extratos foi feito em triplicata e serviram para realização das análises de pH, solubilidade em acetato de chumbo, solubilidade em hidróxido de sódio, absorção no UV-Vis, fenóis totais e flavonoides totais (PARK *et al.*, 1998, MELO; MATSUDA, MURADIAN-ALMEIDA, 2012).

4.3.1. pH

O pH dos EEP foi determinado com auxílio de um potenciômetro digital modelo Orior DualStar pH/ISE Benchtop devidamente calibrado.

4.3.2. Solubilidade em acetato de chumbo

Para a determinação da solubilidade em acetato de chumbo; 0,5 mL de EEP foram colocados em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de 10% de acetato de chumbo. A solução foi agitada e deixada em repouso por um período de três minutos. Um precipitado amarelo homogêneo na parte inferior do tubo de ensaio confirma o resultado de solubilidade (AOAC, 1995).

4.3.3. Solubilidade em hidróxido de sódio

A solubilidade em hidróxido de sódio foi determinada, adicionando-se em um tubo de ensaio 0,5 mL do EEP mais 0,5 mL de hidróxido de sódio a 50%, os volumes foram homogeneizados em agitador de tubos e, em seguida, deixados em repouso por três minutos. O resultado foi considerado positivo quando detectada a formação de um precipitado branco no fundo do tubo de ensaio (AOAC, 1995).

4.3.4. Absorção no ultravioleta-visível dos EEP

Para avaliação das características espectroscópicas no ultravioleta-visível, diluiu-se o extrato etanólico (EPP) na proporção de 1:1000 em álcool a 70%, conforme metodologia adaptada de Park, Ikegaki e Alencar (2000). As leituras de absorção molecular foram feitas na região do UV-Vis das amostras na faixa de comprimento de onda entre 200 e 600 utilizando um espectrofotômetro Evolution™ 60S da Thermo Scientific.

4.3.5. Determinação do teor de fenois totais

O teor de fenois totais foi realizado por espectroscopia na região do visível usando padrões de ácido gálico monohidratado de alto grau de pureza, conforme o método de Folin-Denis. A metodologia de fenois totais por Folin-Denis é uma reação de óxido-redução baseado no uso de compostos com estrutura fosfotúngstica-fosfomolibídica como reagente de

colorimétrico, sendo o íon fenolato oxidado sob as condições alcalinas enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico, resultando uma solução de coloração azul (ÂNGELO; JORGE, 2007; WOISKY; SALATINO, 1996;).

Na determinação, são adicionados 5 mL do reagente de Folin-Denis e 10 mL de carbonato de sódio 20% aos padrões de ácido em balão de 100 mL. Ao fim do preparo, as soluções são deixadas em repouso, por 30 minutos, a temperatura ambiente e, então, efetuada a leitura a 760 nm. Para quantificação das amostras, utilizou-se o mesmo procedimento substituindo a solução de ácido gálico por 2 mL da solução EEP diluída. O conteúdo total de fenólicos foi expresso em % de EAG (equivalentes de ácido gálico) conforme descrito por Melo; Matsuda e Muradian-Almeida (2012) e Funari e Ferro (2006). A curva de calibração correspondente está apresentada no Anexo I, desta dissertação.

4.3.6. Determinação de Flavonoides totais

Neste método, utiliza-se a leitura em espectrofotômetro a 425 nm dos quelatos estáveis formados entre o cloreto de alumínio (AlCl_3) e compostos flavonoides (MARCUCCI *et al.*, 1998; WOISKY; SALATINO, 1996). Para a determinação de flavonoides totais, uma curva padrão com quercetina di-hidratada. Para a quantificação de flavonoides totais nas amostras foram utilizados 2 mL da solução EEP diluída em balão de 25 mL. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis (FUNARI; FERRO, 2006; MELO; MATSUDA; MURADIAN-ALMEIDA, 2012; PARK *et al.*, 1998,). A curva de calibração correspondente está apresentada no Anexo I, desta dissertação.

4.4. Atividade Antioxidante dos EEP

4.4.1. Método qualitativo do índice de oxidação

A análise foi realizada pipetando-se 2 mL do EEP em 48 mL de água destilada para obtenção de um diluído do extrato. A um tubo de ensaio de 15 mL, previamente lavado e seco, pipetou-se 0,5 mL do extrato diluído; 0,5 mL de água destilada, 1 mL de ácido sulfúrico 20%, misturando bem em vortex. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, acrescenta-se 5 μL de KMnO_4 0,1 N e agita-se rapidamente, sendo anotado o tempo de desaparecimento da cor

rosa. O teste foi feito em duplicata e o resultado expresso pelas médias dos tempos registrados em segundos (MELO; MATSUDA, MURADIAN-ALMEIDA, 2012).

4.4.2. Atividade sequestrante pelo método do radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+} (mono cátion do 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) usou-se a metodologia descrita por Re *et al.*, (1999) com adaptações de Rufino *et al.*, (2007).

Experimentalmente, o radical ABTS^{•+} é formado a partir da reação do ABTS com persulfato de potássio por 16 h à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após esse tempo, a solução é diluída em etanol anidro até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 nm ($\pm 0,05$) em comprimento de onda de 734 nm. Para as amostras, foram preparados extratos contendo cerca de 0,5 g da própolis pulverizada, a qual se adiciona 40 mL de metanol 50%. O sistema é homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos, transferindo-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adiciona-se 40 mL de acetona 70%, homogeneiza-se e deixa-se em repouso por mais 60 minutos também a temperatura ambiente. O extrato cetônico é centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos e transfere-se o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o extrato metanólico, aferindo-se o volume para 100 mL com água destilada. A esse extrato, adiciona-se o radical ABTS e após 6 minutos da reação, determina-se a absorvância a 734 nm em espectrofotômetro Evolution™ 60S UV-Visible da Thermo Scientific.

Para a curva padrão, utiliza-se o antioxidante sintético trolox (6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) nas concentrações de 100 a 2000 μ M em etanol conforme descrito por Rufino *et al.*, (2007). Por esta metodologia, os resultados são expressos em mg de trolox/g de amostra ou Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC, em inglês), onde um Equivalentes de Trolox corresponde a um micromol de trolox/100 g de amostra. A curva de calibração está apresentada no Anexo II, desta dissertação.

4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada em quatro concentrações de extrato etanólico de própolis: 50%, 25%, 10% e 3% (m/v). Para o ensaio, uma massa de própolis

bruta triturada (10 g) foi deixada em infusão em 15 mL de etanol 70% por 18 h com agitação ocasional. O extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo e o resíduo lavado com uma porção de 5 mL de etanol 70%, conforme descrito em Borges *et al.*, (2014) com as devidas modificações. A partir da primeira concentração (50%), por diluição, foram obtidas as demais.

Culturas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fornecidas pelo Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Ceará, encaminhadas e mantidas no laboratório de microbiologia do IFCE Campus Sobral foram utilizadas como bactérias-alvo. As bactérias foram ativadas em meio Brain Heart Infusion (BHI), incubadas a 35 °C por 18 horas para obtenção do inóculo microbiano, com repetição do procedimento para garantir a ativação. Após esse tempo, os inóculos permaneceram por mais 4 horas a 35° C em fase ativa de crescimento. A concentração foi ajustada com a diluição das bactérias em solução salina 0,9% até a obtenção de absorbância de 0,08 em espectrofotômetro Spectrum no comprimento de onda de 560 nm relacionado à escala de *Mac Farland*, a qual corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (NCCLS, 2003).

4.5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

As culturas bacterianas ativas nas concentrações desejadas foram inoculadas por espalhamento com swab em placas de petri contendo ágar Müller-Hinton. Discos de 6 mm foram colocados sobre as placas inoculadas, adicionados de 0,5µL de cada concentração dos extratos (50%, 25%, 10% e 3%) e incubados a 35 °C por 18 horas. Os resultados foram expressos como milímetros do halo de inibição de crescimento microbiano. Discos contendo álcool a 70% foram empregados como controle negativo da atividade inibitória do crescimento bacteriano. O tempo do ajuste das culturas até a inoculação em placas e aplicação dos discos e extratos não ultrapassaram 20 minutos.

4.6. Análises estatísticas dos resultados

Todas as experiências foram realizadas com repetições (triplicatas ou duplicatas). Os resultados foram expressos como valores médios e desvios padrões e, as diferenças entre as amostras, foram determinadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey em nível de 95% de significância. Para as estimativas estatísticas foi utilizado o programa ASSISTAT® versão 7.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização físico-químicas das própolis

5.1.1. Análise sensorial

A inspeção visual permitiu observar para a cor das própolis tonalidades em verde, esverdeado, amarelado, avermelhado, marrom-esverdeado, marrom-amarelado, marrom escuro, marrom, marrom claro e pardo. A Figura 15 ilustra as cores identificadas pelos provadores, conforme a legislação vigente. De acordo com Marcucci (2008), os aspectos visuais das própolis são extramamente importantes e, a partir deles, prever-se o nível de qualidade das mesmas, já que os aspectos sensoriais são requisitos preliminares de compra e venda.

Figura 15 – Imagens das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.



Fonte: Autor (2015).

Funari e Ferro (2006) destacam a importância da análise sensorial das própolis na qualidade de classificá-las quanto as suas propriedades biológicas. As própolis são conhecidas por sua cor e consistência e isso a faz conhecer sua classificação (GHISALBERTI, 1979). Um dos exemplos mais populares são as própolis verde de maior preferência no mercado internacional e, atualmente, a própolis vermelha de origem botânica *Dalbergia ecastophyllum* encontrada na região Nordeste do Brasil, a qual está sendo bastante investigada em função de suas ações antimicrobianas (SIQUEIRA *et al.*, 2014), sugerindo existir um elo entre sua coloração e seu alto teor de compostos fenólicos.

A fitogeografia contribui para os aspectos sensoriais das própolis, visto que ao redor das colmeias dos apiários estudados foram encontradas com frequências espécies vegetais como o mofumbo (*Combretum leprosum*), o marmeleiro (*Croton sonderianus*), o pau-branco (*Auxemma oncocalyx*), o pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*), o angico-de-bezerro (*Piptadenia moniliformis*) e a aroeira (*Astronium urundeuva*). Apesar da semelhança entre as floras, as características sensoriais demonstraram-se distintas e, apenas nas localidades de Aguiar e Timbira, localizadas no Município de Bela Cruz, a vegetação foi diferente das demais, provavelmente, por ser uma região litorânea e por mostrar predominância de cajueiros (*Anacardium occidentale*).

Ikegaki (2001) também verificou em seus estudos, perfil de própolis semelhantes localizados em sítios distintos, embora relacione que pode ocorrer o inverso, ou seja, em um mesmo apiário, as abelhas produzirem própolis de composições diferentes. Os autores atribuem este fenômeno ao fato de que as abelhas possuem grupos de genes em seu código genético que codificam a informação, sugerindo o tipo de vegetação que devem procurar. Nesse pressuposto, abelhas que habitam locais completamente diferentes, podem conter o mesmo código genético e assim produzirem própolis com características e composições iguais.

As amostras apresentaram sabor de forte e picante a suave balsâmico. A textura analisada e a temperatura ambiente mostraram variações na consistência de maleável a rígida e, em todo o material estudado, a granulometria foi do tipo heterogênea. O aroma balsâmico característico foi detectado em todo o processo analisado. Os resultados da avaliação sensorial quanto à cor, a consistência, o aroma e o sabor estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação sensorial das amostras das própolis da região Noroeste do Estado do Ceará.

Localidade	Vegetação	Características sensoriais				
		Aroma	Cor	Sabor	Consistência	Granulometria
Caldeirão	Mata atlântica	Balsâmico	Amarelada	Suave	Maleável	Heterogênea
Sítio Belém I		Balsâmico	Marrom	Suave	Extremamente maleável	Heterogênea
Sítio Belém II		característico	Parda	balsâmico	Maleável	Heterogênea
		Balsâmico característico		Suave balsâmico		
Aguiar	Mata atlântica	Balsâmico	Marrom amarelada	Suave	Maleável	Heterogênea
Timbira		Balsâmico forte	Avermelhada	Forte	Maleável	Heterogênea
Graça	Caatinga	Resinoso suave	Esverdeada	Suave	Rígida	Heterogênea
Granja	Mata atlântica	Suave resinoso	Parda	Sauve	Extremamente maleável	Heterogênea
Santo Elias	Mata atlântica	Balsâmico característico	Marrom escuro	Suave balsâmico	Extremamente maleável	Heterogênea
Carqueijo	Caatinga	Balsâmico	Avermelhada	Forte e picante	Maleável	Heterogênea
Lajes do Juca		Balsâmico	Marrom claro	Sauve	Maleável	Heterogênea
Floresta	Caatinga	Resinoso forte	Esverdeada	Forte e picante	Rígida	Heterogênea
Morro do Barriga I	Caatinga	Resinoso	Verde	Suave	Rígida	Heterogênea
Morro do Barriga II		Balsâmico	Verde	Suave	Rígida	Heterogênea
		Suave resinoso				
Morro do Barriga III		Balsâmico	Verde	Forte	Rígida	Heterogênea
		Resinoso				
Tuína		Balsâmico				
		Forte resinoso	Marrom esverdeado	Forte e picante	Pouco rígida	Heterogênea

Fonte: Autor (2015).

Dados similares foram encontrados por Cahillou, Herrera e Maidana (2004) em amostras analisadas em Santiago, onde todas as própolis foram classificadas como heterogêneas onde 40% apresentavam textura maleável e 75% aroma resinoso e o sabor das própolis foi definido como picante.

Lozina *et al.*, (2010) em seus estudos com 15 amostras de própolis argentinas encontrou 40 % das amostras em temperatura ambiente como rígidas e 60 % como maleáveis, enquanto que o aroma foi do tipo resinoso para 66,7 % do conteúdo analisado.

Silva (2009) em seus estudos encontrou própolis esverdeada de consistência rígida e de aroma e sabor balsâmico, classificada por ela como de melhor qualidade.

Em geral, a consistência e a temperatura ambiente podem variar de mole e pegajosa à rígida (GHISALBERTI, 1979; BRASIL, 2001), estando tal característica associada à relação resina/cera. Quanto mais rígida a consistência da própolis, maior será a quantidade de resina e consecutivamente menor o teor de cera (FERRO; FUNARI, 2006). Neste contexto, as própolis em estudo mostraram uma tendência evidente de sabores suaves, aromas característicos balsâmicos e consistências entre maleável e rígida.

A importância das características sensoriais é ressaltada por Silva (2009), principalmente, quando se visa o mercado internacional, onde a própolis brasileira é fortemente requisitada, particularmente as de cor verde, que comumente indica alta incidência de componentes bioativos.

Do ponto de vista sensorial, os atributos observados em todas as amostras de própolis de *Apis mellifera* L, encontraram-se em conformidade com os padrões de qualidade determinados pelo MAPA (BRASIL, 2001). As própolis das localidades Morro do Barriga I, Morro do Barriga II e Morro do Barriga III, conforme os provadores, apresentaram melhor qualidade sensorial, dentro dos exigidos padrões de mercado por possuírem a cor verde, a consistência rígida, o sabor suave e o aroma resino balsâmico.

5.1.2. Análises físico-químicas

As análises de perda por dessecação, teor de cinzas, teor de ceras, sólidos solúveis, massa mecânica e pH, reúnem os dados de análises físico-químicas e expressam os requisitos de qualidade das própolis. Os resultados da caracterização das amostras coletadas estão apresentados na Tabela 6. As médias dos valores encontrados diferem entre si em nível de significância de 5% pelo o Teste de Tukey.

Tabela 6 - Caracterização físico-química das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.

Amostra	pH	Análises				
		Perda por dessecação (%m/m)	Cinzas (%m/m)	Ceras (%m/m)	Massa mecânica (%m/m)	Solúveis em etanol (%m/m)
Aguiar	5,24±0,01	7,0±0,13	3,5±0,29	9,1±0,04	39,3±0,12	35,3±0,09
Timbira	5,33±0,03	9,1±0,13	2,6±0,09	26,6±0,23	43,6±0,14	14,2±0,11
Lajes do Juca	4,80±0,02	5,7±0,06	3,6±0,08	15,2±0,08	26,8±0,23	36,6±0,19
Carqueijo	4,64±0,01	7,1±0,22	2,5±0,25	10,5±0,12	32,9±0,16	43,8±0,16
Floresta	5,55±0,01	6,2±0,32	2,5±0,09	12,2±0,12	39,0±0,09	39,0±0,23
Graça	4,87±0,01	7,0±0,05	2,9±0,21	12,5±0,14	36,0±0,18	41,0±0,22
Granja	4,98±0,02	11,4±0,11	1,9±0,02	3,9±0,21	39,6±0,12	29,4±0,09
Caldeirão	4,93±0,02	4,4±0,09	2,9±0,06	14,6±0,05	33,3±0,14	37,6±0,12
Sítio Belém I	4,01±0,02	7,6±0,24	3,0±0,05	12,2±0,16	37,9±0,11	32,4±0,21
Sítio Belém II	5,03±0,02	8,5±0,17	4,0±0,05	8,2±0,22	39,0±0,12	33,3±0,19
Morro do Barriga I	5,47±0,01	8,4±0,08	2,1±0,09	6,2±0,05	45,5±0,09	35,7±0,15
Morro do Barriga II	5,25±0,01	7,3±0,16	2,8±0,01	3,2±0,07	38,2±0,12	42,7±0,14
Morro do Barriga III	5,40±0,01	7,5±0,18	2,6±0,01	1,7±0,04	36,8±0,16	50,9±0,26
Tuína	5,14±0,03	2,1±0,23	2,0±0,2	10,4±0,11	23,6±0,22	58,2±0,12
Santo Elias	5,31±0,01	10,6±0,33	2,9±0,15	16,6±0,16	37,5±0,21	28,9±0,22
Parâmetros do MAPA ²	Não especificado	Max. 8%	Máx.5%	Máx.25%	Máx. 40%	Mín. 35%

¹Resultado das médias $\pm$ desvio padrão dos resultados em triplicata.

²Parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de acordo com a IN 03/2001.

Fonte: Autor (2015).

No que diz respeito ao pH dos EEP, os valores variaram de 4,01 a 5,55. Souza (2010) encontrou valores de pH para amostras de EEP obtidas por raspagem nas melgueiras

de apiários em São Paulo entre 4,7 e 5,2, muito próximos aos observados por Polese; Pastore e Garcia (2009) que também encontram pHs entre 4,88 e 5,16 para amostras de propólis.

Tagliacollo e Orsi (2011) relataram valores de pH próximos a 5,0 na análise de diversas amostras de propólis. Todos estes resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo. Marcucci e Custódio (2002) afirmam que a faixa do pH nominal da propólis, normalmente descrita na literatura está entre 4,0 a 5,5), principalmente em função da composição química, associada a presença dos ácidos fenólicos.

As perdas por dessecação expressam as umidades das propólis, e quando se encontram acima do estabelecido, podem acarretar desenvolvimento de fungos e mofo, gerando fermentações indesejáveis e tornando o material impróprio para o comércio além de gerar toxinas prejudiciais à saúde (GARCÍA *et al.*, 2010; MARCUCCI, 2008). A manipulação excessiva resulta em valores elevados de umidade pelo contato prolongado com o ambiente externo (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012).

Nesta pesquisa, os valores encontrados variaram de 2,1 a 11,4%, e, em cinco localidades, as umidades encontradas estiveram acima do padrão estabelecido pelo Ministério da Agricultura. Silva (2009) considera uma propólis com teor de umidade até 8,63% como aceitável para que o material não apresente fácil degradação. Funari e Ferro (2006) obtiveram valores de perdas por dessecação entre 10,89 a 11,05. Lima (2009), entre períodos secos e chuvosos, encontrou valores de umidade entre 4,73% a 6,18%. Melo; Matsuda e Almeida-Muradian (2012), por sua vez, relataram os valores entre 2,26% e 9,89% para as amostras analisadas.

O teor de cinzas (resíduo mineral fixo), pode-se determinar uma possível adulteração na propólis, como adição de materiais (areia, madeira, etc) para aumentar seu volume (CUNHA *et al.*, 2004). Notadamente, todas as amostras analisadas, encontraram-se dentro do limite máximo legal de 5% (BRASIL, 2001).

Quanto ao teor de ceras, somente uma amostra de propólis da localidade Timbira apresentou um teor de ceras superior ao máximo permitido de 25%. Lima (2012) afirma em sua pesquisa que a sazonalidade influencia na quantidade de cera presente nas propólis, de forma que variações de $\pm 7,61$ foram observadas entre períodos chuvosos e secos.

Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) relataram valores médios de ceras para região Nordeste de 2,09% a 12,43%, semelhantes aos encontrados nessa pesquisa. As abelhas podem incorporar mais cera à propólis durante períodos em que as resinas são escassas ou de difícil coleta, principalmente, durante o período de seca.

A massa mecânica e os sólidos solúveis em etanol, também conhecidos como “resíduos insolúveis” e “extrato seco” apresentaram, respectivamente, resultados 13% e 33% discrepantes dos parâmetros legais estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

A massa mecânica refere-se às substâncias que se incorporam as própolis durante o beneficiamento, tais como fragmentos de insetos, folhas, madeiras, os quais não são facilmente solubilizados por solventes (MELO; MATSUDA; MURADIAN-ALMEIDA, 2012). Os autores, em seus estudos de caracterização de própolis, encontraram valores entre 23,6% e 45,5%. Lima (2012) encontrou valores de massa mecânica entre 49,46% e 75,41% em diversas amostras de própolis investigadas. Esta análise, por si só não implica em desvalorização da própolis de uma região, visto que valores de massa mecânicas superiores aos limites da legislação tem sido relatados na literatura.

Park *et al.* (2000) em seus estudos de classificação das própolis brasileiras relatou um valor de extrato seco de 24,1% para própolis originárias da região Nordeste no Estado do Ceará (Grupo 10), sendo uma característica da região, apresentar própolis com sólidos solúveis abaixo do estabelecido pelo MAPA. García *et al.*, (2010), apontam alguns fatores determinantes para obtenção de bons resultados de solúveis em etanol, com destaque para o tamanho da superfície de contato, a natureza do solvente extrator e o tempo de extração.

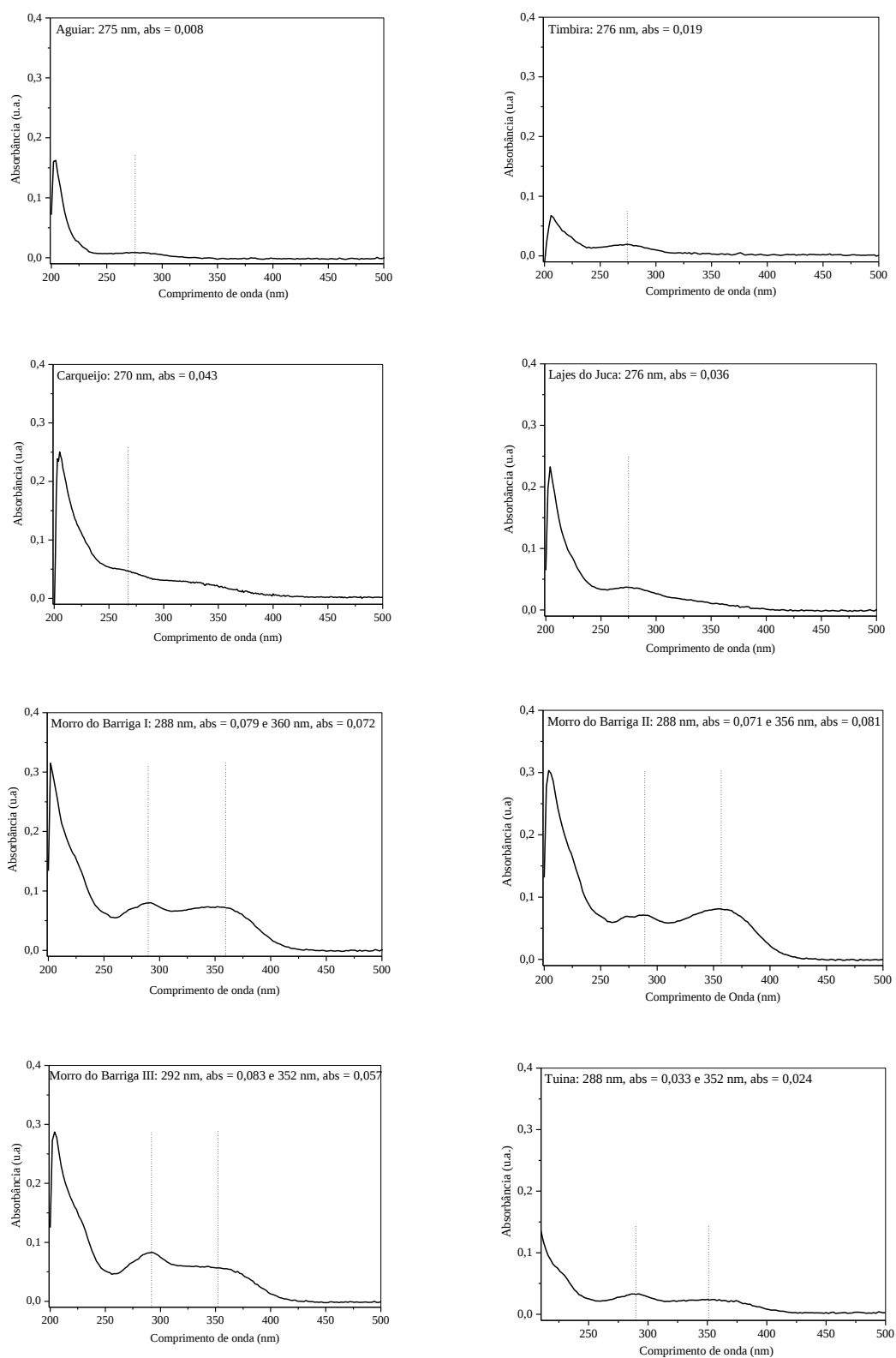
Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) reportaram a solubilidade das própolis aos compostos bioativos e ao mercado ter o interesse por própolis com elevados teores de sólidos solúveis, em razão de um maior potencial terapêutico. Os autores encontraram valores de extrato seco de própolis provenientes da região Nordeste do Brasil entre 36,82% e 62,50% e de resíduos insolúveis entre 28,35% e 56,81%. Neste estudo, foram encontrados valores abaixo do limite permitido para região Nordeste, o que pressupõe ser uma característica da mesma, apresentar própolis com extrato seco maior que a massa mecânica.

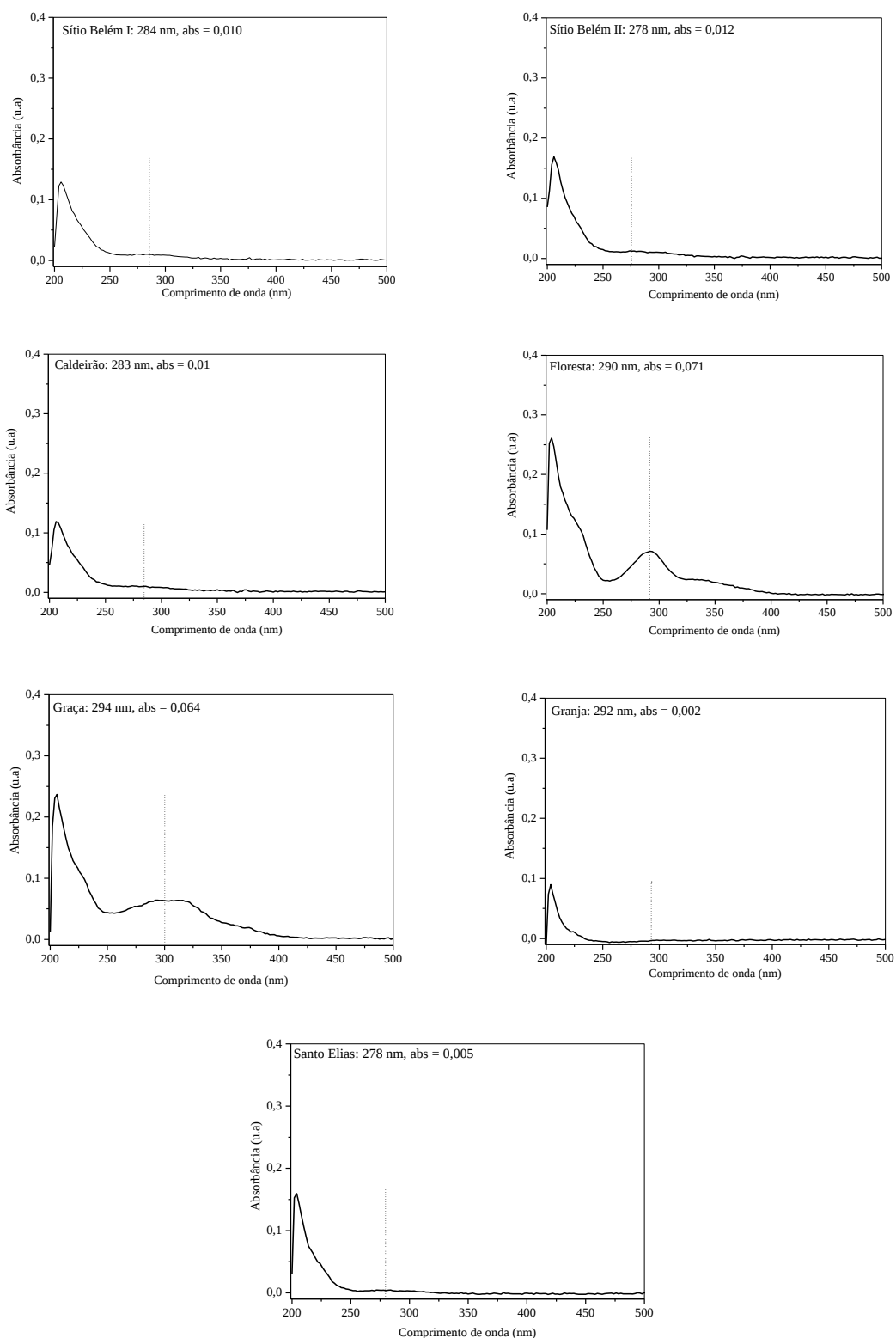
5.2. Espectroscopia na região do ultravioleta–visível (UV-Vis) dos extratos de própolis

A absorção molecular é um dos parâmetros químicos mais utilizados para classificar e avaliar as própolis, uma vez que as atividades farmacológicas têm sido atribuídas a compostos fenólicos como flavonoides, ácido caféico, ácido cinâmico e derivados, os quais absorvem entre 280 e 330nm (MOT; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011).

A Figura 16 apresenta os espectros no UV-Vis das amostras de própolis em estudo.

Figura 16 - Espectros no UV-Vis dos extratos etanólicos das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.





Fonte: Autor (2015).

Todas as amostras exibiram um perfil similar quanto aos constituintes fenólicos com absorções fracas (0,002 a 0,083) entre 270 e 300 nm, correspondente a banda II de absorção no UV-Vis, conforme Marcucci, Woisky e Salatino (1998). Somente as amostras do

Morro do Barriga (I, II e II) e Tuína, todas em Sobral, apresentaram uma outra banda fraca (0,024 a 0,081) entre 350 e 360 nm, correspondente a banda I de absorção no UV-Vis. Ainda segundo estes autores, as bandas I e II corresponderam aos grupos absorvedores das estruturas das flavonas e isoflavonas, flavanóis, flavanonas, diidroflavonóis e chalconas.

Notadamente, as amostras de própolis dos distritos de Sobral com duas bandas de absorção em seus espectros, tendem a apresentar as maiores presença de grupos fenólicos totais na composição do material estudado, o que favorece a bioatividade.

Castro *et al.*, (2007) observaram em seus estudos própolis com absorções a 279 nm e 302 nm, valores próximos encontrados neste estudo. Silva (2009) define que, mesmo dentro de uma mesma região, diferenças podem ser observadas nos espectros na região UV, principalmente, em função da variação da composição química da flora local. A região Noroeste do Estado do Ceará enquadra-se neste contexto, apresentando grande variedade de microecossistemas, o que se reflete na composição química das própolis produzidas pelas abelhas.

Toreti (2011) encontrou no apiário da cidade de Água de São Pedro, Estado de São Paulo, espectros de absorção e comprimento de onda entre 282 e 299 nm, semelhantes às amostras do Morro do Barriga I, II, II, Floresta e Graça. A autora reporta o desvio maior apresentado no espectro das amostras investigadas apresentarem perfil semelhante quanto às características sensoriais bem como à coloração e consistência semelhantes. Essa observação confirma o relato de Ikegaki (2011) de que abelhas não precisam ser do mesmo apiário para apresentarem perfil sensorial semelhante, pois abelhas procuram fontes vegetais de resinas distintas mesmo pertencentes a uma colmeia em comum.

Para Mot; Silaghi-Dumitrescu e Sârbu (2011), os espectros de UV-Vis de EEP são semelhantes aos espectros típicos de polifenóis. Os autores correlacionam a presença da absorção em torno de 290 nm à capacidade antioxidante.

De acordo com Jurd e Geissman (1956) espectros de absorção entre 270 e 330 nm sugerem a presença de flavonoides e fenóis. Os autores reportam as absorções a 276 nm como indicativo da presença dos ácidos gálicos nos EEP analisados e observaram ainda bandas de absorção na região do ultravioleta nos espectros de flavonoides com máximos entre 240-285 nm (banda I) e entre 300-350 nm (banda II). Neste trabalho, as amostras que apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ entre 270 a 330 nm possuem um perfil característico de presença de flavonoides e de fenóis, que corrobora com os resultados de Park *et al.* (1998), sendo elas as amostras do Morro do Barriga I, Morro do Barriga II e Morro do Barriga III, bem como Tuína, Floresta e Graça, sugerindo ser essas as que apresentam maior valor de bioatividade.

Por outro lado, Silva (2009) ressalta que as análises dos espectros de absorção no UV-vis para os EEP é apenas um indicativo para demonstrar a presença de todos os compostos fenólicos que podem estar presentes nas própolis, necessitando de resultados das características cromatográficas para justificar tais resultados e classificar o tipo de própolis.

5.3. Avaliações de bioatividade das própolis

5.3.1. Fenois totais e flavonoides totais

A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados nas determinações de fenois totais e flavonoides totais para as amostras de própolis em estudo.

Tabela 7 – Concentrações de flavonoides e fenois nas amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.

Amostras	Teor de flavonoides totais (mg de quercetina/g)	Teor de fenois totais (% EAG/g)
Aguiar	0,09±0,03	0,22±0,04
Caldeirão	0,13±0,01	0,71±0,01
Carqueijo	0,39±0,09	0,81±0,02
Floresta	2,34±0,01	4,42±0,23
Graça	2,72±0,01	2,92±0,02
Granja	0,89±0,00	1,13±0,01
Lajes do Juca	0,73±0,02	1,31±0,01
Morro do Barriga I	31,1±0,02	17,1±0,02
Morro do Barriga II	12,6±0,01	10,3±0,01
Morro do Barriga III	12,1±0,02	9,64±0,02
Santo Elias	0,14±0,01	0,54±0,02
Sítio Belém I	0,23±0,03	0,63±0,03
Sítio Belém II	0,34±0,00	0,62±0,02
Timbira	0,08±0,02	0,44±0,01
Tuína	4,65±0,29	4,02±0,02
Parâmetro do MAPA *	<i>Mínimo 5 mg/g</i>	<i>Mínimo 5%</i>

Os valores com letras iguais não diferem entre si a um nível de significância de 95%. EAG = Equivalentes de ácido gálico. *Requisitos propostos pelo Ministério da Agricultura segundo a IN 03/2001.

De acordo com o Anexo VI do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis (Instrução Normativa nº3 de 19 de Janeiro de 2001) quanto aos

teores de fenólicos e flavonoides totais, apenas as amostras coletadas no Morro do Barriga I, II e III apresentaram valores que atendem a esta regulamentação, enquanto os demais apresentam-se fora dos padrões recomendados.

Buriol *et al.*, (2009), em seus experimentos em EEP com álcool a 70% encontrou valor médio para flavonoides em torno de 2,74% $\pm 0,02$ e para fenois totais, 5,93% $\pm 0,01$. Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012), reportam para as própolis da região Nordeste do Brasil, valores entre 0,03% a 3,3% de flavonoides e entre 0,95% a 29, 52% para fenólicos totais. Souza *et al.*, (2010), encontraram valores médio de flavonoides de 0,4%. Lima, A., (2012) em seus experimentos com própolis da região Sudeste do Ceará relacionou valores de 5,02 % a 16,6% para o teor de fenólicos e de 1,4% a 10,1% para flavonoides, referindo-se esses valores de qualidade à época de coleta, sendo a sazonalidade um fator importante para colheita de própolis com altos compostos fenólicos, pois em épocas chuvosas o número de espécies botânicas em estado vegetativo é imensamente superior quando comparado ao período seco.

Alves e Kubota (2013) associaram os teores de fenólicos totais (5 mg/g) e flavonoides (1,1 mg/g) presentes nas amostras de própolis, à sua composição química e consecutivamente a localização geográfica, ao tipo de solvente utilizado no momento da extração.

Mello e Hubinger (2012) estudaram extratos etanólicos e aquosos de própolis verdes brasileiras produzidas por abelhas *Apis mellifera*s no Estado de São de Paulo e, observaram que, os EEP são os mais eficientes, apresentando valores entre 64,9 a 69,3 mg de quercetina por grama de amostra, considerando-as como produto funcional de elevado teor antioxidante.

Valores entre 72 e 161 mg/g de flavonoides foram encontrados em extratos etanólicos de própolis por Bonvehì e Gutiérrez (2011), em amostras do País Basco no Nordeste da Espanha, eles sugerem que esses valores de flavonoides contribuem para boa atividade antioxidante das própolis da referida localidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), em amostras de própolis de diferentes regiões geográficas, com valores de 2,5 mg/g na Tailândia; 54,9 mg/g no Brasil, 116 mg/g no Chile, 157 mg/g na Bulgária, 167mg/g no Uruguai, 147mg/g na China e 176 mg/g Hungria com, valores semelhantes aos encontrados nesse estudo.

Liberato *et al.*, (2009) estudando as própolis do Estado do Ceará, encontraram teores de flavonoides de 1,9 mg/100g a 5,9 mg/100 g e de fenois de 7,2 a 32,05 mg/100 g. Diferentemente, Marcucci (2009) relatou valores superiores de 3,71 a 9,4% para fenois totais

e 1,1 a 8,09% paraflavonoides totais, respectivamente. Ambos os autores encontraram em seus estudos com própolis do Ceará, teores de fenois e flavonoides abaixo dos padrões de qualidade estabelecidos.

Neste estudo, o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais obtidos nos EEP variou entre 0,25 a 17,1% (25 a 171 mg/g) equivalentes de ácido gálico e 0,008 a 3,11 % (0,08 a 31,1 mg/g) equivalentes de quercetina, respectivamente, os quais encontram-se em acordo com os valores previamente reportados por outros autores, apesar de alguns não estarem dentro dos padrões exigidos, mas apresentam perfil semelhantes à propolis investigadas por outros pesquisadores.

5.3.3. Capacidade antioxidante

A Tabela 8 apresenta os resultados encontrados nas determinações da atividade antioxidante para as amostras de própolis em estudo.

Tabela 8 - Capacidade antioxidante das amostras de própolis coletadas na região Noroeste do Estado do Ceará.

Localidade	Atividade de Oxidação (segundos)	Antioxidantes (mg trolox/g)
Aguiar	30±0,31	13,1±0,04
Caldeirão	26±0,33	13,5±0,04
Carqueijo	20±0,37	39,1±0,12
Floresta	4±0,29	42,5±0,33
Graça	13±0,34	25,9±0,11
Granja	48±0,32	11,2±0,02
Lajes do Juca	25±0,35	21,7±0,22
Morro do Barriga I	2±0,34	54,2±0,09
Morro do Barriga II	3±0,33	56,9±0,12
Morro do Barriga III	2±0,32	84,9±0,08
Santo Elias	28±0,32	14,3±0,07
Sítio Belém I	39±0,22	48,2±0,17
Sítio Belém II	28±0,21	8,61±0,25
Timbira	31±0,33	21,1±0,05
Tuína	2±0,31	72,2±0,07
*Parâmetro do MAPA	<i>Máximo 22 segundos</i>	<i>Não especificado</i>

*Requisitos propostos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento segundo a IN 03/2001.
Fonte: Autor (2015)

O índice de oxidação de acordo com Melo, Matsuda e Muradian-Almeida (2012) é um parâmetro que expressa a qualidade das própolis trazendo informações sobre o tempo de colheita e adequação do armazenamento praticado. Altos índices de oxidação indicam longo

período de armazenamento em temperaturas elevadas, seja no interior da colmeia ou em depósitos de armazenamento. A legislação vigente, limita esse parâmetro em 22 segundos, e comparando-o aos valores encontrados, observa-se que das amostras realizadas somente as de Carqueijo, Floresta, Graça, Morro do Barriga I, Morro do Barriga II, Morro do Barriga III e Tuína são as que estão dentro dos limites preconizados, variando de 2 a 20 segundos. Estes valores indicam que as própolis apresentam um bom poder de oxidação, principalmente.

Polese, Pastore e Garcia (2009) relatam que, para o índice de oxidação, quanto menor o tempo apresentado em segundos, melhor é o indicativo de qualidade. Lima, A., (2012) encontrou dados para o índice de oxidação entre 1,5 a 4,5 segundos para as própolis analisadas, os quais foram considerados excelentes. No presente estudo, para as amostras de Aguiar, Caldeirão, Granja, Lajes do Juca, Santo Elias, Sítio Belém I, Sítio Belém II e Timbira os índices de oxidação variaram de 25 a 48 segundos, os quais não estão dentro dos padrões preconizados, como também relatado por Lozina *et al.*, (2010) que encontraram valores entre 24 e 110 segundos para as própolis em seus estudos.

De acordo com Oldani (2007), a capacidade antioxidante difere da atividade antioxidante, visto que para saber realmente o valor da atividade antioxidante, faz-se necessário remover os compostos fenólicos ativos.

A IN 03/01 não traz em seu texto nenhum parâmetro referente às análises de atividade antioxidante quantitativa, não sendo possível fazer uma analogia aos resultados encontrados. Os valores obtidos nesta pesquisa mostram valores entre 13,1 a 84,9 mg de trolox/g (318 μ M a 1697,6 μ M de Trolox/g), os quais podem ser considerados promissores.

Lacerda (2012), apresentou resultados de atividade antioxidante para amostras de própolis entre 1 e 383 mg Trolox/g. A discrepância entre os valores foi associada à estação do ano, à sazonalidade e às variedades de vegetações ao longo das coletas. Machado de Melo *et al.*, (2014) pesquisaram a capacidade antioxidante das própolis no Brasil e encontraram β -caroteno em teores de 51,3 % no Maranhão e 92,7 % na Paraíba, os quais são indicativos da capacidade da amostra evitar a oxidação de substratos lipídicos. Na pesquisa, não foi feita nenhum alusão ao Estado do Ceará, contudo, reportam à região como uma forte área de vegetação diversificada que pode transferir propriedades fitoterápicas às propolis.

Silva *et al.*, (2011) encontraram valores de 8000 μ mol de trolox/g em amostras de própolis da região sul do Uruguai, valor bastante elevado e de excelente capacidade antioxidante para essa localidade. Seven *et al.*, (2014) também atribuíram a vegetação local em seus estudos com própolis da Turquia os valores mais elevados de TEAC ($269,5 \pm 0,4$ mg/g) e de flavonoides (397,6 mg/g). Valores de 420 a 1.430 μ mol de Trolox/g foram

considerados por Bonvehì e Gutiérrez (2011) como teores de antioxidantes favoráveis, permitindo a inibição de 22,2 a 54,7% de radicais ABTS^{•+}.

A presença de flavonoides nas própolis influencia a atividade antioxidante das mesmas por estarem relacionada à capacidade de um sistema biológico proteger contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, pelo fato de minimizarem a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI *et al.*, 1998; POLESE; PASTORE; GARCIA, 2009). Os resultados do presente estudo confirmam essa afirmação, pois as amostras com maior teor de antioxidantes também são as que possuem maior quantidade de flavonoides, e consecutivamente, as que demonstraram uma boa inibição antibacteriana.

Flavonoides são componentes importantes na dieta humana, embora eles sejam geralmente considerados como nutrientes. No entanto, o nível de ingestão de flavonoides da alimentação humana é consideravelmente alta em comparação com os de vitamina C (70 mg/dia), vitamina E (7-10 mg/dia) e carotenoides (2-3 mg/dia). Pietta (2000) propõe uma ingestão de 800mg/dia destas moléculas.

Uma das maneiras de assegurar a qualidade de um produto, garantindo que o mesmo chegue apto às mãos do consumidor é o cumprimento de normas específicas estabelecidas para esse fim. Para as própolis, a obtenção de seus derivados, os parâmetros de qualidade devem ser assegurados através da Instrução Normativa nº 03 de 19 de janeiro de 2001 que expõe o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis e extratos de própolis, respectivamente.

A Tabela 9 apresenta os padrões de qualidade das própolis em estudo conforme a legislação vigente estabelecida pelo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastacimento (MAPA) através da IN 03/01.

Uma análise da mesma mostra que, de acordo com a classificação proposta pelo MAPA, as própolis foram enquadradas em sua grande maioria como de baixo teor de flavonoides, destacando-se apenas a do Morro do Barriga I, classificação como de alto teor.

Tosi *et al.*, (2007) ressaltam a importância das própolis como uma valiosa fonte de compostos fenólicos, sugerindo ser um dos componentes a ser incluso nas composição de alimentos industrializados a fim de aumentar a qualidade, em particular, aos de interesse dietéticos, suplementos, ou mesmo produtos farmacêuticos para a prevenção ou tratamento de patologias.

O estudo mostra que, as amostras provenientes do município de Sobral (Morro do Barriga e Tuína) destacaram-se pelos teores de compostos fenólicos totais dentro dos requisitos legais, bem como todos os demais parâmetros de qualidade.

Em geral, na maioria das amostras há predominância da coloração marrom, variando para tonalidades mais escuras ou mais claras. Somente as própolis que apresentaram valores dentro dos preconizados por lei para todos os requisitos, obtiveram coloração verde ou próxima à tonalidade verde.

As concentrações de compostos fenólicos totais (expressos porcentagem de ácido gálico) presentes em todas as amostras corroboram com os resultados obtidos para solubilidade em acetato de chumbo e solubilidade em hidróxido de sódio. Tagliacollo e Orsi (2011) destacam para a presença de compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis que apresentam solubilidade na presença dessas soluções.

Particularmente, as amostras de própolis das cidades de Alcântaras (Sítio Belém I, Sítio Belém II e Caldeirão), Granja, Mucambo (Carqueijo), Meruoca (Santo Elias) e Bela Cruz (Aguiar e Timbira) apresentaram resultados muito abaixo dos padrões exigidos pelo MAPA, apresenta-se como amostras que não seriam bem aceitas comercialmente, pois seriam classificadas como própolis de pouca qualidade.

As concentrações de flavonoides das amostras do Morro do Barriga e de Tuína, atribuem à própolis uma boa qualidade antimicrobiana. Borges *et al.*, (2014) indicam que os ácidos fenólicos e flavonoides componentes da própolis, possuem o poder de romper a membrana citoplasmática das bactérias, levando à inibição microbiana.

Tabela 9 - Padrão de qualidade das própolis investigadas na região Noroeste do Estado do Ceará.

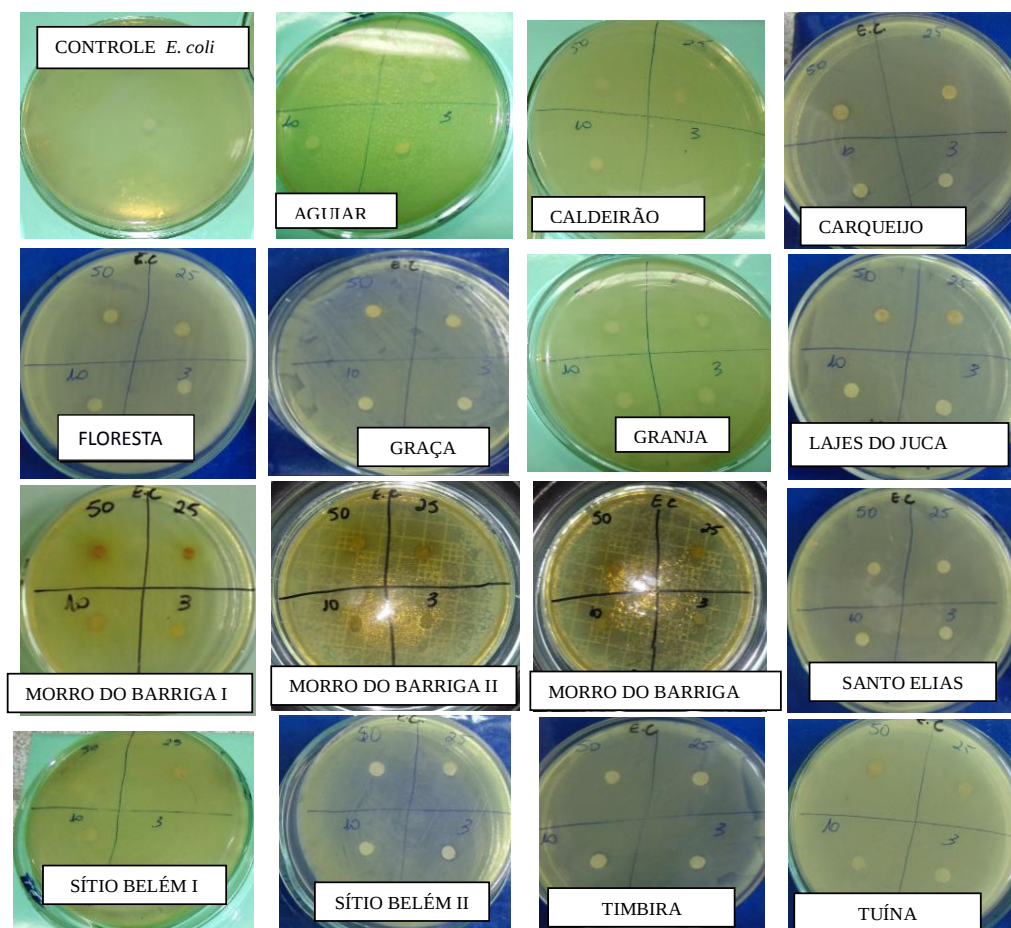
Amostra	Classificação	Características sensoriais					Requisitos físico-químicos								Provas qualitativas		
	Teor em flavonóides	Aroma	Cor	Sabor	Consistência a temperatura ambiente	Granulometria	Cinzas (%)	Perda por dessecação (%)	Ceras (%)	Massa mecânica (%)	Solúveis em etanol (%)	Compostos fenólicos (%)	Flavonóides (%)	Índice de oxidação (segundos)	Solubilidade em acetato de chumbo	Solubilidade em hidróxido de sódio	Pico(s) de Absorção no UV-Vis
Aguiar	Baixo	Balsâmico	Marrom amarelado	Suave	Maleável	Heterogênea	3,5±0,29	7,0±0,13	9,1±0,04	39,3±0,12	35,3±0,09	0,22±0,04	0,01±0,03	30±0,31	+	+	275
Caldeirão	Baixo	Balsâmico	Amarelada	Suave	Maleável	Heterogênea	2,9±0,06	4,4±0,09	14,6±0,05	33,3±0,14	37,6±0,12	0,71±0,01	0,01±0,01	26±0,33	+	+	283
Carqueijo	Baixo	Balsâmico	Avermelhada	Forte e picante	Maleável	Heterogênea	2,5±0,25	7,1±0,22	10,5±0,12	32,9±0,16	43,8±0,16	0,81±0,02	0,39±0,09	20±0,37	+	+	270
Floresta	Baixo	Resinoso forte	Esverdeada	Forte e picante	Rígida	Heterogênea	2,5±0,09	6,2±0,32	12,2±0,12	39,0±0,09	39,0±0,23	4,42±0,23	0,23±0,01	4±0,29	+	+	290
Graça	Baixo	Resinoso suave	Esverdeada	Suave	Rígida	Heterogênea	2,9±0,21	7,0±0,05	12,5±0,14	36,0±0,18	41,0±0,22	2,92±0,02	0,27±0,01	13±0,34	+	+	294
Granja	Baixo	Suave resinoso	Parda	Suave	Extremamente maleável	Heterogênea	1,9±0,02	11,4±0,11	3,9±0,21	39,6±0,12	29,4±0,09	1,13±0,01	0,09±0,00	48±0,32	+	+	292
Lajes do Juca	Baixo	Balsâmico	Marrom claro	Sauve	Maleável	Heterogênea	3,6±0,08	5,7±0,06	15,2±0,08	26,8±0,23	36,6±0,19	1,31±0,01	0,07±0,02	25±0,35	+	+	276
Morro do Barriga I	Alto	Resinoso balsâmico	Esverdeada	Suave	Rígida	Heterogênea	2,1±0,09	8,4±0,08	6,2±0,05	45,5±0,09	35,7±0,15	17,1±0,02	3,1±0,02	2±0,34	+	+	288 e 360
Morro do Barriga II	Médio	Suave resinoso	Esverdeada	Sauve	Rígida	Heterogênea	2,8±0,01	7,3±0,16	3,2±0,07	38,2±0,12	42,7±0,14	10,3±0,01	1,3±0,01	3±0,33	+	+	288 e 356
Morro do Barriga III	Médio	Resinoso balsâmico	Esverdeada	Forte	Rígida	Heterogênea	2,6±0,01	7,5±0,18	1,7±0,04	36,8±0,16	50,9±0,26	9,64±0,02	1,2±0,02	2±0,32	+	+	292 e 352
Santo Elias	Baixo	Balsâmico caracterítico	Marrom escuro	Suave balsâmico	Extremamente maleável	Heterogênea	2,9±0,15	10,6±0,33	16,6±0,16	37,5±0,21	28,9±0,22	0,54±0,02	0,01±0,01	28±0,32	+	+	278
Sítio Belém I	Baixo	Balsâmico caracterítico	Marrom	Suave balsâmico	Extremamente maleável	Heterogênea	3,0±0,05	7,6±0,24	12,2±0,16	37,9±0,11	32,4±0,21	0,63±0,03	0,02±0,03	39±0,22	+	+	284
Sítio Belém II	Baixo	Balsâmico caracterítico	Parda	Suave balsâmico	Maleável	Heterogênea	4,0±0,05	8,5±0,17	8,2±0,22	39,0±0,12	33,3±0,19	0,62±0,02	0,03±0,00	28±0,21	+	+	278
Timbira	Baixo	Balsâmico forte	Avermelhada	Forte	Maleável	Heterogênea	2,6±0,09	9,1±0,13	26,6±0,23	43,6±0,14	14,2±0,11	0,44±0,01	0,01±0,02	31±0,33	+	+	276
Tuína	Baixo	Forte resinoso	Marrom esverdeado	Forte e picante	Pouco rígida	Heterogênea	2,0±0,2	2,1±0,23	10,4±0,11	23,6±0,22	58,2±0,12	4,02±0,02	0,46±0,29	2±0,31	+	+	288 e 352
Parâmetros do MAPA*	Baixo: até 1,0 %; Médio: 1,0 % a 2,0 % Alto: >2,0 %;	Balsâmico e resinoso	Amarelada, parda, esverdeada, marrom, etc.	Suave balsâmico forte e picante	Maleável a rígida	Heterogênea	Máximo 5%	Máximo 8%	Máximo 25%	Máximo 40%	Mínimo 35%	Mínimo 5%	Mínimo 0,5% ou 5 mg/g	Máximo de 22 s	Positivo	Positivo	Picos entre 200 e 400 nm

*Requisitos propostos pelo Ministério da Agricultura segundo a IN 03/2001.
Fonte: Autor (2015).

5. 4. Avaliação da atividade antibacteriana

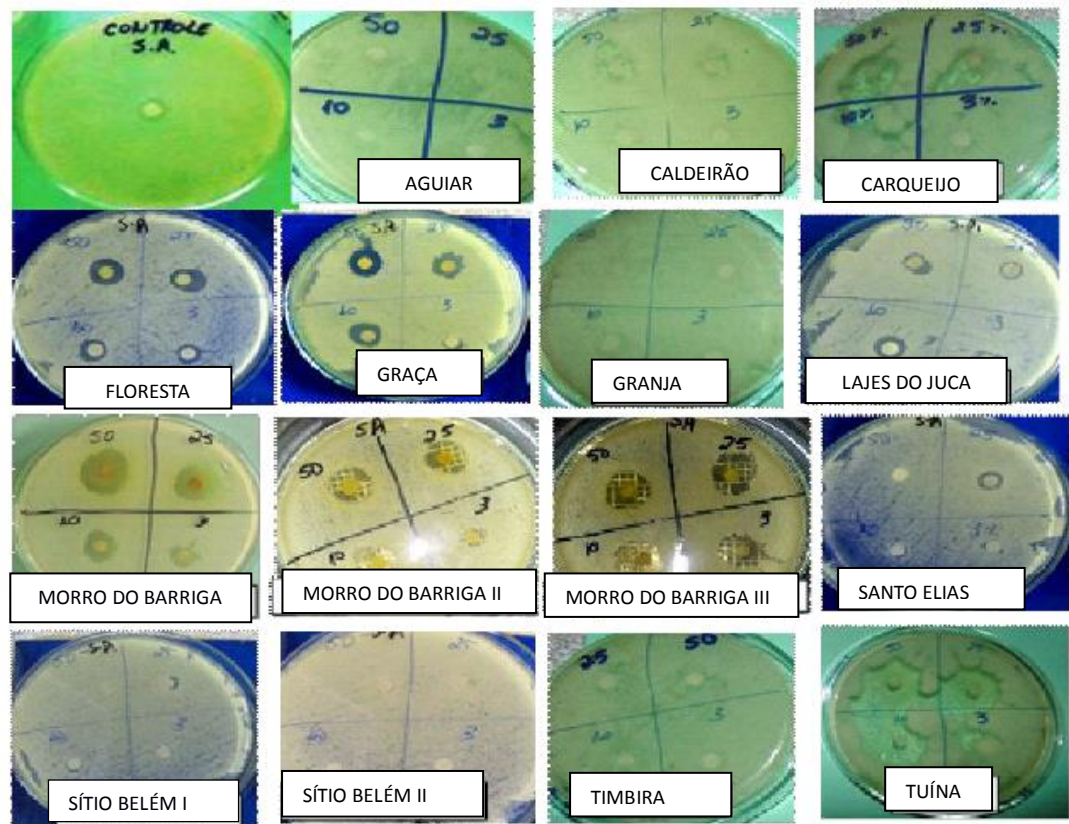
Para as diferentes concentrações das quinze amostras de própolis frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram obtidos os resultados de crescimento apresentados nas Figuras 17 e 18 e Tabela 10. Neste caso, consideraram-se concentrações dos extratos de 50% (500 mg/mL), 25%, 10% e 3% em solução alcoólica a 70%. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada levando em consideração a concentração correspondente a halos de inibição com valores maiores ou iguais a 3 mm, valor encontrado nas placas controles.

Figura 17 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das própolis frente à cepa de *Escherichia coli*.



Fonte: Autor (2015).

Figura 18 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das própolis frente à cepa de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autor (2015).

Tabela 10 - Valores do halo de inibição (mm) para as diferentes concentrações do extrato de própolis sobre o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Halo médio de inibição do crescimento bacteriano (mm)								
Amostra	<i>E. coli</i> (Gram -)				<i>S. aureus</i> (Gram +)			
	50%	25%	10%	3%	50%	25%	10%	3%
Caldeirão	0	0	0	0	5	3	0	0
Sítio Belém I	0	0	0	0	0	0	0	0
Sítio Belém II	0	0	0	0	0	0	0	0
Aguiar	0	0	0	0	0	0	0	0
Timbira	0	0	0	0	6	0	0	0
Graça	0	0	0	0	3	3	3	3
Granja	0	0	0	0	0	0	0	0
Santo Elias	0	0	0	0	2	0	0	0
Carqueijo	0	0	0	0	8	5	0	0
Lajes do Juca	0	0	0	0	2	0	0	0
Floresta	0	0	0	0	5	5	3	2
Morro do Barriga I	12	10	9	7	10	9	7	4
Morro do Barriga II	11	10	9	6	9	7	7	5
Morro do Barriga III	11	11	10	6	9	8	6	7
Tuína	0	0	0	0	10	8	5	3

Fonte: Autor (2015).

A Tabela 10 mostra que a partir dos extratos das amostras de própolis, apenas oito apresentaram potencial antimicrobiano, para Gram⁺ com halos entre 4 e 12 mm.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente a *E. coli* foram de 30 mg/mL para as amostras do Morro do Barriga I, Morro do Barriga II e Morro do Barriga III. Frente ao *S. aureus* os valores de CIM foram novamente de 30 mg/mL para as amostras do Morro do Barriga I, Morro do Barriga II e Morro do Barriga III; 100mg/ mL para a amostra de Tuína; 250 mg/mL para as amostras de Carqueijo e Floresta e 500mg/mL para as amostras de Caldeirão e Timbira.

Estes valores mostraram considerável atividade inibitória do crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus*, ao contrário do observado para a cepa de *Escherichia coli*, para qual somente os extratos provenientes das amostras do Morro do Barriga demonstraram inibição antibacteriana.

Bastos *et al.*, (2011) citam a importância do combate a *E. coli* como um dos principais agentes causadores de infecções, e para esta bactéria conseguiram inibição das mesmas com extratos etanólicos de própolis com valores de CIM entre 125 e 1000mg/mL. Park *et al.*, (2000) classificaram as própolis com halos de inibição para *S. aureus* com 6 mm de diâmetro, pertencentes ao Grupo 6 e 7, como sendo essas advindas do Nordeste brasileiro.

Borges *et al.*, (2014) encontraram inibição frente à *S. aureus* com extrato de própolis e associaram ao elevado teor de flavonoides presente em sua composição. Park *et al.* (1998) não conseguiu demonstrar inibição com soluções alcoólicas até 20 %.

Sinhorini *et al.*, (2014) encontraram inibição para *S. aureus* a partir de uma concentração de 0,25% e para *E. coli* a partir de 3% em 4 h de contato, um tempo bem inferior as 18 h deste estudo. Ainda de acordo com Sinhorini *et al.*, (2014), a ineficiência de alguns extratos de própolis frente as bactérias Gram-negativas pode ser explicado pelo o fato de que estas bactérias possuem uma camada lipídica que impedem a ação dos flavonoides.

Park *et al.*, (1998, 2000) comprovaram a eficácia na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp*, *S. mutan*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* frente a extratos de própolis a 60, 70 e 80%.

Araújo e Carvalho (2015) destacam a importância dos EEP em produtos de higienização, principalmante, no âmbito das indústrias de alimentos visto que esse é um potente agente contra bactérias Gram-positvas e Gram-negativas.

Nedji e Loucif-Ayad (2014) evidenciaram em seus bioensaios uma forte atividade antibacteriana correlacionada com a composição química das própolis da Argélia contra bactérias de importância na indústria de alimentos, sugerindo ser um potencial conservante natural contra doenças de origem alimentar. Os autores encontraram halos de inibição de 6 a 8 mm para *E. coli* e 10 a 14 mm para *S. aureus*, valores estes muito próximos aos encontrados nesse estudo para as amostras da localidade Morro do Barriga.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na análise sensorial para as própolis do Noroeste cearense mostram que a cor verde e a consistência rígida das própolis indicam maiores valores de compostos fenólicos, ações antioxidantes e antimicrobianas satisfatórias.

Do ponto de vista físico-químico para os parâmetros de perdas por dessecação, cinzas, ceras, massa mecânica e extrato solúvel em etanol somente as própolis de Graça, Morro do Barriga I, Santo Elias, Sítio Bélem (I e II) e Timbira estiveram fora dos padrões legais estabelecidos pela legislação brasileira.

Especificamente, quando se consideram junto às características físico-químicas as propriedades sensoriais e os compostos bioativos (derivados fenólicos e flavonoides) somente as amostras do Morro do Barriga (II e III) atendem a todos os padrões de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

As amostras de própolis do Morro do Barriga e Tuína sugerem um potencial de aditivo natural a ser aplicado em produtos nas indústrias de alimentos em função do maior teor de antioxidantes e ação antimicrobiana encontrados.

Quanto à bioatividade, compostos fenólicos totais foram observados em todas as amostras mesmo que em pequenas quantidades. Os valores dentro dos padrões legais permitidos foram encontrados somente nas três amostras provenientes do Morro do Barriga com valores entre 9,64 e 17,5 mg/g. Estas própolis também foram as únicas a apresentar valores de flavonoides em conformidade com a legislação vigente.

Quanto a atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* somente as amostras do Morro do Barriga apresentaram-se eficientes, com halos de inibição de 9 a 12 mm, o que corrobora com os mais elevados índice de oxidação, quantidade de flavonoides, quantidade de fenólicos totais e capacidade antioxidante observados. A ação antibacteriana frente aos *Staphylococcus aureus* só não foi considerável para as amostras de Aguiar, Granja, Santo Elias, Sítio Belém I, Sítio Belém II e Lajes do Juca.

Assim, as amostras provenientes das localidades Morro do Barriga sugerem valores que poderiam ser utilizados em adição a produtos para consumo humano, visto que na legislação vigente, as mesmas encontram-se na classificação como própolis de alto e médio teor de flavonoides, componentes estes relacionados às propriedades bioativas das própolis.

A realização deste trabalho sugere ações de capacitação para o manejo adequado das própolis, contribuindo na melhoria dos processos de produção, acondicionamento e armazenamento e assegurando a qualidade total das mesmas até seu destino final.

REFERÊNCIAS

- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ALBUQUERQUE, F.; ROMEIRO, S.; FIGUEIREDO, P. Própolis: Apenas um suplemento alimentar?. **Revista Instituto Superior Dom Afonso III – Studia**, v.16. Set. 2013. Disponível em: <<http://revista.inuaf-studia.pt/uploads/news/id129/Propolis%20apenas%20um%20suplemento%20alimentar.pdf>>. Acesso em 14 abr. 2014.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ANDRADE N.P.C.; SILVA, E.M.S; MOTA, R.A.; VESCHI J.L.A.; RIBEIRO, M.F.; REWER, C.C.; COSTA, M.M. da. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 9-15. 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- ARAUJO, J. M.; CARVALHO, M. S. Fabricação de produto a base de própolis no combate a formação de biofilme microbiológico na indústria de Alimentos. **Revista GEINTEC**, v. 5, n.1, p. 1674-1682, 2015.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L.H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Association of Official Analytical Chemist Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.
- BANKOVA, V. S. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2, p. 29-32. 2005.
- BARBOSA, W. F.; SOUSA, E. P. Nível tecnológico e seus determinantes na apicultura cearense. **Revista da Política Agrícola**, v. 22 , n. 3, p. 32-47, 2013.
- BASTOS, E. M. A. F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M.; SCOARIS, D. O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1255-1259, 2011.
- BASTOS, E. M. A. F.; SANTANA, R. A.; CALAÇA-COSTA, A. G. F.; THIAGO, P. S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 727-734, 2011.

BELMIRO, Michel Stórquio; OKI E G, Yumi; FERNANDES, Wilson. O presente das abelhas própolis. **Revista Planeta**. Belo Horizonte, 463 Ed. Abr.2011. Disponível em:<<http://revistaplaneta.terra.com.br/secao/saude/o-presente-das-abelhas-propolis>>. Acesso em 14 abr. 2013.

BENEVIDES, D. S.; F. G. CARVALHO. Levantamento da flora apícola presente em áreas de caatinga do município de Caraúbas – RN. **Sociedade e Território**, v. 21, n. 1-2, p. 44-54, 2009.

BOLETIM AGRONEGÓCIO [do] Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **O mercado da própolis**. 2013. Semanal. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/sebrae%202014/2013_09_20_bo_agosto_agronegocio_propolis2.pdf>. Acesso em 17 de janeiro de 2014.

BONVEHÌ, J. S; GUTIÉRREZ, A. L. Antioxidant Activity and total Phenolics of propolis from the Basque country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1387-1395, 2011.

BORGES, E. C.; DA SILVA, L. C.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Caracterização Química de Extratos Etanólicos de Própolis com atividade inibitória do crescimento de *Estafilococos* isolados de Mastite Bovina. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 1040-1153, 2014.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, p. 1-20, 2012.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Vol. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

BREYER, H. F. E. Técnicas de produção de própolis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11, 2000, Florianópolis. **Anais**. CBA, 2000. 1 CD ROM.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, D. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R.; SANTA, H. S. D.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, P. M. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; BERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A, BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. 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.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudio del propoleos de Santiago del Estero-Argentina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.1, p. 11-15, 2004.

COMPOSTOS fenólicos – antioxidantes e pró-oxidantes. **Ciência da Nutrição atlântica**. Março 2011. Disponível em: <<http://cinutri.wordpress.com/2011/03/23/compostos-fenolicos-%E2%80%93-antioxidantes-e-pro-oxidantes/>> Acesso em: 17 mai 2014.

COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F.; Levantamento dos estudos com a própolis produzida no Estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13. p. 1-13, 2013.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZUA, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; G. S. POVIA; CARVALHO, P. O. J. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de mel: introdução e histórico**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 22 de jun de 2015.

FEDERAÇÃO NACIONAL DOS APICULTORES DE PORTUGAL. **Manual de produção de pólen e própolis**. Disponível em: <http://www.fnap.pt/gestor/downloads/doc_12.pdf> Acesso em: 07 de fev. 2015.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A.S.; SILVA, L. M. R., Nível Tecnológico e Rentabilidade de Produção de Mel de Abelha (*Apis Mellifera*) no Ceará. **RER**, v. 42, n. 1, p. 171-188, 2004

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

GARCÍA, L. P.; GALÁN, J. P. M.; PAJÓN, C. M. G; GONZÁLEZ, J. H. G.; RESTREPO, D. L. D. Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 63, p. 5373-5383, 2010.

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

GONÇALVES, G. M. S.; SANTOS, N. P.; SREBERNICH, S.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, p. 349-356. 2011.

GUIA Geográfico. Disponível em: <<http://www.ceara-turismo.com/mapas/mapa-politico.htm>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

IBGE. Diretoria de Pesquisas Agrárias. **Produção da Pecuária Municipal 2011**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:

<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2241>>. Acesso em: 08 de abr de 2014.

IKEGAKI, M. **Determinação da qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, SP, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

JORNAL DA UNICAMP. **Yong Park extrai mais esperança da própolis.** Universidade Estadual de Campina. Ed. 236, Nov. 2003. Disponível em:<http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju236pag05.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v.21. p. 1395-1401, 1956.

KUMAZANA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

La Propolis verte BIO du Paraná (Brésil). 2009. Disponível em:<<http://www.propos-nature.com/presentation-des-produits/la-propolis/nos-produits-a-la-propolis-verte-du-bresil.html>>. Acesso em: 01 abril 2013.

LACERDA, R. C. C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2012.

LIBERATO, M. C. T. C.; MORAIS, S. M.; NOJOSA, A. K. B.; NOJOSA, A. C. B.; SALUSTIANO, G. L. Determinação de fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante de própolis coletadas no Ceará. **4º Congresso Brasileiro de Química.** Porto Alegre, 2009.

LIBERTATO, M. C. T. C. **Produtos das própolis e seus derivados.** 2013. Disponível em:<<http://www.pecnordestefaec.org.br/2013/wp-content/uploads/2013/07/Produtos-da-Propolis-e-seus-derivados-Maria-da-Concei%C3%A7%C3%A3o-Tavares-Cavalcanti-Liberato.pdf>>. Acesso em 15 de jun de 2015.

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

LIMA, A. O. N. **Produção de própolis por abelha melífera africanizada (*Apis mellifera* L.) na caatinga do baixo Jaguaribe cearense.** 2012. 92f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia, Fortaleza, 2012.

- LIMA, B.; TAPIA, A.; LUNA, L.; FABANI, M. P.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PODIO, N.; WUNDERLIN, D. A.; FERESIN, G. E. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2691-2698. 2009.
- LIMA, M. G. **A produção de própolis no Brasil**. APACAME: São João da Boa Vista, SP, 2006.
- LOZINA, L. A.; PEICHOTO, M. E.; ACOSTA, O. C.; GRANERO, G. E. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 29, n. 1, p. 102-110, 2010.
- LUO, C.; ZOU, X.; LI, Y.; SUN, C.; JIANG, Y.; WU, Z. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 314-320, 2011.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18. p. 447-454, 2008.
- MACHADO DE-MELO, A. A.; MATSUDA, A. H.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical de Goiânia**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**. Artigo 46, 1998. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>>. Acesso em 07 de jan de 2015.
- MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R. Própolis: Correlação Química e Biológica. **Chemkeys – Liberdade para aprender**. 2002. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articleI.php?u=cHJvcG9saXMtY29ycmVsYWVhby1xdWltaWNhLWUtYmlvbG9naWNh>>. Acesso em: 20 de jun de 2015.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 105-112, 2001.
- MARCUCCI, M. C. Controle de qualidade da própolis. **Portal educação**. Campo Grande, 2008. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/veterinaria/artigos/6570/controle-de-qualidade-de-propolis>>. Acesso em: janeiro de 2015.
- MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2510–2518, 2012.

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

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MIGUEL, M. G., ANTUNES, M. D. "Is propolis safe as an alternative medicine?". **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, p. 479-495, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249695/>>. Acesso em 13 de fev de 2015.

MN própolis. Disponível em: <http://www.mnpropolis.com.br/produtos_propolis.asp>. Acesso em 15 de fev de 2015.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOREIRA, A. S. Apicultura. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Documento Técnico**, 202. 1996.

MOREIRA, L. L.; ROGÃ, M.; ESREVINHO, L. Efeitos Terapêuticos do Própolis na Saúde Humana. **O Apicultor**, v. 71, p. 25-32. 2011.

MOT, A. C. , SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-Vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 516-522, 2011.

NAIK, D. G.; VAIDYA, H. S.; BEHER, B. C. Antioxidant properties of Indian própolis. **Journal of Api Product and Api Medical Science**, v. 1, p. 110-120, 2009.

NASCIMENTO, A. S. **Caracterização botânica e geográfica do mel de *Apis mellifera* L. produzido no território do recôncavo da Bahia**. 2011. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, BA, 2011. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/595/1/ANDREIA%20SANTOS%20ODO%20NASCIMENTO.pdf>>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

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

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 2011.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade de São Paulo – USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

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

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

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

PARK, Y.K, IKEGAKI M, ABREU JAS, ALCICI NMF. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físicoquímicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**58. 2000. Disponível em: < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>. Acesso em 13 de fev 2015.

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POLESE, C.; PASTORE, I.; GARCIA, R. C. Avaliação quantitativa e qualitativa da própolis de *Apis mellifera* obtida por diferentes técnicas de coleta em Marechal Cândido Rondon- PR. **Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente**. Cascavel, PR, 2009.

RE, Roberta; PELEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RUFINO, MARIA DO S. M.; ALVES, RICARDO E.; BRITO, E. S.; MORAIS, SELENE M. DE.; SAMPAIO, CAROLINE DE G.; JIMÉNEZ, JARA P.; CALIXTO, FULGENCIO D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico 128**, Embrapa, 2007.

SALATINO, ANTONIO; TEIXEIRA, WEINSTEIN, ÉRICA; NEGRI, GIUSEPPINA; MESSAGE, DEJAIR. Origin and chemical variation of brazilian própolis. **Evid Based Complement Alternat Medicine**, v. 2, p 33–38, 2005.

SEVEN, I.; GÜL BAYKALIR, B.; TATLI SEVEN, P.; DAĞOĞLU, G. The ameliorative effects of propolis against cyclosporine a induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v 20, n. 5, p. 641-648, 2014.

SFORCIN, J. M. ORSI, R. O. BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SFORCIN, J. M.; DE SOUSA, J. P. B.; SILVA FILHO, A. A. da; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Unespe, 2012.

SILVA FILHO, J. P.; SILVA, R. A.; SILVA, M. J. S. Potencial apícola para *Apis mellifera* L. em área de caatinga no período da floração da oiticica (*Licania rigida Benth*). **Revista Verde**, v.5, n.1. p. 120 – 128, 2010.

SILVA, A. F. **Própolis: Caracterização Físico-Química, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante**. 2009. 126f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. VIÇOSA, 2009.

SILVA, V.; GENTA, G.; MOLLER, M. N.; MASNER, M., THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D. C.; LAURINDO, F. R. M.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6430–6437, 2011.

SINHORINI, W.A.; BORDIN, J.T.; VIGNOTO, V.K.C.; CARDOZO, R.M.; MARTINS, R.R.; WOSIACKI, S.R. Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p.107-111, 2014.

SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; GOMES, M. Z.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43. p. 359-366, 2014.

SOARES, L. P.; SÃO JOSÉ, A. R. Compostos bioativos em polpas de mangas ‘rosa’ e ‘espada’ submetidas ao branqueamento e congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p.579 -586, 2013.

SOUSA, L. C. F. S.; ANAUD, E. R.; BORGES, M. G. B.; FERNANDES, A. A.; OLIVEIRA, A. V. B.; LIMA, C. J.; SILVEIRA, D. C.; ALBUQUERQUE NETO, F. A.; AQUINO, J. T.; SOUSA, J. S.; SCHMIDT FILHO, R.; SILVA, R. A.; MARACAJA, P. B. Cadeia Produtiva da Apicultura: COOAPIL – Cooperativa da Micro-Região de Catolé do Rocha – PB. **Informativo Técnico do semi-árido**, v. 5, n. 1, p. 16 – 24, 2012.

SOUSA, J. E. L.; DAMASCENO, M. I. F.; SANTOS, M. N. F.; NASCIMENTO, F. C.; FERNANDES, L. E.S.; GONÇALVES, F. M. Importância da flora apícola para o desenvolvimento da apicultura no sertão central cearense. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p.1-5, 2011.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Revista Archivos de zootecnia**, v. 59, n. 228, p. 571-576, 2010.

TAGLIACOLLO, V. A.; ORSI R. O. Quality of propolis commercialized in the informal market. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 752-757, 2011.

TEIXEIRA, L. V. Análise Sensorial na Indústria de Alimentos. **Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 12-21, 2009.

TORETI, V. C. **Estudo da influência da sazonalidade sobre algumas propriedades físico - químicas e biológicas da própolis de dois apiários do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado), 2011.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2011.

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

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1025–1029, 2007.

VARGAS, A.C., LOGUERCIO, A.P., WITT, N.M., COSTA, M.M., SILVA, M.S., VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D.; TORRESCANO-URRUTIA, G. R.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. **Interciencia**, v. 38, p. 705–711, 2013.

VIUDA-MARTOS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, PÉREZ-ÁLVAREZ JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal Food Science Reviews: Concise/Hypotheses In Food Science**, v. 73, p. 117-124, 2008.

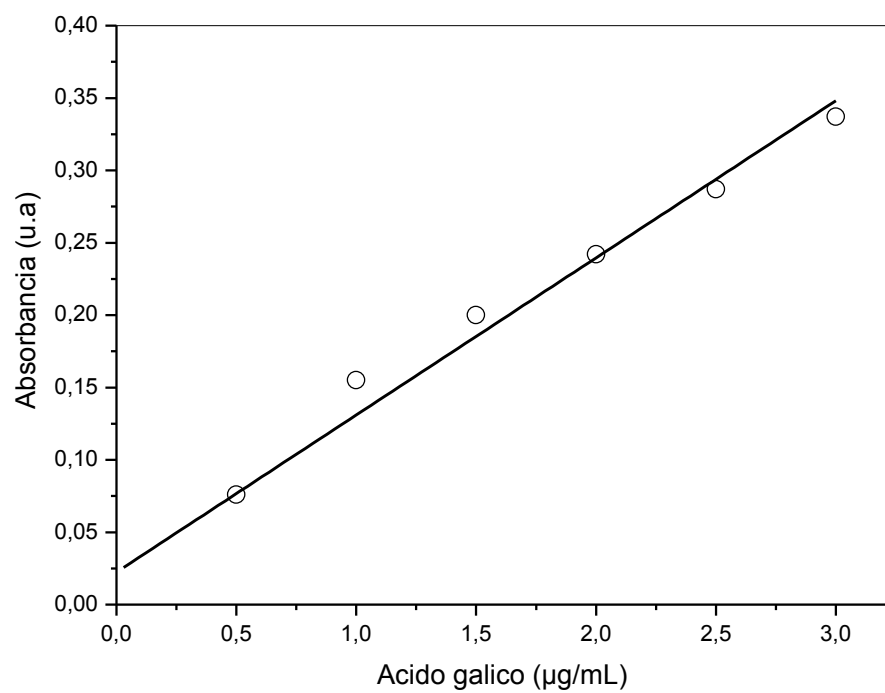
WAGH, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1996.

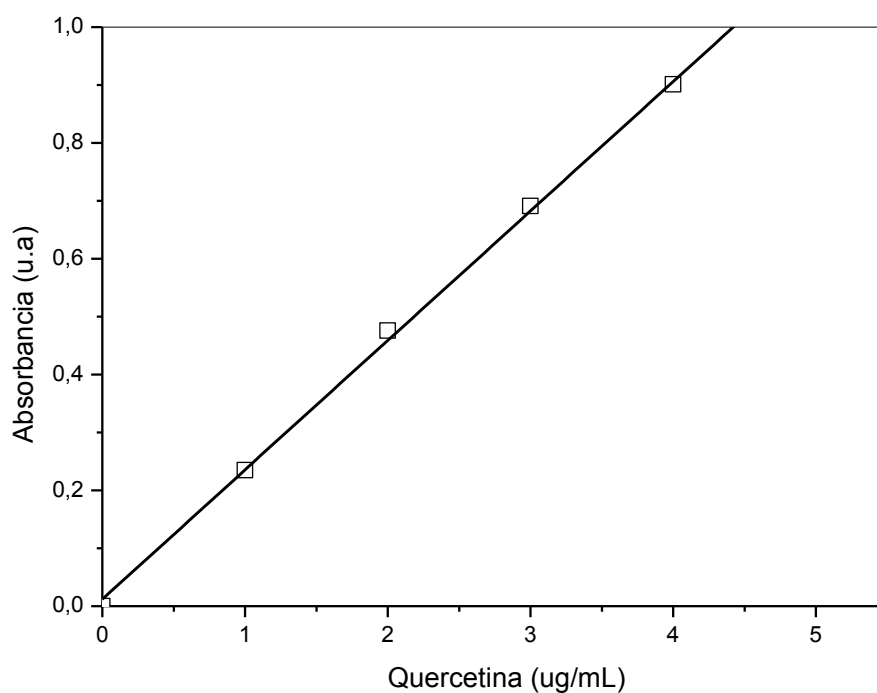
YANG H, DONG Y, DU H, SHI H, PENG Y, LI X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. **Molecules**, v.16, p. 3444-3455, 2011.

ANEXO I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENOIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

- Padrão de ácido gálico para a quantificação de fenois totais.



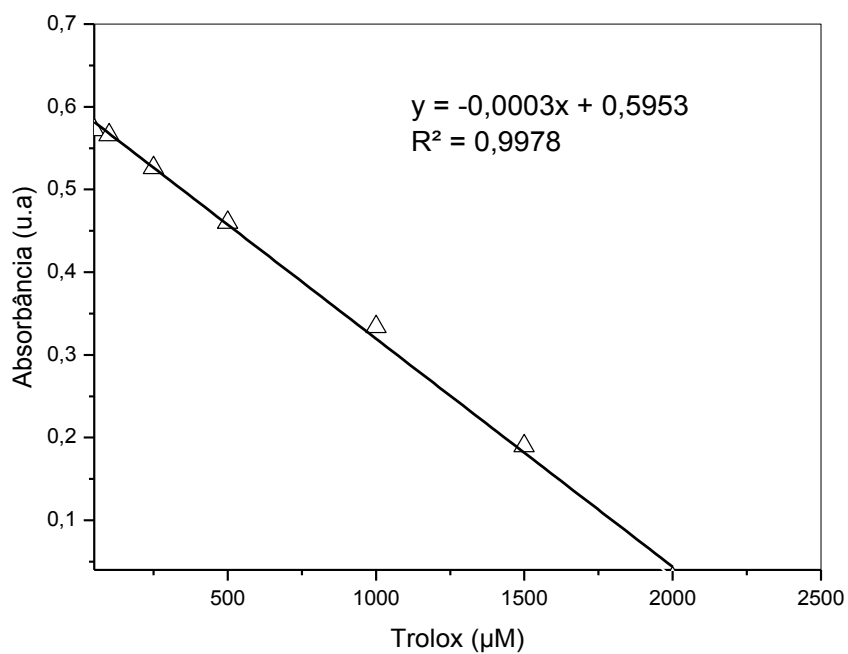
- Padrão de quercetina para a quantificação de flavonoides totais.



Fonte: Autor (2015).

ANEXO II – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO RADICAL ABTS^{•+}

- Padrão de trolox para a quantificação do radical ABTS^{•+}.



Fonte: Autor (2015).

