

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VÂNIA MARIA BARBOSA



**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ENSAIO FITOQUÍMICO DE PROPOLIS
DE *Scaptotrigona bipunctata*, (LEPELETIER, 1836)**

CURITIBA

2017

VÂNIA MARIA BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ENSAIO FITOQUÍMICO DE PROPOLIS DE
Scaptotrigona bipunctata, (LEPELETIER, 1836)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentação e Nutrição.
Orientador: Prof^o. Dr^o. Obdulio Gomes Miguel
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sila Mary Rodrigues Ferreira

CURITIBA

2017

Barbosa, Vânia Maria

Caracterização nutricional e ensaio fitoquímico de própolis de *Scaptotrigona bipunctat*, (Lepeletier, 1836) / Vânia Maria Barbosa – Curitiba, 2017.

78 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

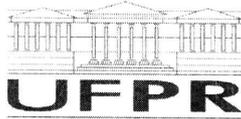
Coorientadora: Professora Dra. Sila Mary Rodrigues Ferreira

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Própolis. 2. Ação antimicrobiana. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. *Klebsiella pneumoniae*. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Ferreira, Sila Mary Rodrigues. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 612.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VÂNIA MARIA BARBOSA** intitulada: **Caracterização Nutricional e Ensaio Fitoquímico de Próplis de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier, 1836)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Julho de 2017.

OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Externo (UFPR)

MARLENE BAMPI
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por se mostrar presente em todos os momentos de dificuldade.

Aos meus pais Wilson e Vânia, incentivadores incondicionais dos meus estudos, que com muito amor e dedicação me moldaram para correr atrás dos meus sonhos.

À minha irmã, Mayara que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me fazendo ver o lado bom de cada dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e coorientadora Prof^a Dr^a Sila Mary Rodrigues Ferreira, pelos ensinamentos, confiança, amizade e paciência durante a minha jornada.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição pela oportunidade.

Ao doutorando Francis, por todo auxílio durante os dois anos de trabalho, pelos conselhos e pela amizade. A mestra Bruna, amiga que o mestrado me proporcionou, por todo tempo nos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza pela oportunidade de aprender sobre microbiologia de alimentos. A Raquel e Isabella, por terem me acolhido em João Pessoa com grande amizade e pela paciência durante a minha passagem pelo laboratório.

A pós-doutoranda, Marlene, por todo ensinamento e por sempre mostrar que podemos ir mais além.

Aos técnicos, Jair, Adriana, Lindamir, Jacqueline e Gracinha, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas de mestrado, em especial, Andrea, Luciana, Patrícia e Soraia, por estarem compartilhando cada momento e sentimento dentro e fora da universidade.

Aos meus amigos brazenses, por sempre torcerem por mim.

Ao secretário, Mauro, por sanar todas as dúvidas com a maior paciência o mundo.

Ao meliponicultor, Benedito, por ceder as amostras e dedicar sua vida às abelhas sem ferrão. À doutoranda, Isabel, pela realização da CG/EM e ao LACAUT/UFPR pelas análises de minerais.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA PRÓPOLIS.....	15
FIGURA 2 - ABELHA <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	20
FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENILPROPANÓIDES.....	22
FIGURA 4 - EXEMPLOS DE MONOTERPENOS DE OCORRENCIA EM ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
FIGURA 5 - EXEMPLOS DE SESQUITERPENOS DE OCORRENCIA EM ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
FIGURA 6 - LOCAL DA COLETA DA PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	27
FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE PRÓPOLIS BRUTA DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> ...	27
FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DA PRÓPOLIS TRITURADA E PENEIRADA.....	28
FIGURA 9 - ETAPAS DE SEPARAÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA BRUTA DE PRÓPOLIS.....	28
FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	50
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PROPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRAFICO 1 - COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO CETÔNICO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PROPÓLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i> E O BRANCO	59
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS PROPOLIS BRASILEIRAS*	16
TABELA 2 - ENQUADRAMENTO DA ESPÉCIE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	19
TABELA 3 - PUBLICAÇÕES SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS	24
TABELA 4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS	36
TABELA 5 - VALORES MÉDIOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	44
TABELA 6 - TEORES DE ELEMENTOS MINERAIS ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	47
TABELA 7 - RENDIMENTO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PROPOLIS.....	50
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS.....	51
TABELA 9 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	54
TABELA 10 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG/EM EM PRÓPOLIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ABELHA.....	55
TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	57
TABELA 12 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E DL ₅₀ UTILIZANDO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	61

RESUMO

A própolis vem sendo objeto de pesquisa devido aos seus efeitos benéficos, uma vez que possui atividade antioxidante, antimicrobiana e anticariogênica comprovadas. No entanto, as abelhas sem ferrão produzem um tipo de própolis diferencial e sua constituição química ainda não está bem elucidada. Assim, o presente trabalho tem como objetivo determinar a composição centesimal e química, bem como as atividades biológicas da própolis de *Scaptotrigona bipunctata*. Foi realizada a coleta da amostra no município de Mandirituba - PR e posteriormente, processada de acordo com as análises a serem realizadas. Para as análises de composição centesimal, determinação de carotenoides, açúcares e ácidos orgânicos, minerais e vitamina C, foi utilizada a amostra bruta de própolis; para a determinação da composição química, ácidos fenólicos, atividade antioxidante, antimicrobiana, hemolítica e toxicidade, foram utilizados o extrato cetônico, suas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, e óleo essencial. Observou-se que a própolis apresentou um teor elevado de lipídeos (64,14%), e possui os padrões de identidade e qualidade exigidos para própolis de *Apis mellifera*; em sua composição mineral destacam-se o ferro e o manganês. A análise da composição química demonstrou a ausência de ácidos fenólicos no extrato e frações e a identificação de dezessete compostos no óleo essencial, entre eles o alfa-pineno, para-cimeno e beta-pineno e. Em relação às atividades biológicas, as amostras não apresentaram atividade antioxidante, mas atividade antimicrobiana suficiente para o bloqueio de *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, quando na concentração de 1,25 µL/mL de óleo essencial. A fração hexano na concentração de 1000 µg/mL e o óleo essencial apresentaram atividade hemolítica e nenhuma amostra apresentou indicativo de toxicidade *in vitro*, sugerindo que a própolis de *Scaptotrigona bipunctata* pode ser um potencial insumo para o desenvolvimento de novos suplementos, alimentos, medicamentos e embalagens.

Palavras-chave: própolis; atividade antimicrobiana; *Listeria monocytogenes*; *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Propolis has been the object of research due to its beneficial effects, once it has proven antioxidant, antimicrobial and anticariogenic activity. However, stingless bees produce a type of differential propolis and its chemical constitution is still not well understood. Thus, the present work aims to determine the centesimal and chemical composition, as well as the biological activities of the propolis of *Scaptotrigona bipunctata*. The sample was collected in the municipality of Mandirituba - PR and later, processed according to the analyzes to be performed. For the analyzes of centesimal composition, determination of carotenoids, sugars and organic acids, minerals and vitamin C, the crude propolis sample was used; For the determination of chemical composition, phenolic acids, antioxidant activity, antimicrobial, hemolytic and toxicity, the ketone extract, its hexane, chloroform and ethyl acetate fractions, and essential oil were used. It was observed that propolis had a high content of lipids (64.14%), and is in agreement with the identity and quality standards and in its mineral composition iron and manganese stand out. The analysis of the chemical composition showed the absence of phenolic acids in the extract and fractions and the identification of seventeen compounds in the essential oil, among them alpha-pinene, para-cymene and beta-pinene. In relation to the biological activities, the samples did not present antioxidant activity, but a high antimicrobial activity, requiring a concentration of 1.25 $\mu\text{L/mL}$ of the essential oil for the blockade of *Listeria monocytogenes* and *Klebsiella pneumoniae*. The concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ of hexane and the essential oil showed a hemolytic activity and no sample showed in vitro toxicity, suggesting that the propolis of *Scaptotrigona bipunctata* can be a potential input for the development of new supplements, foods, medicines and Packaging.

Key-words: própolis; antimicrobial activity; *Listeria monocytogenes*; *Klebsiella pneumoniae*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	OBJETIVOS.....	15
1.1.1.	OBJETIVO GERAL.....	15
1.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1.	PRÓPOLIS.....	16
2.2.	ABELHAS SEM FERRÃO.....	20
2.3.	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1.	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA.....	27
3.2.	AMOSTRA.....	27
3.3.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	29
3.3.1.	TEOR DE CERA.....	29
3.3.2.	UMIDADE.....	30
3.3.3.	CINZAS.....	30
3.3.4.	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	31
3.3.5.	ACIDEZ TITULÁVEL.....	31
3.3.6.	LIPÍDIOS TOTAIS.....	31
3.3.7.	PROTEÍNA BRUTA.....	32
3.3.8.	FIBRA ALIMENTAR TOTAL.....	33
3.3.9.	CARBOIDRATOS.....	34
3.3.10.	VALOR ENERGÉTICO TOTAL.....	34
3.3.11.	IDENTIFICAÇÃO DE AÇUCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	35
3.4.	QUANTIFICAÇÃO DE BETACAROTENO.....	35
3.5.	DETERMINAÇÃO DE MINERAIS.....	36
3.6.	DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C.....	36
3.7.	OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES.....	37
3.8.	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	37
3.9.	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	37

3.10.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	38
3.11.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.11.1.	MÉTODO DO RADICAL ABTS.....	38
3.11.2.	MÉTODO DA CAPTURA DO RADICAL DPPH.....	39
3.11.3.	FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	40
3.11.4.	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITURICO (TBARS)..	40
3.12.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	41
3.13.	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	42
3.14.	ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	44
4.2.	ANÁLISE QUANTITATIVA DE BETACAROTENO.....	46
4.3.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE MINERAIS.....	47
4.4.	DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C.....	49
4.5.	OBTENÇÃO DE EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL.....	50
4.6.	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	50
4.7.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	52
4.8.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
4.9.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	56
4.10.	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	58
4.11.	ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE.....	60
5.	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para fins terapêuticos tem sido observada há muito tempo, devido ao conhecimento popular acerca de seus benefícios para o organismo. O uso de plantas, derivados minerais e animais tem contribuído para o desenvolvimento de estudos na prevenção e tratamento de doenças (COSTA et al., 2017; MESSINA et al., 2017).

O Brasil possui políticas nacionais visando as Práticas Integrativas e Complementares, que compõem a medicina complementar e alternativa e a medicina tradicional, com foco na Atenção Primária à Saúde (BRASIL, 2012).

Desde 2006 as Práticas Integrativas e Complementares estão inseridas no Sistema Único de Saúde (SUS), buscando ampliar a oferta de serviços e produtos relacionados com a fitoterapia de uso racional e seguro, por profissionais de saúde habilitados. A fitoterapia possui interface com a nutrição, pois as plantas e derivados vegetais possuem substâncias biotivas e em alguns casos apresentam funções nutricionais evidenciadas. A prática da prescrição das mesmas constitui uma estratégia complementar à prescrição dietética (CFN, 2007; BRASIL, 2012).

O uso tradicional de produtos naturais provenientes da biodiversidade constitui um importante instrumento na descoberta de novos medicamentos para o combate de doenças que estão presentes na população de países em desenvolvimento (BRASIL, 2012). A ampliação de estudos de bioprospecção da biodiversidade brasileira, investigando os benefícios dos recursos naturais, pode trazer um retorno imediato à sociedade, agregando valor aos produtos e incentivando o cultivo de maneira familiar e agroecológica, gerando empregos e renda e desenvolvimento tecnológico (CAO et al., 2017).

Entre esses produtos está a própolis que é um dos recursos da natureza utilizada como medicamento. Devido aos seus efeitos antimicrobiano (PATEL et al., 2015), antioxidante (MARUCCI et al., 2017), antiinflamatório, cicatrizante (METO, 2016) e anti-cariogenico (WASSEL; KHATTAB, 2017) comprovados, pode ser uma alternativa nas práticas integrativas e complementares em saúde. O incentivo da sua utilização aumentou o interesse na sua origem e composição química, pois apesar de diversos efeitos já elucidados, nem sempre são citados os principais compostos

responsáveis pelos seus benefícios (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2015; SOLORZANO et al., 2017).

A variação de sua composição química, tanto qualitativa quanto quantitativa é complexa, pois recebe a influência direta da ecoflora da região geográfica, da genética das abelhas responsáveis pela coleta do material e da estação do ano (SALAS et al., 2016).

A espécie de abelha *Scaptotrigona bipunctata* produz uma própolis com características que a diferem das demais. Por ser uma abelha nativa de regiões tropicais, é comum o seu uso em diferentes regiões brasileiras e do mundo (DUTRA et al., 2008; VIT et al., 2017).

Considerando esses fatores é de fundamental importância identificar os componentes desta própolis e suas características nutricionais, químicas e biológicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição centesimal, o perfil fitoquímico e as atividades biológicas da própolis brasileira proveniente de abelha sem ferrão.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a própolis do ponto de vista físico-químico;
- Quantificar o teor de betacaroteno da própolis;
- Determinar a composição mineral da própolis;
- Quantificar a vitamina C da própolis;
- Determinar a composição química dos extratos e óleo essencial da própolis;
- Determinar a atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, formação do complexo fosfomolibdênio e TBARS;
- Determinar a atividade antimicrobiana;
- Determinar a atividade hemolítica;
- Determinar a toxicidade preliminar frente à *Artemia salina*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRÓPOLIS

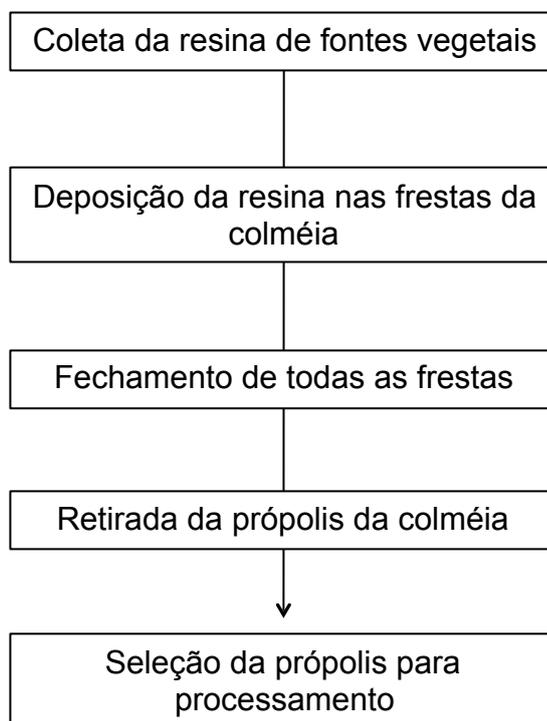
A própolis consiste de um material resinoso elaborado a partir de diversas partes de plantas como brotos, exsudatos de árvores e cascas coletados pelas abelhas e que dentro da colmeia se transformam pela adição de secreções salivares, como a enzima beta-glucosidase (LUSTOSA et al., 2008; RIGHI, 2008). Os metabólitos formados a partir dessa mistura são adicionados de cera e pólen, formando um substrato rico e heterogêneo (PATEL et al., 2015).

A própolis é um componente utilizado pelas abelhas para a proteção e defesa da colmeia, reparo de frestas, isolamento térmico e mumificação de insetos invasores, além da soldagem de favos e envernização do interior dos alvéolos para o preparo de um local asséptico para a postura da abelha rainha (SALAS et al., 2016). A Figura 1 demonstra o fluxograma da produção de própolis até a coleta.

A produção da própolis é maior na época do término das colheitas de néctar, onde há menor produção da resina. As abelhas coletoras da própolis realizam suas atividades nas horas mais quentes do dia, devido ao manuseio mais fácil do mesmo (PATEL et al., 2015). Os materiais formadores da própolis são coletados de plantas que se encontram nos arredores das colmeias. Não se sabe ao certo o porquê da escolha das abelhas coletoras por determinada vegetação, uma hipótese é a relação da espécie vegetal e sua capacidade de proteção (OGILVIE; FORREST, 2017). Uma vez que, a composição da própolis pode ser influenciada pela diversidade florística, sua localização influenciará as características químicas e atividades biológicas do material (PINO et al., 2016).

A produção da própolis é maior na época do término das colheitas de néctar, onde há menor produção da resina. As abelhas coletoras da própolis realizam suas atividades nas horas mais quentes do dia, devido ao manuseio mais fácil do mesmo (RIGHI, 2008).

Figura 1 - Fluxograma da produção da própolis



Fonte: A autora (2017)

Os materiais formadores da própolis são coletados de plantas que se encontram nos arredores das colméias. Não se sabe ao certo o porquê da escolha das abelhas coletoras por determinada vegetação, uma hipótese é a relação da espécie vegetal e sua capacidade de proteção (OGILVIE; FORREST, 2017). Uma vez que, a composição da própolis pode ser influenciada pela diversidade florística, sua localização influenciará as características químicas e atividades biológicas do material (PINO et al., 2016).

Em regiões tropicais, como o Brasil, o clima e a diversidade da flora contribuem para diferentes componentes químicos das suas própolis. Estudos desenvolvidos nos últimos anos demonstraram que a própolis brasileira apresenta uma variedade de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico (FERNANDES et al., 2015; RUFATTO et al., 2017).

Park (2000) classificou as própolis brasileiras em treze diferentes tipos de acordo com suas atividades biológicas, composição química e coloração (Tabela 1).

Sete tipos são provenientes da região nordeste, um do sudeste e centro-oeste e cinco tipos são provenientes da região sul.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS PROPOLIS BRASILEIRAS*

Grupo	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem da própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Nota: * Extrato etanólico de própolis

FONTE: PARK (2000).

Em relação as características físicas, é uma substância rígida e quebradiça com uma coloração que pode variar do marrom escuro até o marrom avermelhado, passando a uma tonalidade esverdeada, dependendo da sua procedência e idade. Seu ponto de fusão oscila entre 60-70°C e possui odor característico (BUSCH et al., 2017).

A composição química da própolis consiste de 50 a 60% de resinas, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de óleos essenciais, e o restante de grãos de pólen e elementos minerais (MENEZES, 2005; FRANCHIN, et al., 2017).

A produção de própolis no Brasil vem ganhando espaço, devido à procura do consumidor por produtos naturais e também devido a tipos de própolis diferenciais, como a própolis verde e a própolis vermelha, do estado de Alagoas, que foi autorizada pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial a obter sua Identificação Geográfica (BRASIL, 2011).

A própolis verde brasileira apresenta teores de fenólicos inferiores aos encontrados na europeia, predominando na sua composição derivados do ácido *p*-cumarico (CAPUCHO et al., 2012). A própolis vermelha do nordeste brasileiro é constituída de na sua maioria de triterpenoides, fenois e naftoquinonas (RUFATTO et al., 2017). Estudos associam as propriedades funcionais e atividades biológicas da própolis com seus níveis de metabolitos secundários e o sinergismo que ocorre entre eles (REIS et al. 2016).

A própolis vem sendo utilizada desde a Roma Antiga para o tratamento de feridas, reduzir inchaços e para o alívio dos sintomas da tensão pré-menstrual (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Os chineses a utilizavam para o tratamento de hipertensão e doenças coronarianas; os russos como antiacneico e problemas pulmonares. Vem sendo reportada há séculos como útil para o tratamento de candidíase bucal e gengivites (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2015; WASSEL; KHATTAB, 2017).

Atualmente, a própolis brasileira se destaca no mercado internacional devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais e às características sensoriais (PEREIRA; SEIXAS; NETO et al., 2002). O maior importador de própolis é o Japão demonstrando preferência para a própolis verde, que já é utilizada na fabricação de shampoos, sabonetes, cosméticos, pomadas, pastas de dentes (SILVA et al., 2012).

Devido a sua capacidade antioxidante e antimicrobiana, a adição de própolis é capaz de prolongar o tempo de prateleira de alimentos. Assim, novas alternativas surgem utilizando esse recurso da natureza, como o microencapsulamento e desenvolvimento de embalagens contendo seus subprodutos (BODINI et al., 2013; REIS et al., 2016).

2.2 ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas sem ferrão assumem um papel fundamental na manutenção da diversidade e produtividade vegetal, preservando a fauna e a flora juntamente com outros seres vivos para garantir o equilíbrio do planeta. As abelhas nativas são responsáveis pela polinização de 90% das árvores nativas brasileiras, garantem a perpetuação das espécies vegetais, aumentam sensivelmente a produção de frutos e sementes (PALAZUELOS BALLIVIÁN, 2008; SILVA et al., 2012). Estima-se que um terço da alimentação humana dependa direta ou indiretamente da polinização por elas realizada (VILLAS BOAS, 2012).

Embora a meliponicultura tenha um destaque inferior à apicultura, o Brasil possui clima, território e espécies de abelhas sem ferrão suficientes para a criação dessas abelhas e seus subprodutos (YAMAMOTO; AKATSU; SOARES, 2007).

As abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, representam um grupo mais isolado e também mais especializado que os outros indivíduos do grupo Apidae. Os meliponíneos são da subfamília Meliponinae, chamadas "abelhas indígenas sem ferrão", por possuírem o ferrão atrofiado (VILLAS BOAS, 2012).

A subfamília Meliponinae está subdividida taxonomicamente em duas tribos: Meliponini formada apenas pelo gênero *Melipona*, e *Trigonini* que agrupa um grande número de gêneros e espécies conhecidas que apresentam tamanhos menores, são pouco produtivas e muito defensivas. Poucas espécies foram estudadas dentre as *Trigonini* e há pouco conhecimento de sua ecologia e biologia (NOGUEIRA-NETO et al., 1997; SILVA; SERRÃO, 2000).

Essas abelhas ocupam parte das regiões tropicais, como o sudeste asiático, o norte da Austrália, toda a América Latina e África. Os povos indígenas tradicionais nas Américas se relacionam com esses meliponíneos de diversas formas, praticando seu cultivo, estudando e explorando de forma predatória, devido a maior ocorrência da espécie nessa localização geográfica. A construção de suas colméias ocorre em espaços ocultos, como ninhos de passarinho, paredes de casa e partes de árvores (SILVA; DA PAZ, 2012).

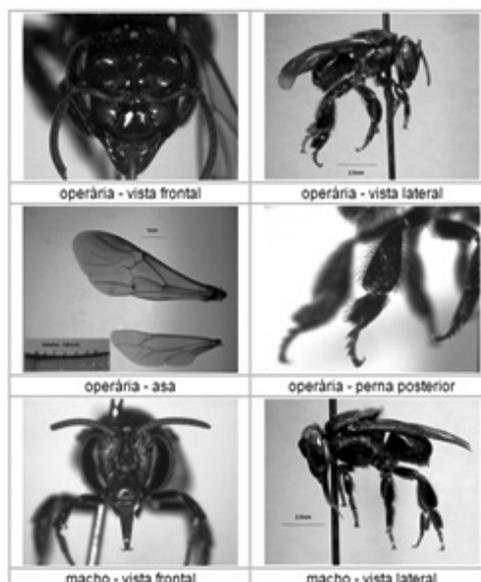
A espécie *Scaptotrigona bipunctata*, popularmente conhecida como Tubuna, Mandaguari tubuna ou canudo, pertence ao gênero *Trigonini* que apresenta ampla

distribuição geográfica, abrangendo regiões da Argentina ao México (CAMARGO; PEDRO, 2013). É encontrado frequentemente nas regiões Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), inclusive em ambientes urbanos. É uma abelha agressiva, que costuma morder quem a ameaça e tem o hábito de realizar suas atividades no período matinal.

Suas colônias possuem favos de cria envoltos por invólucro, concêntricos e horizontais, com formato que se assemelha ao de um funil (SAWAYA et al., 2009). Os favos de cria são construídos horizontalmente e helicoidalmente e não costumam fechar a entrada do seu ninho durante a noite. Suas colônias podem alcançar uma população de 2.000 a 50.000 abelhas. Apesar do pequeno porte, constrói ninhos grandes para a produção de mel.

Suas características morfológicas consistem de asas negras, abdômen negro, podendo ter uma lista de coloração prateada ou dois pontos dessa coloração; é negra e brilhante (FIGURA 2).

FIGURA 2 - ABELHA *Scaptotrigona bipunctata*



FONTE: COSTA (1970)

A destruição dos habitats pelo homem coloca em risco a extinção de mais de cem espécies de abelhas sem ferrão, de um total conhecido de trezentas e cinquenta espécies (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). O Brasil abriga cerca de um quarto destas espécies, devido a sua riqueza de ecossistemas e proporções continentais (PEREIRA et al., 2002).

Atualmente, o CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente - discute a criação de abelhas nativas e implementação de meliponários apenas em território de ocorrência natural, se houver mais de cinquenta colméias e se o meliponicultor estiver inscrito no Cadastro Técnico Federal (CONAMA, 2004).

As populações de abelhas sem ferrão acabam sendo afetadas direta ou indiretamente pelo processo de urbanização, que modificam a composição florística, causando transformações e resultados imprevisíveis (LAROCCA et al., 1982).

A busca pelo termo *Stingless bee* (abelha sem ferrão) leva ao encontro de 373 artigos originais; já a palavra-chave: *Scaptotrigona bipunctata*, apenas dez, sendo a última publicação do ano de 2015.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

O metabolismo pode ser definido como um conjunto de reações que ocorre em determinada célula a fim da manutenção de um organismo. Ocorre por meio de reações enzimáticas na chamada rota metabólica (SIMÕES et al., 2007).

Plantas e microorganismos apresentam reações de produção, acumulo e transformação de substâncias que não estão diretamente ligadas a manutenção da vida do organismo produtor, tal metabolismo é chamado de secundário. Os produtos deste metabolismo eram considerados insignificantes até a década de 50, porém, com o avanço da pesquisa de produtos de origem vegetal, comprovou-se que a defesa das plantas e a proteção contra raios UV é atribuída a essas substâncias, denominadas metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2007; YIN; ULM, 2017).

A origem dos metabólitos secundários ocorre a partir do metabolismo da glicose, principalmente via ácido chiquímico ou acetato (SIMÕES et al., 2007).

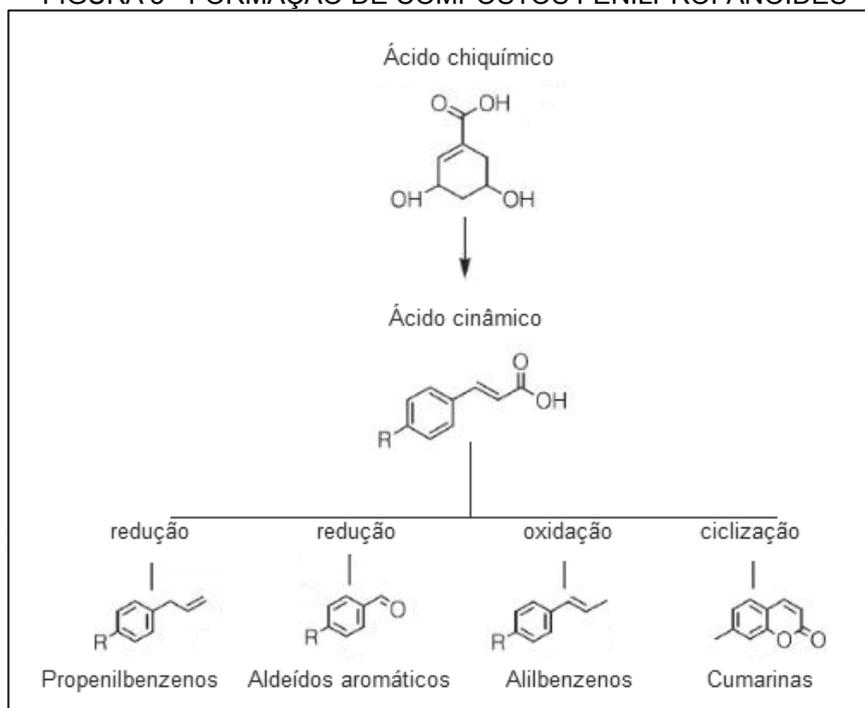
Os óleos essenciais ou óleos etéreos, óleos voláteis ou apenas essências, podem ser definidos como produtos obtidos a partir da extração de partes de plantas ou derivados vegetais, seja através da prensagem ou da técnica de arraste a vapor (TAJKARIMI et al., 2010; SIMÕES et al., 2010). Eles são produtos do metabolismo

secundário de plantas e são sintetizados em estruturas glandulares ou armazenados em células secretoras.

A principal característica química dos óleos essenciais é a sua volatilidade, possuindo aroma intenso e agradável, motivo de ser chamado essencial. Apresentam aparência líquida em temperatura ambiente, são lipossolúveis e menos densos que a água, podem ser coloridos ou incolores e possuem sabor picante (SANTOS et al., 2008; DJERRAD; KADIK; DJOUAHRI, 2015).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais são divididos de acordo com sua biogênese, podendo ser: fenilpropanóides ou terpenóides. Os fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico, conforme a Figura 3.

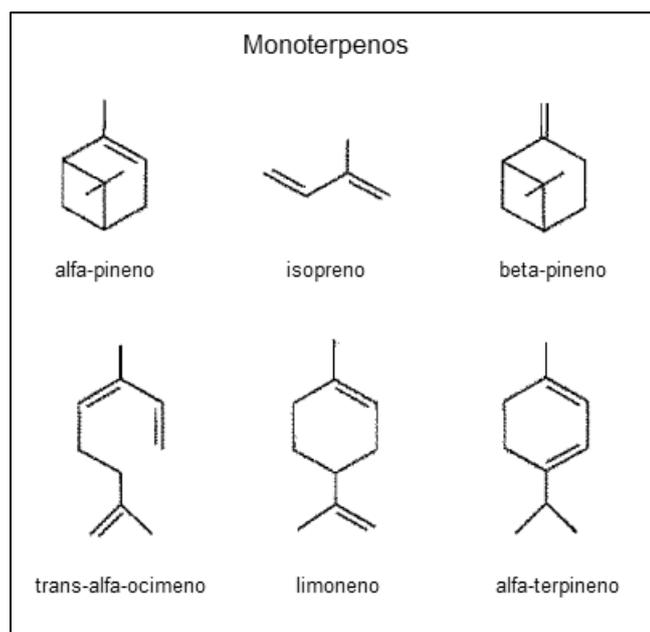
FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENILPROPANÓIDES



FONTE: SIMÕES et al. (2007), adaptado

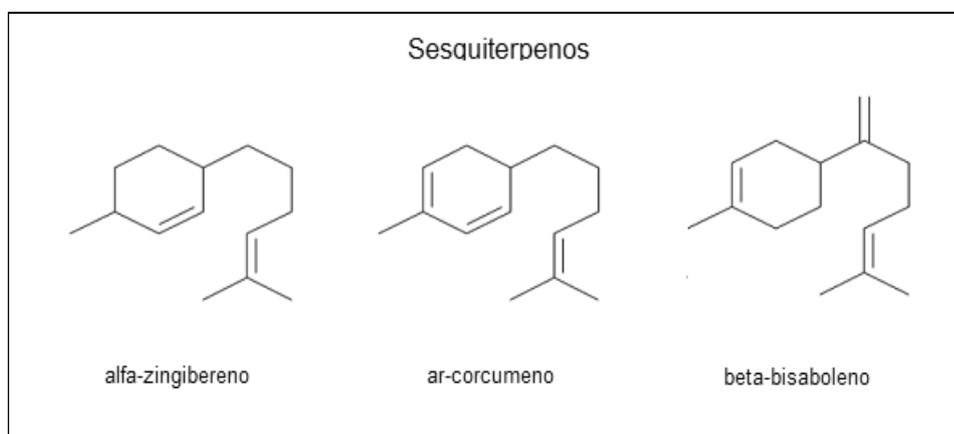
Os terpenóides são originados a partir do ácido mevalônico, derivados de unidades de isopreno. Os compostos terpenicos mais comuns são os monoterpênicos (FIGURA 4) e os sesquiterpenos (FIGURA 5).

FIGURA 4 - EXEMPLOS DE MONOTERPENOS DE OCORRENCIA EM ÓLEOS ESSENCIAIS



FORNE: SIMÕES et al. (2007), adaptado

FIGURA 5 - EXEMPLOS DE SESQUITERPENOS DE OCORRENCIA EM ÓLEOS ESSENCIAIS



FORNE: SIMÕES et al. (2007), adaptado

A baixa estabilidade dessas moléculas pode levar a alterações físico-químicas mesmo se os óleos forem conservados de maneira adequada (FISHER e PHILLIPS, 2006; SIMÕES et al., 2010). O Brasil se destaca no mercado mundial pela produção de óleos essenciais provenientes de pericarpos de frutos cítricos, necessitando de um padrão de qualidade específico para que haja um incentivo da exportação.

Em relação à sua composição química, os óleos essenciais apresentam uma ampla variedade de compostos, pois além de ter o determinante genético, o material e parte vegetal coletado, clima, local e época do ano e o método utilizado para sua extração, influenciam essa composição (DJERRAD, KADIK e DJOUAHRI, 2015). Essa influencia direta de fatores ambientais torna os estudos sobre óleos essenciais complexos, pois mesmas espécies vegetais apresentam variabilidade tanto de compostos como de concentração dos mesmos.

Essa gama de compostos leva a diversos efeitos biológicos, contando com a vantagem de ser um produto biodegradável que não causa impacto ambiental. Há uma utilização crescente dos óleos essenciais nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia. A Tabela 3 apresenta o número de trabalhos originais dos últimos dez anos encontrados na base de dados *Sciencedirect* em relação aos termos: *essential oil – essential oil; food* e as patentes depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial do ano de 1981 até 2017, em relação ao termo: óleo essencial.

TABELA 3 - PUBLICAÇÕES SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS

Termo de busca	Número de trabalhos
Essential oil	174.961
Essential oil; food	56.529
Óleo essencial	68

FONTE: A AUTORA (2017).

O elevado número de trabalhos sobre óleos essenciais reflete as propriedades benéficas sobre diferentes tipos de organismos e vantagens na sua utilização. Dentre os e os efeitos comprovados, estão as propriedade antioxidante, antifúngica, proteção contra protozoários e vírus, influência no desenvolvimento de espécies vegetais, bloqueio no crescimento de larvas de insetos transmissores de doenças, proteção UV, efeitos cicatrizantes e anticariogênicos, e o mais reportado, a atividade antimicrobiana – 17.023 resultados na busca por *essential oil; antimicrobial* no Science direct.

A capacidade de bloquear o crescimento de microorganismos ainda não está totalmente elucidada devido ao rápido desenvolvimento de mutação das bactérias (SOUZA et al., 2007). Pesquisas apontam que os componentes dos óleos essenciais podem atuar inibindo a síntese do ácido nucléico, influenciam no mecanismo de

ação do metabolismo de energia, podem causar lesão na parede celular, aumentando assim sua permeabilidade (BAJALAN; PIRBALOUTI, 2014).

Apesar das vantagens da utilização, nem todos os óleos são seguros para uso. Reações como mutagênese, carcinogênese e ensaios preliminares de toxicidade devem ser investigadas na pesquisa de novos insumos (TAGHIZADEH et al., 2017). A intoxicação pode levar a uma série de reações cutâneas, neurológicas, respiratórias e hepáticas (S. et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, com abordagem em análises laboratoriais para caracterização da composição química e nutricional e identificação das atividades biológicas da própolis de *Scaptotrigona bipunctata*.

O trabalho foi realizado nos laboratórios de fitoquímica e farmacotécnica do Departamento de Farmácia, nos laboratórios de análise de alimentos, microbiologia e de pesquisa e pós-graduação do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal do Paraná – Campus Jardim Botânico, Curitiba – Paraná; e no laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade Federal da Paraíba.

A autorização para a pesquisa está devidamente protocolada no IBAMA sob o número 02001.001167/2013-5.

3.2 AMOSTRA

A própolis foi coletada de diferentes caixas de abelhas sem ferrão no município de Mandirituba – PR, coordenadas geográficas S 25°47'33,61" O 49°17'27,16", no mês de outubro de 2015.

A própolis bruta e pura (FIGURA 6) foi armazenada a temperatura ambiente em local isento de luz, calor e umidade por vinte dias até a moagem com o auxílio de um multiprocessador semindustrial da marca Geiger® (FIGURA 7).

FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DE PRÓPOLIS BRUTA DE *Scaptotrigona bipunctata*

FONTE: A AUTORA (2017)

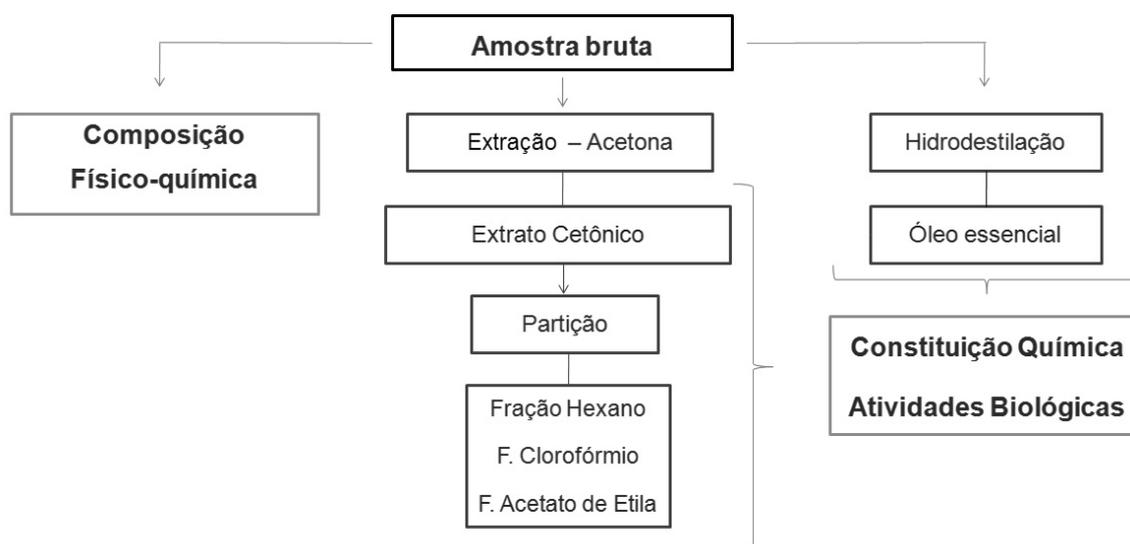
FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DA PRÓPOLIS TRITURADA E PENEIRADA



FONTE: A AUTORA (2017)

Posteriormente a amostra foi separada e preparada de acordo com a sua finalidade, conforme Figura 8.

FIGURA 8 - ETAPAS DE SEPARAÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA BRUTA DE PRÓPOLIS



FONTE: A AUTORA (2017)

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas foram realizadas com a própolis bruta, em triplicata, conforme AOAC – Association of Official Analytical Chemists (2005) e IAL - Instituto Adolfo Lutz (2008).

3.3.1 TEOR DE CERA

O teor de cera foi determinado a partir da extração a quente com álcool de cereais. Em um cartucho de papel filtro, foram pesados 10 g da amostra bruta e levadas ao aparelho de Soxhlet por 24 horas. Após o procedimento, o extrato foi filtrado em funil de Büchner e o seu precipitado foi lavado com etanol até obtenção de um resíduo branco. O resíduo foi seco em estufa a 40° C por 24 horas, por diferença encontrou-se o teor de cera (SILVA et al., 2006).

3.3.2 UMIDADE

A umidade da própolis foi determinada mediante secagem direta em estufa de acordo com a metodologia 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Aproximadamente 5 g da amostra bruta foram levadas à estufa a 105° C em pesa-filtro previamente tarado e mantido até peso constante. O teor da umidade foi obtido a partir da diferença entre a amostra seca e o peso do pesa-filtro.

O resultado foi expresso pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:

Pa = peso da amostra;

Pu = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

Ps = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

3.3.3 CINZAS

As cinzas da amostra foram analisadas de acordo com método nº 940.26 AOAC (2005). Aproximadamente 5 g da própolis triturada foram pesados em cadinhos previamente padronizados e levados à secura e carbonização em chapa elétrica. Após, as amostras foram incineradas em mufla a 550° C, até eliminação do carvão e resfriadas em dessecador até o momento da pesagem.

O teor de cinzas foi obtido a partir da diferença existente entre a amostra após incineração e o peso do cadinho, conforme a fórmula:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

Onde:

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tarado cadinho);

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.3.4 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

O pH foi determinado de acordo com a metodologia AOAC nº 942.15 (2005). Aproximadamente 3 g da amostra bruta foram diluídas em 100 mL de água destilada até as partículas ficarem uniformes. O pH desta solução foi aferido em pHmetro.

3.3.5 ACIDEZ TITULÁVEL

A acidez titulável foi verificada de acordo com a metodologia método nº 942.15 AOAC (2005), onde foram titulados 10 g da amostra bruta em 100mL de água destilada com solução de hidróxido de sódio 0,1M até atingir pH 8,0.

3.3.6 LIPÍDIOS TOTAIS

O teor de lipídeos totais foi determinado por meio da extração a quente da amostra bruta triturada com éter de petróleo de acordo com a metodologia nº 920.39.C da AOAC (2005). Aproximadamente 5 g de amostra foram pesadas em papel filtro e levadas ao extrator de Soxhlet acoplado a um condensador de bolas e balão de fundo chato previamente padronizado. O extrator foi mantido aquecido por aproximadamente 8 horas para extração. Posteriormente, o solvente foi destilado e o balão com o resíduo etéreo foi levado ao dessecador para futura pesagem. O teor

de lipídios foi calculado a partir da diferença de peso existente entre o balão padronizado e o balão com o extrato etéreo.

3.3.7 PROTEÍNA BRUTA

Foi realizada a determinação de nitrogênio da amostra pelo processo de Kjeldahl, de acordo com a metodologia nº 991.20 da AOAC (2000). O experimento consistiu de três etapas: digestão, destilação e titulação. Na primeira, foi pesado aproximadamente 1 g da amostra e submetido à digestão com ácido sulfúrico e catalisador, formando sulfato amoniacal.

Na segunda etapa, houve a destilação por arraste de vapor da amônia, recebida em erlenmeyer contendo ácido bórico a 4%, tornando a solução de coloração verde.

Na última etapa, a amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,02M até a primeira coloração cor-de-rosa. A determinação de proteínas foi calculada pela fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{V \times 0,00028 \times fc \times FC \times 100}{P}$$

Onde:

V = volume de ácido sulfúrico gasto na titulação

P = peso da amostra,

fc = fator de correção

FC = fator de conversão (6,25)

3.3.8 FIBRA ALIMENTAR TOTAL

O teor de fibra alimentar total da amostra da própolis bruta foi realizado conforme método enzimático-gravimétrico, metodologia n° 985.29 da AOAC (2005) com os reagentes SIGMA TDF-100A Kit – Total Dietary Fiber Assay Kit.

Foram pesados 3 g da amostra *in natura* em béqueres, adicionado 50 mL de tampão fosfato e 100 µL de α-amilase-termo-resistente. Cada béquer foi colocado em banho-maria com agitação, a 95°C por 30 minutos. Em temperatura ambiente, o pH foi ajustado a 7,5 com a adição de solução NaOH. Foram adicionados 5 mg de protease e colocados novamente em banho-maria a 60°C por 30 minutos, sob agitação constante.

Após esfriamento a temperatura ambiente, o pH foi novamente ajustado para 4,0 - 4,6 com adição de solução de HCl. Foram adicionados 300 µL de amiloglucosidase e novamente colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Foram adicionados 280 mL de etanol 95% em cada béquer e deixados em repouso por 12 horas à temperatura ambiente.

Para a filtragem foi adicionado álcool 78% (v/v) nos cadinhos para redistribuir o Celite e todo o resíduo, transferido para seu respectivo cadinho em pequenas porções. Cada béquer foi lavado três vezes com 20 mL de etanol 78% (v/v); duas vezes com 10 mL de etanol 95% (v/v) e duas vezes com 10 mL de acetona para retirada de todos os resíduos.

Os cadinhos com os resíduos foram secos em estufa a 100°C. Após esfriarem, os resíduos foram calculados, sendo determinados os teores proteína e de cinzas, que foram reduzidos do valor total para se obtenção do valor de fibras totais.

3.3.9 CARBOIDRATOS

Foi utilizado o método da diferença existente entre cem e o teor de proteínas, lipídios, cinzas, fibras alimentares e umidade para determinação de carboidratos da amostra (FAO & WHO, 1997), conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ de Carboidratos} = 100 - P - L - C - F - U$$

Onde:

P = teor de proteínas

L = teor de lipídios

C = teor de cinzas

F = teor de fibras

U = teor de umidade

3.3.10 VALOR ENERGÉTICO TOTAL

O valor energético total foi calculado segundo a conversão de Atwater, onde o teor protéico e de carboidratos são multiplicados por quatro quilocalorias, enquanto o teor de lipídios, multiplicado por nove quilocalorias (OSBORNE; VOOGT, 1978).

O valor energético total corresponde à soma de todos esses resultados, foi calculado da seguinte maneira:

$$\text{Energia} = (P \times 4) + (C \times 4) + (L \times 9)$$

Onde:

P = Teor de proteína

C = Teor de carboidratos

L = Teor de lipídios

3.3.11 IDENTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS

A análise de ácidos orgânicos nas amostras de própolis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido (350, Varian) equipado com desgaseificador à vácuo, bomba binária, injetor automático, loop de 20 µL. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Rezex ROA (300 x 7.8 mm). A fase móvel utilizada para separação dos ácidos foi uma solução aquosa de ácido sulfúrico 8 mM, na vazão de 0,5 mL/min, com pH ajustado para 2,6 com ácido fosfórico e tempo de corrida de 20 min. A quantificação dos ácidos orgânicos foi realizada por curva de padronização externa com 6 pontos para cada ácido orgânico (cítrico, málico, succínico, oxálico e tartárico). Todas as amostras e a fase móvel foram centrifugadas antes da injeção em cromatógrafo. Foram mantidas as mesmas condições cromatográficas para os padrões e amostras. As amostras da própolis foram diluídas com fase móvel (1/40), previamente centrifugada.

A análise de açúcares orgânicos foi realizada com os mesmos equipamentos da análise dos ácidos, sendo a curva de padronização externa com seis pontos para os padrões de sacarose, glicose e frutose obtidos da Sigma-Aldrich (USA). A identificação de ácidos e açúcares foi obtida pela comparação do seu tempo de retenção com o dos respectivos padrões (MACRAE, 1998; WANG et al., 2017).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE BETACAROTENO

O teor de betacaroteno foi determinado de acordo com Rodriguez-Amaya (2001). Para a extração de carotenóides foram homogeneizados 5 g da própolis com 20 mL de acetona. A mistura obtida foi filtrada sob vácuo e transferida para tubos de centrifuga, onde foram adicionados 20 mL éter de petróleo e 10 mL de água deionizada, posteriormente, o volume foi completado até 50 mL com éter de petróleo. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado para leitura em

espectrofotômetro (Gold S53 UV-Vis, Ningbo Biotek) a 450 nm para a determinação de betacaroteno (BRITTON, 1995).

3.5 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS

A determinação da composição mineral foi realizada utilizando espectrômetro de emissão óptica de plasma individualizado acoplado (ICP-OES), modelo Varian 720-ES com vista axial, Palo Alto USA. Inicialmente foram pesadas 1 g da amostra em cadinhos que foram levados a mufla a 550°C até a completa mineralização. Posteriormente foi calculada a porcentagem de resíduo mineral fixo, para isso, as cinzas foram submetidas à digestão seca.

Após o resfriamento foram adicionados 3 mL de HNO₃ a 65% e 1 mL de H₂O₂ a 30%, a mistura foi levada para chapa aquecedora, filtrada e transferida para balões volumétricos de 100 mL.

A amostra foi analisada em triplicata, utilizando para cada elemento mineral uma curva de calibração, e os resultados expressos em mg/100g.

3.6 DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C

A quantificação do conteúdo de vitamina C foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Varian Star 350, coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel de tampão fosfato de potássio de acordo com Paulo et al. (1999), adaptado.

Para a extração, foram utilizados 0,1 g de amostra diluídas em tampão fosfato de potássio 2%; a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante separado e filtrado em filtro de seringa 13 mm x 0,22 µm.

O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min, o tempo de corrida foi de 20 minutos no comprimento de onda de 254 nm. A curva padrão foi preparada com ácido ascórbico

em tampão fostado a 1 mg/mL. A leitura foi realizada em triplicata e convertida em escala linear a partir de concentrações que variaram de 0,1 mg/mL a 0,0005 mg/mL.

3.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES

O extrato bruto de própolis de *Scaptotrigona bipunctata* foi preparado em sistema fechado quente em aparelho de Soxhlet modificado sob o número de registro PI 0601703-7 A, utilizando como solvente extrator inicial a acetona. Após o termino da extração, houve a partição líquido-líquido, com solvente hexano, clorofórmio e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade (CARVALHO, 2009).

3.8 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de própolis de *Scaptotrigona bipunctata* foi isolado por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, por 24h a partir de 100 g da amostra bruta. Seu rendimento foi calculado a partir da base seca.

3.9 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

A determinação de ácidos fenólicos do extrato cetônico e das frações clorofórmio e acetato de etila foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência no equipamento marca Varian, modelo SYS-LC-240-E. O cromatógrafo é composto de AutoSampler modelo 410 Série 50492; Photodiode Array Detector modelo 335 série EL06019048 e Solvent Delivery Module modelo 230 série 01513. Para separação cromatográfica, foi utilizada coluna cromatográfica C 18 de fase reversa (250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm), fase A água acidificada e fase B,

metanol; tempo de corrida de 35 minutos, volume de injeção de 20 µl, no comprimento de onda de 275 nm. Os compostos foram identificados pela comparação dos espectros de ultravioleta obtidos do detector de arranjo de fotodiodos, tempo de retenção e cromatografia de padrões (SAHU et al., 2017).

Como padrões foram utilizados a quercetina, galangina e os ácidos cinâmico, caféico, clorogênico, ferúlico, *o*-cumárico e *p*-cumárico.

3.10 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO OLEO ESSENCIAL

A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu modelo QP2010S com uma coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm, 0,10 µm) de fase estacionária 100% de dimetilpolisiloxano. O fluxo de gás Hélio foi mantido constante em 0,75 mL/min e a temperatura do injetor foi de 280° C no modo splitless com divisão (Split) de 1:50. A temperatura inicial da coluna foi mantido a 100°C por 2 min e em seguida a velocidade de aquecimento foi de 10°C/min até 200°C, depois a velocidade foi de 25°C/min até 300°C permanecendo por 4 min. O detector de massas foi usado no modo SCAN com a razão massa/carga de 30 a 450 Da e no modo de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV (PAROSCHOS et al., 2016).

3.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.11.1 MÉTODO DO RADICAL ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante frente ao radical ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) foi realizado o método descrito por Re et al. (1999). O método baseia-se no monitoramento da diminuição do radical

produzido pela oxidação do ABTS em contato com o extrato, frações e óleo essencial.

Foi realizado o preparo do radical a partir de solução ABTS 7,0 mM adicionado de persulfato de potássio 2,4 mM, este reagiu por 16 h ao abrigo da luz e que posteriormente foi diluído com etanol até obtenção de uma solução com valor de absorvância de 0,70 (\pm 0,05) a 734 nm. O controle consistiu de etanol acrescido do radical; e o padrão utilizado foi o Trolox. A leitura da absorvância ocorreu após sete minutos de reação.

O extrato, frações e óleo essencial em diferentes concentrações, acrescidos do radical, tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro UV- visível (Shimadzu), e sua atividade antioxidante calculada em relação ao Trolox.

3.11.2 MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada pela redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, DPPH, que ao fixar hidrogênio, reduz a absorvância (MENSOR et al, 2011). A partir dos resultados, foi determinada a porcentagem sequestradora de radicais livres.

Inicialmente foi preparada uma solução metanólica do DPPH a 0,03 mmol/mL e diluições do extrato, frações e óleo essencial em concentrações que variaram entre 100 a 1000 μ g/mL e adicionados 1 mL da solução de DPPH. O controle consistiu de 2,5 mL solvente metanol acrescido de 1mL do radical DPPH; como padrões foram utilizados a vitamina C e rutina.

Após trinta minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV- visível (Shimadzu) a 518 nm e atividade antioxidante foi calculada em relação ao controle, pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade antioxidante \%} = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle}}$$

Onde:

Abs = absorvância

3.11.3 FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

O ensaio foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar (1999). A técnica baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, e obtenção de um complexo fosfatomolibdênio V, de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm. O método possui a vantagem de avaliar, de forma simples, a capacidade antioxidante dos componentes lipofílicos e hidrofílicos.

Para a reação de formação do complexo foi preparado um reativo, no momento do uso, com uma solução com fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL.

Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol. Em um tubo de ensaio foi pipetada uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, e adicionado 3 mL do reativo. O mesmo foi realizado com os padrões.

O branco foi constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata, em tubos hermeticamente fechados e colocados em banho-maria a 95° C por 90 minutos. A leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro de UV em 695 nm, quando atingida a temperatura ambiente.

Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina.

3.11.4 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O método foi adaptado de Kishida et al. (1993) e Morais et al. (2006). Esse método envolve a peroxidação da gema de ovo por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroxiperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado no decorrer do processo

oxidativo (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). O malonaldeído ao reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em condições de elevada temperatura e meio acidificado é capaz de mensurar a peroxidação lipídica de matrizes biológicas por meio do cromóforo róseo formado.

Foram testadas em cinco repetições o extrato, as frações e o óleo essencial. Como padrão foi utilizado o antioxidante butilhidroxidotolueno (BHT). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra e o volume completado com água destilada para 1 mL.

Após, foi acrescentado a cada um dos tubos de ensaio 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (p/v) em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,1% (p/v).

Os tubos de ensaio ficaram em banho-maria (95°C) por 1 hora, sob agitação. Após resfriamento, foram acrescentados 5 mL de n-butanol a cada tubo, que será centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos ao espectrofotômetro em 532 nm. O mesmo, com o branco.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem. Os dados serão submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparações entre as médias dos índices de atividade (IA%), foi utilizado o teste de Tukey. As diferenças serão consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A técnica escolhida para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM do extrato e frações foi determinada pelo método de microdiluição e para o óleo essencial, macrodiluição em caldo, segundo metodologia do CLSI (2009).

As amostras foram testadas em relação ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644).

Foi realizada diluição seriada das amostras, acrescidas da suspensão bacteriana ajustadas para $1,0 \times 10^8$ UFC/mL e incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C. Após este intervalo, as amostras foram transferidas para uma microplaca e foi acrescentado resazurina (0,01%) para a leitura dos resultados.

A formação da coloração vermelha nos orifícios das microplacas é interpretada como presença da atividade bacteriana pela substância em estudo, enquanto que a não formação da coloração vermelha será considerada como presença de atividade antimicrobiana.

A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano. Cada teste foi realizado em triplicata (NOSTRO et. al, 2001).

3.13 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A determinação da atividade hemolítica foi realizada conforme o método descrito por Banerjee et al. (2008) adaptado, determinando as porcentagens de hemólise. Foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial da empresa Newprov®, previamente homogeneizado sob leve agitação, para um tubo de ensaio e centrifugados durante cinco minutos a 3000 rpm com PBS gelado. Foram realizadas lavagens seguidas com PBS, descartando sempre o sobrenadante. Os eritrócitos precipitados foram diluídos a 2%.

Para a realização da prova de hemólise foram preparados eppendorfs com hemólise a 100% (controle positivo); hemólise basal (branco); controle solvente e os testes (amostras). Foram preparadas soluções do extrato, frações e óleo essencial nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL em 200 µL de solução de eritrócito a 2%.

Todas as amostras, incluindo branco, foram avaliadas em triplicata. Os eppendorfs foram devidamente homogeneizados, incubados durante três horas em

estufa com temperatura controlada a 37°C, após, centrifugados em centrífuga a 3000 rpm durante cinco minutos e posteriormente foi realizada a leitura da absorbância em microplaca de Elisa de 96 poços a 540nm.

3.14 ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE

O ensaio preliminar consistiu na avaliação da dose letal do extrato, frações e óleo essencial frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os ovos do crustáceo (200 g) foram eclodidos em solução salina, preparada com 400 mL de água purificada e 14,31 g de sal marinho; com pH mantido entre 8,0-9,0, temperatura controlada entre 27°C e 30°C e sob constante agitação por 48 horas.

Foram preparadas soluções do extrato, frações e óleo essencial em concentrações de 1000 µL/mL, 100 µL/mL e 10 µL/mL, em triplicata. Como controle foram utilizados o solvente metanol para o extrato e frações, e tween, para o óleo essencial.

Após o preparo das soluções, foram adicionados dez crustáceos em cada eppendorf e incubados por 24 horas. Passado este tempo, foram observados quantos deles estavam imóveis e então realizado o cálculo de DL₅₀ (dose letal) através do método estatístico Probitos, com 95% de intervalos de confiança.

Quando a DL₅₀ das amostras foram superiores a 1000µg/mL, as frações são consideradas inativas (MEYER et al., 1982).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os teores de lipídeos, proteínas, carboidratos e fibras e o valor energético total da própolis são reportados pela primeira vez no presente trabalho. Os valores encontrados na caracterização físico-química estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 - VALORES MÉDIOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Análise	Resultados
Cera (%)	13,46 ± 1,14
Umidade (%)	0,73 ± 0,13
Cinzas (%)	1,20 ± 0,08
pH	6,54 ± 0,02
Acidez titulável	0,07 ± 0,017
Lipídios (g/100g)*	64,14 ± 4,86
Proteína total (g/100g)	2,78 ± 0,13
Fibra alimentar total (g/100g)	1,82 ± 0,14
Carboidratos (g/100g)	17,6
VET (Kcal)	666,06

*nos teores de lipídeos apresentados, já está subtraído o teor de cera

Apesar da própolis ser um subproduto de abelhas, sua ingestão não ocorre de maneira in natura, como o mel e o pólen, mas a partir de extratos adicionados a alimentos, balas, xaropes e bebidas. A própolis possui o diferencial de ter em sua composição resina, cera e outros exsudatos vegetais, devido a essas características físico-químicas, Brasil (2002) determina que os teores máximos de cera sejam de 25%. A própolis de *Scaptotrigona bipunctata* apresentou valor inferior ao recomendado, estando adequada a Legislação Vigente. Outros estudos realizados com própolis oriunda do estado do Paraná apresentaram teores superiores ao recomendado, variando entre 30,49 a 38,55% (SILVA et al., 2006; RUFATTO et al., 2017).

Diferente do mel, cujos valores de referência apontam como 20,0% o limite para umidade, a Legislação Vigente recomenda que a da própolis seja inferior a 8%.

A umidade está diretamente ligada com o índice pluviométrico da época do ano em que a própolis foi coletada e este parâmetro de qualidade pode influenciar sua estabilidade (ESCRICHE et al., 2017). O teor de 0,73% de umidade indica um produto de qualidade, sem suscetibilidade para o crescimento microbiano e fúngico, devido ao baixo teor de água.

Os teores de cinzas se referem ao resíduo inorgânico que resta da queima da matéria orgânica, é considerada um indicador da composição mineral da amostra, sendo utilizada como parâmetro de qualidade e identificação do tipo de alimento (AOAC, 2005). O teor máximo permitido é de 5%, valores superiores podem sugerir uma elevada quantidade de solo, indicando uma amostra contaminada. A própolis do estudo se encontra dentro dos parâmetros exigidos pela legislação vigente.

Por não se tratar diretamente de um alimento, alguns dados que são utilizados como parâmetro de qualidade não se aplicam a própolis. Assim, foi observado um pH básico que está relacionado com a origem vegetal da amostra. Pedacinhos de casca, restos de flores e raízes utilizados durante a preparação da própolis pelas abelhas podem influenciar este resultado, a espécie *Araucaria angustifolia*, típica da região de Mandirituba apresenta pH superior a 9,5 (ARALDI; COELHO, 2015).

Em relação aos seus macronutrientes, nota-se que a maior parte da amostra consiste de lipídeos, aproximadamente 64,14% da sua composição total, um alto teor justificado por se tratar de um recurso natural produzido a partir de resinas, bálsamos e ceras. Quando comparada com outros produtos de abelhas sem ferrão, como o mel (0,15%) e o pólen (4,0%), percebe-se uma grande diferença nos teores de lipídeos, comprovando a alta complexidade e especificidade do trabalho das abelhas na fabricação de produtos com diferentes objetivos para a colônia (SILVA et al., 2006).

Como a própolis é produzida também a partir de insetos ou suas partes, é observada a presença de proteína, embora em baixa quantidade, na sua composição centesimal (POMA et al., 2017). Em relação à fibra alimentar total, pode-se associar a pedaços de galhos e cascas presentes na sua formação; os carboidratos, com o resíduo do mel. Os teores de carboidratos da própolis, quando comparados com os do mel (70,6%), chegam a ter uma concentração três vezes menor. As abelhas utilizam enzimas diferentes para a fabricação de seus

subprodutos, a amilase, glucose-oxidase e invertase atuam no néctar coletado de flores para que o mel seja composto de sacarose, glucose e frutose; já a enzima salivar beta-glucosidase atua na fabricação da própolis, tornando sua composição química diversa e complexa (OSÉS et al., 2016). O alto valor energético total (VET) se deve ao maior percentual de lipídeos.

Em relação aos ácidos orgânicos, a amostra não apresentou teores de ácido succínico, málico, oxálico, cítrico ou tartárico. Também não foram encontrados os açúcares sacarose, frutose ou glicose, tornando a própolis um produto proveniente de abelhas, com diferenças de composição quando comparadas com o mel e o pólen.

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BETACAROTENO

O valor encontrado para betacaroteno na amostra bruta de própolis foi de 72,96 ($\pm 0,35$) $\mu\text{g/g}$, sugerindo que a própolis apresenta em sua constituição uma quantidade baixa de carotenóides. Esses pigmentos são protegidos nos tecidos vegetais, mas são facilmente oxidados quando os vegetais são triturados. Por se tratar de um produto derivado de resíduos vegetais, o baixo teor é justificado.

Os carotenoides são os pigmentos de maior ocorrência na natureza e podem ser encontrados em frutos, hortaliças e até em animais e microorganismos. Como os animais não conseguem sintetizá-los, é necessária sua ingestão via alimentação. Já foram reportados mais de seiscentos tipos diversos de carotenóides, porém os mais abundantes na dieta humana são o beta-caroteno, o alfa-caroteno, o licopeno e a luteína (MAPELLI-BRAHM et al., 2017).

As maiores fontes alimentícias de carotenoides são frutos e folhas, atuam de maneira benéfica na saúde humana principalmente como provitamina A, possuindo um elevado potencial antioxidante (FOO et al., 2017). Não foram encontrados outros trabalhos sobre o teor de betacaroteno em própolis de abelhas com ou sem ferrão.

4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE MINERAIS

Os minerais desempenham um papel fundamental na saúde humana, atuando com diferentes enzimas para uma atividade antioxidante, mantêm o equilíbrio do organismo e são componentes de diversos órgãos e tecidos. A composição mineral de um produto de origem vegetal depende diretamente da composição do solo (LOPES et al., 2015).

Para a determinação dos teores de macro e microelementos minerais da própolis foi escolhida a metodologia de espectrometria de absorção atômica, por se tratar de uma técnica de alta confiabilidade e especificidade. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 6.

TABELA 6 - TEORES DE ELEMENTOS MINERAIS ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Minerais	Teor de minerais (mg/100g)	RDA (mg/dia)*	Conversão para RDA (%)***
Alumínio	82,25	ND**	-
Cálcio	74,51	1000	7,45
Cobre	2,63	0,90	292,22
Cromo	0,07	0,035	200
Ferro	29,51	18,00	163,94
Potássio	170,65	4700	3,63
Magnésio	65,67	420	15,63
Manganês	34,97	2,30	1520,43
Sódio	48,17	1500	3,21
Niquel	0,26	0,70	37,14
Fósforo	179,32	700	25,61
Selênio	< 0,10	55 mcg/dia	0
Zinco	2,36	11	21,45

Fonte: DRIs, 2005

*RDA: ingestão dietética recomendada

**ND: não determinado

***Adequação do percentual de Ingestão Dietética Recomendada para adultos entre 31-50 anos em relação a 100 g da amostra bruta

Apesar de diversas publicações sobre a composição mineral de alimentos, as tabelas de composição disponíveis são na sua maioria baseadas em estudos realizados em outros países, por isso a investigação em alimentos brasileiros é essencial (LOPES et al., 2015). Os valores médios de minerais foram convertidos para RDA (Recommended Dietary Allowances), para melhor visualização do quanto é necessário para a própolis atingir os níveis de ingestão de nutrientes adequados para uma população sadia.

A determinação da composição mineral da própolis é importante, pois sua constituição química sofre influência de alguns minerais, como o zinco, selênio e fósforo (SOUZA et al., 2016). No presente estudo, o fósforo foi o componente mineral encontrado em maior quantidade. Considerado um dos elementos primordiais no organismo humano, atua na formação e composição de dentes, ossos, fosfolípidos e agente de sinalização para a fosforilação lipídica, a ingestão dietética recomendada consiste de uma quantidade de 700 mg/dia, não contribuindo assim, para a necessidade diária da mesma (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017). A alta concentração de cobre observada merece atenção, pois a ingestão excessiva do mineral pode levar a sintomas de intoxicação.

O manganês, mineral envolvido no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e colesterol, dificilmente tem seus valores de recomendação atingidos. A própolis de *Scaptotrigona bipunctata* apresentou valores superiores aos de 1 L de chá preto, considerado a maior fonte disponível para ingestão do mineral. Os teores de ferro encontrados foram 60% superiores ao recomendado para um dia. Valores semelhantes foram encontrados em outros estudos, com a justificativa da presença terra em sua composição (PADOVANI et al., 2006; SOUZA et al., 2016). Partindo da idéia de haver presença de solo na produção da própolis pela abelha, os valores que ultrapassam em 100% a ingestão diária de cromo são esperados. O processamento pode influenciar na concentração deste mineral, alguns trabalhos apontam que se ingerido em altas doses, o cromo pode causar toxicidade, porém sua valência é quem a determinará.

Como já foi apontado no texto, um dos fatores que tornam o Brasil um dos maiores exportadores da própolis são os padrões de identidade e qualidade das amostras, com baixos teores de contaminantes. Quando analisados os níveis de alumínio, a própolis do presente estudo se afirma como segura para o consumo,

pois os níveis considerados seguros para a ingestão semanal de um adulto consistem de 7mg/kg de peso. A ausência do mineral na amostra, reflete a importância da criação de abelhas em um habitat que remeta ao seu natural.

Os níveis de magnésio, zinco, ferro e sódio de diferentes tipos de própolis podem sofrer uma influência direta do clima de quando foram coletados, apresentando teores superiores quando a coleta é realizada na primavera (SOUZA, 2016). Em relação a porção diária recomendada para consumo da própolis, os teores de minerais tornam-se mínimos, merecendo destaque a ausência de contaminantes.

4.4. DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C

A vitamina C é encontrada em tecidos vegetais e animais como ácido ascórbico e ácido deidroascórbico. As fontes alimentares de ascorbato são quase que unicamente de vegetais, grãos possuem baixas quantidades. A vitamina é considerada um potencial antioxidante, devido a facilidade de doar elétrons. Acredita-se que faça parte da primeira linha de defesa do organismo, colaborando também para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Como é facilmente oxidado, sua biodisponibilidade sofre influência do processamento, armazenamento inadequado e contato com a luz (MDITSHWA et al., 2017).

Em relação ao teor de vitamina C, a própolis bruta não pode ser considerada uma fonte do nutriente, devido ao valor correspondente a 37,90 mg/100g, sendo a RDA por adultos saudáveis, estabelecida como 100 mg/dia.

A estabilidade da Vitamina C é afetada pelo oxigênio, pH, luz, enzimas e minerais, sobretudo cobre e ferro. Essa instabilidade é influenciada pela temperatura, quanto maior, menos estável (ORDOÑEZ, 2005). Por se tratar de um material usado para a vedação das colméias, há uma exposição constante à luz solar, à água e ao ar, podendo levar a degradação da vitamina. O processamento pós-coleta se realizado de maneira inadequada, pode colaborar para uma perda ainda maior da mesma.

4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL

Após a extração com acetona e particionamento com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, nessa ordem, foi determinado o rendimento de cada amostra. O resultado está representado na Tabela 7.

TABELA 7 - RENDIMENTO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PROPOLIS

Amostra	Rendimento (g/mL)
Extrato cetônico	4,80
Fração hexano	202,72
Fração clorofórmio	35,20
Fração acetato de etila	12,32
Óleo essencial	4,7 mL

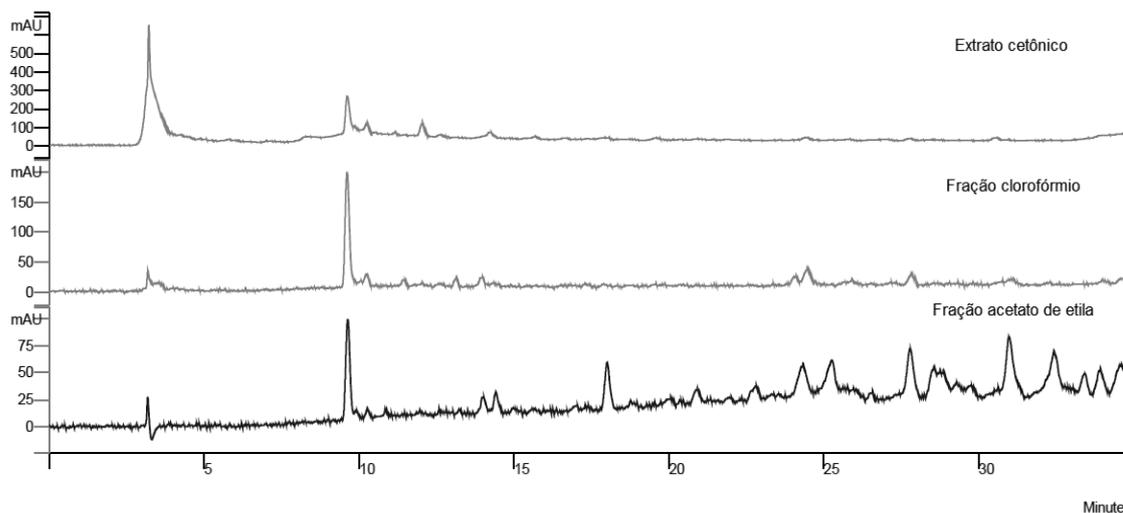
O solvente hexano possui a capacidade de solubilizar óleos e gorduras (SIMÕES et al., 2007), assim o alto rendimento da fração hexano tem relação direta com os teores de lipídeos encontrados na amostra bruta da própolis de *Scaptotrigona bipunctata*.

4.6 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Para o desenvolvimento do método de CLAE primeiramente foram investigadas as condições cromatográficas do extrato cetônico, fração clorofórmio e fração acetato de etila, a fim de se adequar a resolução dos picos e o tempo. A melhor separação ocorreu com o tempo de análise de 35 minutos.

A FIGURA 10 apresenta os cromatogramas do extrato e frações de própolis de *Scaptotrigona bipunctata*. Os perfis obtidos são resultado da composição química das amostras. Comparados com os espectros e tempo de retenção dos padrões: galangina, quercetina, ácidos cinâmico, ferúlico, caféico, clorogênico, *o*-cumárico e *p*-cumárico, as amostras não apresentaram nenhum composto desta natureza.

FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*



FONTE: A AUTORA (2017).

Os efeitos positivos da própolis dependem diretamente da sua composição química. Como a composição é muito variada, alguns fatores são interferentes para que sejam observadas diferentes atividades biológicas (KARDAR et al., 2014).

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas e vegetais amplamente distribuídos na natureza, sendo responsáveis pelos pigmentos de frutas e hortaliças. Do ponto de vista nutricional, a ingestão desses compostos através da dieta é primordial para a proteção e promoção da saúde, tendo em vista sua facilidade para doação de elétrons, proporcionando efeitos antioxidantes.

Em relação à própolis, os compostos fenólicos são citados como os responsáveis pelos efeitos antioxidantes (RUFATTO et al., 2017). Dentre os mais encontrados estão os derivados do ácido cinâmico, sendo que amostras de diferentes regiões brasileiras apresentam diferentes ácidos fenólicos (TABELA 8)

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Estado brasileiro	Abelha	Composição química
Minas Gerais	<i>Apis mellifera</i>	Ácido cinâmico, caféico; ferúlico e <i>p</i> -cumárico
Paraná	<i>Apis mellifera</i>	Ácido <i>p</i> -cumárico e caféico
Bahia	<i>Apis mellifera</i>	Não foram encontrados

FONTE: PAGANOTTI (2013)

A presença de ácidos fenólicos é variada e a comparação com diferentes regiões geográficas e espécie de abelha confirma que a composição recebe influência direta desses fatores. Assim como a própolis do presente estudo, a da Bahia não apresentou em sua composição, ácidos fenólicos.

4.7 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação foi de 0,47% (v/p) em relação ao seu peso seco. O óleo essencial obtido a partir de própolis de *Scaptotrigona bipunctata* foi analisado por CG/EM, foram contabilizados quarenta e três picos e identificados (FIGURA 11) e dezessete constituintes no óleo essencial, o que representa 86,11% do óleo (TABELA 9).

TABELA 9 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Pico	Composto	TR	% Área
2.	(4Z)-2-,6-Dimetil1-4octeno	3,682	0,16
3.	1-Isopropil-4-metilbiciclo [3.1.0]hex-2	3,875	0,69
4.	α -pineno	4,010	47,76
5.	Canfeno	4,194	1,35
8.	β -pineno	4,590	4,67
9.	Trans-careno	4,942	3,24
10.	p-cimeno	5,248	18,28
21.	L-trans-pineno	7,497	0,98
22.	Cis-verbenol	7,593	3,16
24.	2,6,6-Trimetilbiciclo [3.1.1]heptano-3	8,108	0,76
25.	p-cimeno-8-ol	8,308	0,32
26.	4-terpineol	8,366	1,33
27.	(IR)-(-)-Mirtenal	8,546	0,47
28.	α -terpineol	8,606	0,47
30.	Cis-Verbenol	8,800	1,85
38.	Copaeno	13,579	0,43
39.	α -borboneno	13,725	0,19

Os maiores constituintes encontrados foram o alfa-pineno (47,76%), para-cimeno (18,28%) e o beta-pineno (5,07%). Por esses resultados, tem-se que os grupamentos químicos mais importantes encontrados no estudo foram monoterpenos.

Por consistir de um material obtido a partir de partes e exsudatos de árvores, a própolis apresenta em sua constituição características da ecoflora do local das caixas das abelhas. A coleta da amostra foi realizada no município de Mandirituba no Paraná, pertencente a mesorregião metropolitana de Curitiba. Tal área tem como característica uma diversidade de ambientes naturais, destacando-se a floresta ombrofila mista (36%), ou de araucárias, e a floresta ombrofila densa (32%) (IPARDES, 2006).

A Floresta Ombrofila Mista é caracterizada pela presença de diversas espécies vegetais, em especial a *Araucaria angustifolia*, uma conífera, cuja composição química dos extratos e óleos essenciais de suas cascas, folhas e flores apresentam um elevado teor principalmente de monoterpenos (BROPHY, 2000; FLORES; DOSKEY, 2015), justificando a composição química do óleo essencial de própolis.

Apesar da popularidade dos óleos essenciais, poucos autores exploraram a extração a partir da própolis. A TABELA 10 classifica os compostos majoritários de óleos essenciais de própolis de acordo com a espécie de abelha e localização.

TABELA 10 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG/EM EM PRÓPOLIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ABELHA

Espécie de abelha	Compostos majoritários	Autores
<i>Apis mellifera</i>	Espatunelol; fernesol; acetofenonas	Naik, Vaidya e Namjoshi (2013)
Abelhas sem ferrão de Yucatán	Beta-pineno; alfa-pineno; transverbenol; alfa-capaeno; cariofileno	Pino et al. (2006)
<i>Apis mellifera</i>	Timol; para-cimeno; carvacrol e gama-terpineno	Probst et al. (2006)
<i>Apis mellifera</i>	Beta-cariofileno; nerolidol, selina, dieno	Rios et al. (2014)
<i>Apis mellifera</i>	Espatunelol e nerolidol	Fernandes et al. (2015)

A diversidade na composição química de óleos essenciais obtidos a partir de plantas e sementes também é observada na própolis. Apesar de possuir compostos

em comum com a própolis de *Yucatán* – alfa- pineno (6,71%) e beta-pineno (4,05%) – as concentrações da amostra proveniente de *Scaptotrigona bipunctata* são superiores. O mesmo ocorre com o óleo essencial de própolis de *Apis mellifera* e o teor de para-cimeno do óleo do presente estudo.

Uma característica dos óleos é sua alta complexidade devido a composição química variada e diferença nos teores de cada composto, assim, o sinergismo entre seus constituintes é responsável pelas atividades biológicas observadas em diferentes trabalhos.

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados da determinação da atividade antioxidante do extrato cetônico, das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, e do óleo essencial de própolis frente ao radical DPPH e ABTS, pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio e frente a substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram calculados e não foi encontrada atividade antioxidante na própolis de *Scaptotrigona bipunctata*.

A ausência da atividade antioxidante pode ser resultado de um tipo de própolis totalmente diferente do popular, proveniente de *Apis mellifera*. As análises de teores de betacaroteno, vitamina C e de ácidos fenólicos no presente estudo reforçam a idéia de que as atividades biológicas encontradas são reflexo da composição química.

A vitamina C, como já foi discutido, apresenta uma capacidade seqüestradora de radicais livres, levando a um potencial antioxidante; a presença de compostos fenólicos e betacaroteno podem levar a um papel de neutralização e absorção de radicais livres, pelas suas propriedades de óxido-redução (SALAS et al., 2016; CHRYSARGYRIS et al., 2017). Como a própolis não apresenta teores significativos de betacaroteno e vitamina C e não foram encontrados traços de ácidos fenólicos em seu extrato cetônico e frações, espera-se que também não haja um potencial antioxidante (CAO et al., 2017). Alguns óleos essenciais podem apresentar atividade antioxidante, porém como nenhum derivado da própolis do

presente estudo demonstrou possuir compostos com poder seqüestrador de radicais livres, o óleo essencial extraído a partir dessa mesma própolis também não contém compostos antioxidantes.

4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi determinada sobre nove diferentes cepas bacterianas, divididas entre Gram-positivas e Gram-negativas. No controle do solvente, houve o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima do extrato, frações e óleos essenciais foi expressa na TABELA 11.

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Microorganismos	Extratos (µg/mL)				
	E.C.	F.H.	F. Cl.	F. AE.	OE. (µL/mL)
Gram positivas					
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1000	1000	1000	500	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	500	500	1000	500	2,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	250	500	500	500	2,5
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	500	500	500	500	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	500	500	250	250	1,25
Gram negativas					
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1000	500	1000	500	2,5
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	1000	1000	1000	1000	2,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	250	500	500	500	1,25
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1000	1000	1000	1000	10

NOTA: E.C. – Extrato Cetônico; F.H. – Fração Hexano; F.Cl. – Fração Clorofórmio; F.AE. – Fração Acetato de Etila, OE. – Óleo Essencial.

O extrato e frações demonstraram possuir atividade antimicrobiana, com destaque para fração acetato de etila. As cepas bacterianas apresentam sensibilidade variada em relação a cada amostra. A ordem de potencialidade é: fração acetato de etila > extrato cetônico = fração hexano > fração clorofórmio.

Os metabólitos secundários são os responsáveis pela ação antimicrobiana dos produtos de origem vegetal, mas nem sempre seu mecanismo de ação é elucidado, pois diferentes compostos atuam em diferentes funções (TAJKARIMI et al., 2010). No presente estudo foram utilizados quatro solventes para a extração de compostos que apresentassem maior afinidade com os mesmos.

O solvente acetona possui afinidade com taninos, substâncias fenólicas capazes de formar complexos com proteínas, contribuindo assim, para a sua atividade antimicrobiana (OBIANG-OBOUNOU; RYU, 2013; SANTOS et al., 2017). O extrato cetônico foi capaz de bloquear o crescimento de todas as cepas bacterianas, com destaque para o *Streptococcus pneumoniae* e a *Klebsiella pneumoniae*, dois microorganismos resistentes que estão associados com doenças respiratórias, sendo a última denominada superbactéria. A amostra fração hexano pode causar afinidade pelos lipídeos de membrana, causando lesão da parede celular das bactérias (TAJKARIMI et al., 2010).

Partindo do mesmo princípio de afinidade, o solvente clorofórmio é capaz de extrair substâncias fenólicas (MRABET et al., 2017). A fração clorofórmio bloqueou o crescimento de todas as cepas bacterianas, em especial a *Listeria monocytogenes*, do ponto de vista da nutrição, representa grande importância, uma vez que essa bactéria está associada a contaminação de alimentos minimamente processados.

Em relação à fração acetato de etila, o solvente é capaz de extrair um número maior de flavonoides e seus derivados, que apresentam como característica o poder de rompimento de membranas lipídicas, inibindo a síntese de ácidos nucleicos, interferindo no metabolismo das bactérias, podendo atribuir o bloqueio da atividade microbiana a esses fatores (GULLÓN et al., 2017).

O óleo essencial apresentou uma elevada atividade antimicrobiana, em especial sobre a *Listeria monocytogenes* e a *Klebsiella pneumoniae*. O ensaio demonstrou que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tiveram sua atividade bloqueada por uma baixa concentração do óleo essencial. Este pode agir na membrana celular bacteriana devido a sua hidrofobicidade, causa o rompimento dos lipídeos de membrana, aumentando assim a solubilidade a constituintes celulares e desintegrando as estruturas celulares (PROBST et al., 2011).

A atividade antimicrobiana é consequência da composição do óleo essencial. Estudos apontam que o sinergismo entre os compostos apresentam um resultado superior ao de um componente testado de maneira isolada. Sieniawska et al. (2013) demonstraram que o alfa-pineno isolado não foi capaz de bloquear o crescimento de *Staphylococcus aureus*, porém o uso do óleo essencial como todo, sim.

Outra atribuição do potencial antimicrobiano é a presença de monoterpenos como compostos majoritários. Os monoterpenos presentes no óleo essencial de capim-limão foram capazes de afetar a expressão gênica da *Listeria monocytogenes*, atuando de modo dose-dependente (HADJILOUKA et al., 2017). Cepas de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* foram bloqueadas por diferentes tipos de óleo essencial, destacando-se o de orégano, composto majoritariamente pelo carvacrol (MAZZARINO et al., 2015). O alfa-pineno presente no óleo essencial da erva-de-são-joão foi atribuído como o responsável pelo bloqueio da atividade de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MORSHELOO et al., 2015).

Assim como no presente estudo, as bactérias Gram-negativas vem sendo reportadas como mais resistentes, e o uso do óleo de maneira totalitária apresenta vantagem em relação ao composto isolado (BAJALAN e PIRBALOUTI, 2014).

Apesar da capacidade dos extratos e óleo essencial de bloquearem o crescimento microbiano no presente estudo, não se pode afirmar que foi devido a ruptura celular, extravasamento do conteúdo intracelular ou por inativação do DNA dessas bactérias. Mas seu uso consiste de uma alternativa, devido a variedade da composição química, baixa toxicidade a mamíferos e por não impactar de modo negativo o meio ambiente (PROBST et al., 2006; BAJER et al., 2017).

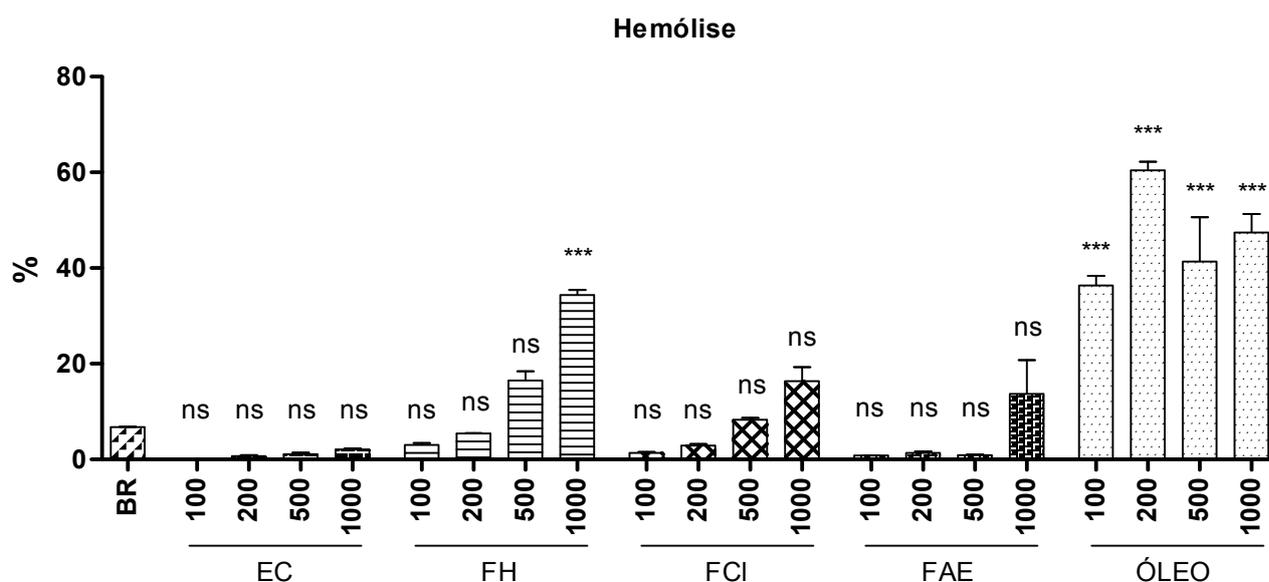
4.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Embora o extrato, frações e óleo essencial tenham demonstrado um efeito positivo em relação à atividade antimicrobiana, alguns estudos apontam uma falta de seletividade dos compostos por diferentes células, podendo provocar dano ao

hospedeiro (YUNES; CALIXTO; 2001). Por isso a importância da avaliação da atividade hemolítica e a capacidade das amostras de causar a ruptura dos eritrócitos.

O extrato cetônico, as frações clorofórmio e acetato de etila, em concentrações que variaram de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foram capazes de causar hemólise (GRÁFICO 1). Assim, as substâncias que podem ter um efeito negativo sobre a parede celular bacteriana, gerando uma atividade antimicrobiana, podem não possuir a capacidade de romper uma estrutura celular mais complexa como a bicamada lipídica do eritrócito. O mesmo ocorre com a fração hexano nas concentrações de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

GRAFICO 1 - COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO CETÔNICO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Scaptotrigona bipunctata* E O BRANCO



NOTA: EC – Extrato Cetônico; FH – Fração Hexano; FCI – Fração Clorofórmio; FAE – Fração Acetato de Etila. ns - não houve diferença estatística; *** - houve diferença estatística

Em relação ao óleo essencial, todas as concentrações causaram ruptura da membrana dos eritrócitos, porém a dose não alterou o potencial hemolítico. Tariku et al. (2011) encontraram resultados semelhantes em diferentes tipos celulares, quando expostos a óleos essenciais ricos em sesquiterpenos. Por serem hidrofóbicos, os óleos podem se agregar aos lipídeos de membrana, mudando sua estrutura, permitindo uma entrada maior de íons e um conseqüente extravasamento do conteúdo celular (YUNES; CALIXTO, 2001; MAZZARRINO et al., 2012).

A fração hexano em altas concentrações (>1000 µg/mL) apresentou a mesma atividade hemolítica dos óleos essenciais. Como foi discutido anteriormente, o solvente hexano possui alta afinidade por óleos e gorduras, e a justificativa do seu potencial equivale a do óleo essencial.

4.11 ENSAIO PRELIMINAR DE TOXICIDADE

O ensaio preliminar de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* leva em consideração a capacidade do extrato, frações e óleo essencial de causar letalidade frente a determinadas concentrações. O ensaio foi escolhido por se tratar de um método fácil, de rápida execução e baixo custo.

Para que uma amostra seja considerada tóxica, é necessário que os valores de DL₅₀ das amostras sejam inferiores a 1000 (µg/mL) (Meyer, 1982). Os resultados estão apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* E DL₅₀ UTILIZANDO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona bipunctata*

Amostra	Mortalidade/Concentração (µg/mL)			DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/mL)
	10	100	1000		
E.C.	0	1	3	>1000	--
F.H.	0	1	1	>1000	--
F.CL.	1	0	0	>1000	--
F. AE.	0	0	0	>1000	--
OE.	0	2	3	>1000	--
Metanol	0	1	0	>1000	--
Tween	0	0	1	>1000	--

NOTA: E.C. – Extrato Cetônico; F.H. – Fração Hexano; F.Cl. – Fração Clorofórmio; F.AE. – Fração Acetato de Etila, OE. – Óleo Essencial.

As amostras do extrato, frações e óleo essencial não apresentaram capacidade de causar letalidade em microcrustáceos, demonstrando que o uso pode ser seguro.

A atoxicidade de produtos vegetais torna viável seu uso em matérias primas para consumo humano e animal. Extratos vegetais e óleos essenciais, como os de orégano, artemísia e canela, estão sendo utilizados na indústria alimentícia com a finalidade de aumentar a vida de prateleira e como controle microbiológico (MURIEL-GALET et al., 2013; LLANA-RUIZ-CABELLO et al. 2015; ZHANG et al., 2017).

Além da importância na manutenção da segurança dos alimentos, os derivados vegetais, são utilizados como antioxidantes e conservantes naturais, insumos para o desenvolvimento de novas drogas, novos alimentos e produtos para consumo (YAM; TAKHISTOV; MILTZ; et al., 2005)

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que a própolis de *Scaptotrigona bipunctata* nas condições dos experimentos realizados:

- Apresenta um teor de cera, umidade e cinzas que atendem aos padrões de identidade e qualidade se comparados com legislação vigente para *Apis mellifera*, além de um elevado teor de lipídeos. A amostra não contém teores significativos de ácidos orgânicos, açúcares e betacaroteno;

- Os teores de elementos minerais podem suprir a ingestão diária de referência para ferro e manganês. Em relação aos contaminantes, a própolis demonstra ser segura para consumo, pois não atinge os valores considerados tóxicos de alumínio;

- A análise da composição química do extrato cetônico, fração clorofórmio e acetato de etila provenientes da própolis apontam ausência de ácidos fenólicos;

- Em relação a composição química do óleo essencial, foram identificados dezessete constituintes, destacando-se os monoterpenos: alfa-pineno, paracimeno e beta-pineno;

- Em relação às atividades biológicas, a composição química do extrato, frações e óleo essencial, as amostras não apresentam atividade antioxidante, fato justificado pelos baixos teores de betacaroteno e vitamina C e pela ausência de compostos fenólicos;

- A atividade antimicrobiana demonstra que as amostras são capazes de inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em especial o óleo essencial que apresenta uma concentração inibitória mínima de 1,25 µL/mL frente à *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*;

- O extrato cetônico, as frações clorofórmio, acetato de etila e hexano, esta última nas concentrações de 100 a 500 µg/mL não apresentam atividade hemolítica. Todas as concentrações do óleo essencial e a concentração de 1000 µg/mL da fração hexano causam ruptura dos eritrócitos;

- O ensaio preliminar demonstra a segurança do uso do extrato, frações e óleo essencial, sendo a DL₅₀ superior a 1000 µg/mL em todas as amostras, sendo considerada atóxica;

- A própolis de abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier, 1836) é promissora para estudos futuros, com aprofundamento sobre seu mecanismo de ação em relação às atividades biológicas. A atividade antimicrobiana observada e a baixa toxicidade das amostras, faz da própolis um insumo para criação de novos medicamentos, suplementos, alimentos e embalagens.

REFERÊNCIAS

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY(A.O.A.C). **Official Methods of Analysis**, 18th ed., Washington, D. C., 2005.

ARALDI, C.; COELHO, C. M. M.. PH do Exsudato na Avaliação da Viabilidade de Sementes de Araucaria angustifolia. **Floresta e Ambiente**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 426-433, set. 2015.

BAJALAN, I.; PIRBALOUTI, A. G. Variation in antibacterial activity and chemical compositions of essential oil from different populations of myrtle. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 61, p.303-307, nov. 2014.

BAJER, T. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from Epilobium parviflorum Schreb. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 100, p.95-105, jun. 2017.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by Melipona fasciculata Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 81, p.48-55, jul. 2016.

BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p.104-110, abr. 2013. Elsevier BV

BRASIL. Portaria nº 1138, de 13 de maio de 2011. **Denominação de origem no estado de minas gerais no âmbito da produção de própolis verde**. Instituto Mineiro de Agropecuária, 2011

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Atenção À Saúde. Departamento De Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, DF, p. 13, 2012.

BRITTON, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB**. 9; 1551–1558.

BROPHY, J. J. et al. The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*). **Biochemical Systematics And Ecology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.563-578, jul. 2000

BUSCH, V.M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 75, p.227-235, jan. 2017.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 15 out. 2015.

CAO, X. et al. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. **Phytomedicine**, [s.l.], p.327-345, jun. 2017.

CAPUCHO, C. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 11, p.3956-3962, nov. 2012.

CHRYSARGYRIS, A. et al. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 103, p.202-212, set. 2017

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition. M7-A8, 2009.

Conselho Federal de Nutricionistas. **Resolução CFN nº 402/2007**: Regulamenta a Prescrição Fitoterápica Pelo Profissional Nutricionista. Brasília, 2007. 4 p.

CONAMA. **Resolução CONAMA Nº 346**: Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários. BRASÍLIA, 2004.

COSTA, I. M. da et al. Supplementation with Herbal Extracts to Promote Behavioral and Neuroprotective Effects in Experimental Models of Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, [s.l.], p.327-345, 22 maio 2017. Wiley-Blackwell

COSTA, AJS, IMPERATRIZ-FONSECA. Intra- and interspecific nestmate recognition in *Scaptotrigona* workers (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Anais do IV Encontro sobre Abelhas** 283. Nogueira-Neto. 1970.

CUESTA-RUBIO, O. et al. Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 120, p.177-183, jul. 2017.

DJERRAD, Z.; KADIK, L.; DJOUAHRI, A. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 74, p.440-449, nov. 2015.

DUTRA R.P., et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, 557-562, 2008.

ESCRICHE, I. et al. Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 226, p.61-68, jul. 2017.

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.217-227, jun. 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)&WHO (World Health Organization) (1997). **Carbohydrates in human nutrition**. <http://www.fao.org/docrep/w8079e/w8079e00.htm>. Acessado em junho de 2015.

FERNANDES, F. H. et al. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 2, p.1482-1488, 2015.

FLORES, R. M.; DOSKEY, P. V.. Evaluation of multistep derivatization methods for identification and quantification of oxygenated species in organic aerosol. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1418, p.1-11, out. 2015

FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], p. 1-10, jun. 2017

FISHER, K; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, Orange and bergamot essential oil and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, p.378-381, 2007.

FOO, S. C. et al. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 241, p.175-183, jan. 2017.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 62, p.119-132, abr. 2017.

GULLÓN, B. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from the refining of autohydrolysis liquors of vine shoots. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 107, p.105-113, nov. 2017.

HADJILOUKA, A. et al. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 77, p.510-516, abr. 2017

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, cap. 4, 2008.

KARDAR, M. N. et al. Characterisation of triterpenes and new phenolic lipids in Cameroonian propolis. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 106, p.156-163, out. 2014.

KERR, W. E., CARVALHO, G. A. E NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu - biologia, manejo e conservação. **Manejo da vida silvestre**, v. 2, p. 144, 1996.

KISHIDA, E. et al. Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on the oxygen consumption. **J. Agric. Food Chem.** 41:1–4. 1993.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in própolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.367-369, 1997.

LAROCA, S., CURE, J. R. & BORTOLI,. A associação de abelhas silvestres (Hymenoptera, Apoidea) de uma área restrita no interior da cidade de Curitiba (Brasil): uma abordagem biocenótica. **Dusenía** 13 (3): 93-117, 1982.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 101, p.36-47, mar. 2017.

LOPES, T. V. C. et al. Compilation of mineral data: Feasibility of updating the food composition database. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 39, p. 87-93, maio 2015.

LUSTOSA, S.R., et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, 447-454, 2008.

MACRAE, R. **HPLC: food analyses**. London, Academic Press, 1998. 77p.

MAPELLI-BRAHM, P. et al. Bioaccessibility of phytoene and phytofluene is superior to other carotenoids from selected fruit and vegetable juices. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 229, p.304-311, ago. 2017.

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

MARUCCI, L. et al. Double-blind randomized phase III study comparing a mixture of natural agents versus placebo in the prevention of acute mucositis during chemoradiotherapy for head and neck cancer. **Head & Neck**, [s.l.], p.10-20, 31 maio 2017. Wiley-Blackwell.

MAZZARRINO, G. et al. Salmonella enterica and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, [s.l.], v. 50, p.794-803, abr. 2015.

MDITSHWA, A. et al. Postharvest factors affecting vitamin C content of citrus fruits: A review. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 218, p.95-104, abr. 2017.

MESSINA, G. et al. The psychoneuroendocrine-immunotherapy of cancer: Historical evolution and clinical results. **Journal Of Research In Medical Sciences**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.45-58, 2017.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, [s.l.], v 72, n. 3, p. 405-414, 2005

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.45, p.31, 1982.

METO, A.. Anti-Inflammatory and Regenerative Effects of Albanian Propolis in Experimental Vital Amputations. **European Journal Of Prosthodontics And Restorative Dentistry**, [s.l.], n. 24, p.145-151, 1 set. 2016

MORAIS, S. M. de M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MORSHELOO, M. R. et al. Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 76, p.565-573, dez. 2015.

MRABET, A. et al. Phenolic extracts obtained from thermally treated secondary varieties of dates: Antimicrobial and antioxidant properties. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 79, p.416-422, jun. 2017

MURIEL-GALET, V. et al. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. **Food Control**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.137-143, mar. 2013.

NAIK, D. G. et al. Essential Oil of Indian Propolis: Chemical Composition and Repellency against the Honeybee *Apis florea*. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.649-657, abr. 2013.

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

OGILVIE, J. E.; FORREST, J. R. K. Interactions between bee foraging and floral resource phenology shape bee populations and communities. **Current Opinion In Insect Science**, [s.l.], v. 21, p.75-82, jun. 2017.

OBIANG-OBOUNOU, B. W.; RYU, G. H. The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 4, p.4166-4170, dez. 2013.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. de; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods**. London: Academic Press, p. 251, 1978.

OSÉS, S. M. et al. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 196, p.1215-1223, abr. 2016.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 19, p.741-760, nov. 2006.

PALAZUELOS BALLIVIAN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. Oikos, São Leopoldo Oikos, p. 187, 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. **Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas**. 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

PARASCHOS, S. et al. Quality profile determination of Chios mastic gum essential oil and detection of adulteration in mastic oil products with the application of chiral and non-chiral GC–MS analysis. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 114, p.12-17, out. 2016

PATEL, J. et al. Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. **Integrative Medicine Research**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 94-101, jun. 2015.

PAULO, M.G. et al. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and beta-carotene. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol 21, n.2, p.399-406, 1999.

PEREIRA, A. D. S. et al. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quimica Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PINO, J. A. et al. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. **Journal Of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.53-56, jan. 2006.

POMA, G. et al. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 100, p.70-79, fev. 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p.337-341, 1999.

PROBST, I. S. et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 2, p.1678-1781, fev. 2011.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, maio 1999.

REIS, A. S. et al. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at -15 °C. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], in press, maio 2016.

RIGHI, A. A.. **Perfil Químico de Amostras de Própolis Brasileiras**. Dissertação apresentada no Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, 2008.

RIOS, N. et al. Chemical composition of essential oil of *Apis mellifera* propolis from Falcon State, Venezuela. **Emirates Journal Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.639-645, 2014.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. Fitoterapia na Saude da Familia. In: Sociedade Brasileira de Medicina de Familia e Comunidade (Org.). **Programa de Atualização em Medicina de Família e Comunidade (PROMEF)**. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2011. p. 31-65.

RODRIGUEZ-AMAYA D.N. (2001). **A guide to carotenoid analysis in foods**. 1ª.Ed.. Wahsington: ILSI Press

RUFATTO, L. C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], p.1-12, jun. 2017

SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], p.327-345, maio 2017

SALAS, A.L. et al. Biological activities of polyphenols-enriched propolis from Argentina arid regions. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.27-31, jan. 2016.

SALOMÃO, K. et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, Mai 2008.

SAWAYA, A C H F. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees. **Journal Of Apiprodukt And Apimedical Science**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.37-42, 1 abr. 2009

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

SIENIAWSKA, E. et al. Antimicrobial efficacy of Mutellina purpurea essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 51, p.152-157, nov. 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: 6ªEd. UFRGS, 2007.

SILVA, R. A. da et al. Physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the extracts propolis of the Paraiba, Brazil. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, nov./dez. 2006.

SILVA, D. V. da et al. **Abelhas-sem-ferrão e espécies vegetais com potencial apícola em quintais agroflorestais do acre**. 2012. Disponível em: <<http://www.sct.embrapa.br/cdagro/tema01/01tema76.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza Online**, Online, v. 3, n. 3, p.146-152, set. 2012.

SILVA, P. G. F. D. E SERRÃO, J. E. Nutritive value and apparent digestibility of beecollected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 31, p. 39-45, 2000.

SOLORZANO, E. R. et al. Use of a LC-DAD-QTOF system for the characterization of the phenolic profile of the argentinean plant *Zuccagnia punctata* and of the related propolis: New biomarkers. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 33, p.425-435, jun. 2017.

SOLTANI, E. et al. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 62, p.57-67, mar. 2017.

SOUZA, E L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare*L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**,v. 18, p. 409-413, 2007.

SOUZA, E. A. et al. Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.396-401, jun. 2016.

TAJKARIMI, M. M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199 - 1218, 2010.

TAGHIZADEH, M. et al. Sub-chronic oral toxicity of *Cuminum cyminum* L.'s essential oil in female Wistar rats. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 88, p. 138-143, ago. 2017.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D. et al. Antiradical potential of phenolic compounds fingerprints of propolis extracts: DFT approach. **Computational And Theoretical Chemistry**, [s.l.], v. 1066, p.7-13, ago. 2015.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Ispn, 2012. 100 p.

VIT, P. et al. Ecuadorian honey types described by Kichwa community in Rio Chico, Pastaza province, Ecuador using Free-Choice Profiling. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.384-387, maio 2017.

YAMAMOTO, D.Y.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. E. E. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO MEL DE *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae, Apinae) DO MUNICÍPIO DE LUIZ ANTÔNIO, SÃO PAULO, BRASIL. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 23, n. 1, p.89-93, nov. 2007.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. **Journal Of Food Scienc.** [s.i.], p. 0-0. dez. 2005.

YIN, R.; ULM, R. How plants cope with UV-B: from perception to response. **Current Opinion In Plant Biology**, [s.l.], v. 37, p.42-48, jun. 2017.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a otica da quimica medicinal moderna**. Chapecó - Santa Catarina: Argos, 2001. 500 p.

WANG, Y. et al. Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS. **Plant Science**, [s.l.], v. 262, p.91-102, set. 2017

WASSEL, M. O.; KHATTAB, M. A.. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.387-392, jul. 2017

ZHANG, Z. et al. Evaluation of the sub-chronic toxicity of a standardized flavonoid extract of safflower in rats. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 85, p.98-107, abr. 2017.