



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

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA ABELHA *Plebeia* aff.
flavocincta NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ-RN
2016

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA ABELHA *Plebeia aff.*
flavocincta NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE**

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

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista -
UFERSA

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas
- UFERSA

MOSSORÓ-RN
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ
Setor de Informação e Referência

S586q Silva, Jardel Bezerra da.

Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis produzida pela abelha *Plebeia aff. flavocincta* no semiárido do Rio Grande do Norte / Jardel Bezerra da Silva. - Mossoró, 2016.
62f: il.

Orientador:Dr. Jael Soares Batista
Co-Orientador:Dr. Carlos Iberê Alves Freitas

Dissertação (MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

1. Abelhas. 2. Geoprópolis. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antibacteriana. 5. Cicatrização. I. Título

RN/UFERSA/BOT/015

CDD 595.799

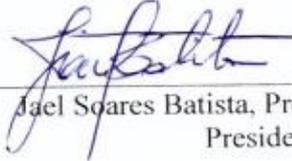
JARDEL BEZERRA DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA ABELHA *Plebeia* aff.
flavocincta NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE**

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

Defendida em: 18 / 02 / 2016.

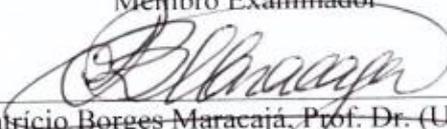
BANCA EXAMINADORA



Jael Soares Batista, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



Carlos Iberê Alves Freitas, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Patrício Borges Maracajá, Prof. Dr. (UECG)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JARDEL BEZERRA DA SILVA nasceu no dia 29 de setembro de 1987, na cidade de Santo André, estado de São Paulo, Brasil. cursou o ensino médio concomitantemente com técnico agrícola, com habilitação em zootecnia na área de agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Iguatu-CE (EAFI-CE), iniciando ambos os cursos em março de 2003 e concluindo em abril de 2006. Ingressou no ensino superior em março de 2007, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no curso de zootecnia, no qual permaneceu até dezembro 2009, após transferência iniciou em março de 2010 o curso de Medicina Veterinária, no qual efetivamente exerceu atividades de iniciação científica, ensino e extensão no decorrer de toda sua graduação, como bolsista no Programa de Iniciação Científica Institucional (PICI), Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC) e Programa de Educação Tutorial-PET Produção Animal. Obteve o título de Médico Veterinário em outubro de 2013. Passou a ser aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA em março de 2014, sobre orientação do professor Doutor Jael Soares Batista. No transcurso do mestrado, foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), realizou estágio em docência nas disciplinas de Bioética e Medicina Legal, Patologia Geral e Patologia Veterinária nas turmas do curso de Medicina Veterinária. Estagiou no laboratório de fitoquímica da Universidade de São Paulo no período de novembro a dezembro de 2014. Desenvolveu pesquisas sobre análise da composição química e atividades farmacológicas da própolis e geoprópolis de abelhas nativa do semiárido nordestino.

A todos que de uma forma direta ou indireta
contribuíram para a conclusão de mais uma
fase importante e tão esperada na minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que vem me proporcionando saúde, perseverança, força e dedicação para alcançar meus objetivos;

Aos meus pais, por terem oferecido desde infância educação e os ensinamentos básicos que serviram de pré-requisito para a conclusão de mais uma importante etapa na minha vida;

Aos meus familiares, tio Antônio Helder, tia Lucia Oliveira, primo Roberto Oliveira e prima Joyce Oliveira por oferecer o conforto de seu lar no período que estive realizando minhas análises;

A todos os meus professores orientadores em minha vida acadêmica, em destaque a Débora Andreia Façanha de Moraes, Luiz Januário Magalhães Aroeira, Jesane Alves de Lucena, em especial a Jael Soares Batista que nos últimos anos esteve sempre contribuindo com total dedicação para a evolução de nossas pesquisas;

Aos anjos que ajudaram, ensinaram e permitiram que este trabalho fosse realizado e concluído. Entre vários não poderia esquecer os professores Moacir Franco de Oliveira, Jean Berg, Antônio Salatino, Marco Aurélio, Carlos Iberê Alves Freitas, Dejair Message, Wesley Adson e meus amigos Radan Elvis Matias de Oliveira, André Vinicius Nunes Silva, Maria Carla Silva Campêlo, Kizzy Millenn de Freitas Mendonça, Caio Sérgio Santos e Francisco Vicente de Andrade Neto.

A todos os doutores que contribuíram para meu aprendizado durante o cumprimento das disciplinas;

As instituições de fomento à pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de apoio à pesquisa do Rio Grande do Norte (FAPERN), pelos auxílios financeiros e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA;

A minha linda namorada Pâmela Samara Soares Dantas, que se tornou uma importante parceira, estando sempre ao meu lado e contribuindo com sua atenção e agradável companhia, assim como sua família que sempre me recepcionou e me acolheu em inúmeros momentos de maneira respeitosa e agradável;

A todos os componentes da banca avaliadora por terem aceitado o convite para participar da minha apresentação e a todos os amigos presentes nesse momento de conclusão de mais uma importante etapa da minha vida.

QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA ABELHA *Plebeia* aff. *flavocincta* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE

SILVA, Jardel Bezerra da. **Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis produzida pela abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* no semiárido do Rio Grande do Norte**. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró - RN, Brasil, 2016.

RESUMO: O estudo objetivou avaliar a geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta* produzida no Rio Grande do Norte-Brasil, através do estudo das atividades farmacológicas, características sensoriais e requisitos físico-químicos. Investigou-se a atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), antibacteriana, através do método de difusão em ágar e atividades cicatrizantes, através da indução de feridas cirúrgicas experimentais em *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar. Quantificou-se os teores de fenóis e flavonoides totais através dos métodos Waterman e Mole, Woisky e Salatino, respectivamente. As amostras de geoprópolis apresentaram consistência entre maleável pegajoso a rígido resinoso e nos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis identificou-se 06 distintos tipos de aroma, coloração âmbar, marrom escuro, esverdeado e incolor. O sabor variou do amargo ao característico forte e adocicado. Todas as amostras dos extratos apresentaram-se com aspecto líquido, límpido e homogêneo. O teor de fenóis totais variou entre $0,00 \pm 0,00$ e $9,4 \pm 0,28\%$ (m/m), o teor de flavonoides totais $0,0005 \pm 0,00003$ e $0,0220 \pm 0,00037\%$ (m/m). A capacidade antioxidante acima de 90% foi observada em 05 amostras. Os extratos foram considerados eficazes no que tange a atividade antimicrobiana, pois das 08 amostras testadas, 05 promoveram halos de inibição $\geq 9\text{mm}$ frente todas às cepas testadas. No ensaio de cicatrização do grupo experimental, o creme base 20% de geoprópolis de *P. aff. flavocincta* diminuiu os sinais de inflamação e estimulou a produção de colágeno, acelerando o processo de re-epitelização, apresentando diferença estatística significativa nas áreas das feridas a partir do 9º dia e total cicatrização no 16º dia. Conclui-se que a geoprópolis da *P. aff. flavocincta* produzidas no semiárido do RN, pode ser usada como princípio alternativo e natural nas atividades antibacteriana, cicatrizante e antioxidante, caracterizando por ser fonte de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Abelha. Geoprópolis. Atividade antioxidante. Atividade antibacteriana. Cicatrização.

**QUANTIFICATION OF PHENOLS, TOTAL FLAVONOIDS AND
PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF PROPOLIS PRODUCED BY BEES *Plebeia*
aff. flavocincta IN NORTHERN RIO GRANDE DO SEMIARID**

SILVA, Jardel Bezerra da. **Quantification of phenols, total flavonoids and pharmacological activities of propolis produced by bees *Plebeia aff. flavocincta* in norther Rio Grande do semiarid**. 2016. 60f. Dissertation (Master's degree in Animal Sciences) - Graduate Program in Animal Sciences, Federal Rural University of the Semiarid (UFERSA), Mossoró – RN, Brazil, 2016.

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the geopropolis bees *Plebeia aff. flavocincta* produced in Rio Grande Norte- Brazil, through the study of pharmacological activities, sensory characteristics and physical and chemical requirements. Investigated the antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), antibacterial, through the method of diffusion in agar and healing activity, by inducing experimental surgical wounds *Rattus norvegicus* in Berkenhout, 1769 Wistar. Quantified if the contents of total phenols and flavonoids through the Waterman and Mole methods, Woisky and Salatino, respectively. Samples of geopropolis showed consistency between the soft sticky resinous hard and hydroalcoholic extracts of geopropolis we identified 06 different types of scent, amber color, dark brown, green and colorless. The taste ranged from bitter to sweet and strong characteristic. All samples of the extracts showed up with liquid aspect, clear and smooth. The total phenolic content varied between $0,00 \pm 0,00$ and $9,4 \pm 0,28\%$ (m/m), the total flavonoid content of $0,0005 \pm 0,0220$ and $0,00003 \pm 0,00037\%$ (m/m). The antioxidant capacity of over 90% was observed in 05 samples. The extracts were found to be effective with respect to antimicrobial activity because of the 08 samples tested, 05 promoted inhibition zones ≥ 9 mm front of all the strains tested. In wound healing assay of the experimental group, the base cream 20% geopropolis *P. aff. flavocincta* decreased the signs of inflammation and stimulate collagen production, accelerating the process of re-epithelialization, with no statistically significant difference in the areas of the wounds from the 9th day and complete healing on the 16th day. It follows that the geopropolis *P. aff. flavocincta* produced in semiarid RN, can be used as an alternative and natural principle in antibacterial activities, antioxidant and healing, characterized by a source of phenolic compounds.

Keyword: Bee. Geopropolis. Antioxidant activity. Antibacterial activity. Healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição geográfica da espécie *Plebeia flavocincta* (Cockerell, 1912) no Brasil 17
- Figura 2 - *Plebeia* aff. *flavocincta*, popularmente conhecida por abelha mosquito, obtida na região do semiárido Norte Rio-grandense 17
- Figura 3 - Amostra de geoprópolis produzida por abelhas mosquito *Plebeia* aff. *flavocincta*, obtida na região do semiárido Norte Rio-grandense 29
- Figura 4 - Delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante, fluxograma descritivo conforme as etapas e metodologia utilizada 35
- Figura 5 - Fluxograma metodológico simplificado 36
- Figura 6 - Curva padrão, com sua respectiva equação da reta, para o ácido tânico e quercentina 39
- Figura 7 - Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólicos de geoprópolis de abelha *Plebeia* aff. *flavocincta*, sobre *Staphylococcus aureus* (S.A); *Staphylococcus epidermidis* (S.E); *Escherichia coli* (E.A); *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) 43
- Figura 8 - Aspecto macroscópico de ferida cutânea pós-cirúrgico em *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, grupo experimental (GE), no 3º dia (A); grupo controle, no 3º dia (B); grupo experimental, no 7º (C); grupo controle, no 7º dia (D); grupo experimental, no 14º dia (E); grupo controle, no 14º dia (F) 44
- Figura 9 - Aspecto histológico das feridas cutâneas, (A) ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do Grupo experimental (GE), nota-se infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares discreto e em (B) Grupo controle, infiltrado inflamatório de células intenso. Obj. 20x. Barra de escala = 200µm 46
- Figura 10 - Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica, (C) no Grupo experimental (GE) e (D) no Grupo Controle, nota-se presença de tecido de granulação com vasos sanguíneos e células mono nucleares. Obj. 5x. Barra de escala = 500µm. (E) Nota-se, presença de maior quantidade de fibroblastos em (GE) e menor quantidade de fibroblasto em (GC) (F). Obj. 20x. Barra de escala = 200µm 47
- Figura 11 - Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução pós-cirúrgica, (G) Grupo Experimental (GE), nota-se maior quantidade de fibras colágenas e menor quantidade no Grupo Controle (H).Obj. 20x. Barra de escala = 200µm 47

Figura 12 - Gráfico do valor médio \pm desvio padrão das áreas das feridas em animais do Grupo Experimental (GE) e Grupo Controle (GC) 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Consistência das oito amostras brutas de geoprópolis produzido por *Plebeia* aff. *flavocincta* e respectivas características sensoriais dos extratos hidroalcoólicos 37

Tabela 2 - Extrato seco % (m/v), teor de fenóis totais % (m/m), teor de flavonoides totais % (m/m) e atividade antioxidante % e seus respectivos desvio padrão dos oito extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* 38

Tabela 3 - Correlação entre extrato seco, atividade antioxidante %, fenóis totais % (m/m) e flavonoides totais % (m/m) dos oito extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* 40

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão dos valores dos halos de inibição, em milímetro de diferentes diluições (%) de extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, pelo método de difusão em ágar 41

Tabela 5 - Valores de média \pm desvio padrão dos achados histológicos dos animais, pertencentes aos Grupos Controle (GC) e Experimental (GE) nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 GEOPRÓPOLIS	15
3.2 ABELHA <i>Plebeia aff. flavocincta</i>	16
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	19
3.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	20
3.4.1 Atividade antibacteriana	20
3.4.2 Atividade antioxidante	23
3.4.3 Atividade cicatrizante	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÕES DAS AMOSTRAS	29
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE GEOPRÓPOLIS	30
4.3 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS EXTRATOS	30
4.3.1 Requisitos físico-químicos	30
4.3.1.1 Determinação do extrato seco das amostras	30
4.3.1.2 Quantificação de fenóis totais	31
4.3.1.3 Quantificação de flavonoides totais	31
4.4 AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	31
4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	31
4.4.2 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	32
4.4.3 Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	33
4.4.3.1 Formulação do creme	33
4.4.3.2 Animais utilizados e grupos experimentais	33
4.4.3.3 Protocolo anestésico, confecção das feridas experimentais e aplicação tópica do creme	34
4.4.3.4 Avaliação macroscópica e morfométrica das lesões	34
4.4.3.5 Biopsia das feridas e avaliação histológicas	34
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

Cerca de aproximadamente 20.000 espécies de abelhas são conhecidas no mundo, sendo que no Brasil estima-se que existam mais de 200 espécies nativas e muitas outras ainda não descritas, entre as quais se destacam as abelhas sociais (meliponídeos), também chamadas popularmente por nativas, indígenas e/ou sem ferrão (SILVEIRA et al., 2002; MICHENER, 2007).

Atualmente, a meliponicultura é uma prática que alcança maior destaque nas regiões Norte e Nordeste, sendo em algumas ocasiões atividade econômica complementar bem estabelecida, pois seus produtos (mel, pólen, própolis e geoprópolis) bastante apreciados pela população local devido seus valores nutricionais e terapêuticos, portanto, valorizados economicamente (SOUZA et al., 2004). A meliponicultura é uma atividade importante não só pelo papel social e econômico que representa, mas também pelo papel ecológico na manutenção de plantas nativas (SILVEIRA et al., 2002; KOLING; MORETTO, 2010). As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (KERR et al., 1996).

A própolis é elaborada pelas abelhas, que utilizam como matéria prima uma ampla gama de substâncias coletadas de diferentes partes das plantas na flora regional, agregando secreções salivares, cera e pólen para produzir um material de natureza resinosa e com variada coloração, textura e consistência (FUNARI; FERRO, 2006). É utilizada na construção e vedação da colmeia, como também para embalsamar insetos intrusos daninhos, prevenindo a decomposição e a proliferação de microrganismos que possam infectar a colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997; BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000; ZUNINI et al., 2010; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

Na produção da geoprópolis, diferentes espécies de abelhas sem ferrão, na qual podemos incluir a abelha mosquito (*Plebeia* aff. *flavocincta*), incorporam na composição barro ou terra, além dos componentes comumente encontrados na própolis (SAWAYA et al., 2011; CUNHA et al., 2013).

As resinas vegetais são relevantes componentes presentes na geoprópolis, mas a presença de terra assume e confere característica peculiar ao produto. Demonstra aroma característico, podendo ser observado consideráveis variações em sua coloração, composição química, concentração de fenóis e flavonoides totais. Estes fatores são determinados pela influência da vegetação visitada pelas abelhas nas proximidades do enxame, pelo período da

coleta da resina, das variações climáticas e as informações genéticas das abelhas rainha (PARK et al., 2002; SANTOS et al., 2003; FREITAS et al., 2008; LUSTOSA et al., 2008).

Os flavonoides e os ácidos fenólicos presentes na composição da própolis ou geoprópolis, atuam em diversos processos fisiológicos, contribuindo nos processos de cicatrização de feridas, como antioxidantes, apresentando ainda atividade antimicrobiana (MENEZES, 2005). Os ácidos fenólicos presentes na própolis brasileira são mais abundantes quando comparados aos flavonoides. Essa característica contribui para o sucesso e a grande preferência do mercado internacional por este produto (MARCUCCI, 1996b; PARK et al., 2002a; PARK et al., 2002b; ORSI et al., 2005; FUNARI; FERRO, 2006).

No Brasil e em diversos países as atividades farmacológicas e composição química da própolis tem sido foco de investigação (LUSTOSA et al., 2008; BARTH et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

O interesse na pesquisa pelas inúmeras propriedades terapêuticas da própolis e geoprópolis é crescente. Sendo utilizados extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos em estudados frente a sua avaliação farmacognóstica, atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (DUTRA et al., 2008; SOUZA et al., 2013).

Porém são inexistentes pesquisas que envolvam estudos voltados para composição química e atividades farmacológicas de geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta*. No entanto já existem pesquisas que relataram a composição química e atividade biológica da geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão. (FIANCO et al., 2013).

No presente momento, para a geoprópolis e extrato de geoprópolis, não existe especificações estabelecidas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, sendo necessário se basear pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Própolis e também de Extrato de Própolis presente na normativa nº 03, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Especificações referentes às características sensoriais e físico-químicas são consideradas nas análises (BRASIL, 2001).

A realização de pesquisa a respeito da constituição química da geoprópolis se torna indispensável para relacionar os compostos bioativos presentes em sua formulação, com suas atividades farmacológicas testadas, ampliando o respaldo da qualidade desses produtos e oferecendo garantia aos consumidores que fazem uso em sua rotina. Assim, este trabalho objetivou analisar atividades farmacológicas e características sensoriais e físico-químicas de oito extratos hidroalcoólicos de geoprópolis produzida pela abelha *P. aff. flavocincta* no semiárido do Rio Grande do Norte.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta* produzida na região do semiárido norte rio-grandense, através do estudo das atividades farmacológicas, características sensoriais e requisitos físico-químicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar o potencial antibacteriano *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta* em bactérias gram positiva (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) e gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*);

b) Analisar atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta*;

c) Investigar atividade cicatrizante do creme de geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta* *in vivo*;

d) Quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais dos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta* *in vitro*;

e) Verificar requisitos físico-químicos e características sensoriais dos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta*;

f) Sugerir como referencia para consulta de aspectos físicos químicos presente na geoprópolis e seus extratos hidroalcoólicos produzido por abelhas *Plebeia* aff. *flavocincta*.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis é produzida pelas abelhas nativas pertencentes à tribo Meliponini, no qual é utilizada na construção da entrada e das divisórias no local de nidificação da espécie, diferindo da própolis por ser produzida pelas abelhas sociais sem ferrão. A elaboração da geoprópolis é possível a partir da utilização de terra e/ou barro, além de resinas de plantas e cera (SAWAYA et al., 2011; CUNHA et al., 2013).

As abelhas produzem a própolis a partir da coleta de cera, substâncias de natureza resinosa e de compostos voláteis oriundos de diferentes partes das plantas, sendo o artifício de defesa mais importante utilizado contra microrganismos patogênicos, na mumificação de invasores, na manutenção de danos à colméia e na assepsia dos locais de postura da abelha rainha (BANKOVA, 2005). A geoprópolis pode apresentar coloração característica do barro presente na região e consistência dura. Assim como a própolis, a geoprópolis também pode ser usada para mumificação de inimigos e ou espécies competidoras (ALVES et al., 2007).

Uma enorme gama de fatores interfere na composição química da própolis, como a flora local, clima, sazonalidade, variabilidade genética, espécie da abelha e reações geradas através das secreções das glândulas hipofaringianas das abelhas, podendo acarretar consideráveis variações em sua composição (PARK et al., 2002; CARDINAULT et al., 2012; NUNES; GUERREIRO, 2012).

A formação típica da própolis é de aproximadamente 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de uma ampla gama de diferentes substâncias (BURDOCK, 1998). Possuem em sua composição minerais (ferro, cálcio, zinco, cobre, manganês), vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, e do grupo B), flavonoides, compostos aromáticos, ésteres fenólicos e seus derivados (CARDINAULT et al., 2012). Apresenta uma coloração com diferentes tons, do marrom a verde, amarelo e vermelho, com sabor resinoso e odor aromático (SALATINO et al., 2011).

Mesmo que uma expressiva quantidade de pesquisas sobre própolis tenha sido publicada, grande parcela refere-se à própolis de *Apis mellifera*, abelha oriunda da África. No território brasileiro além da *A. mellifera*, que lidera em produção de mel e própolis, há centenas de espécies de abelhas nativas, que são também conhecidas por abelhas sem ferrão ou indígenas. Essas produzem cerúmen, utilizando cera e própolis ou geoprópolis

(SILVEIRA et al., 2002; BEZERRA et al., 2015).

O uso da própolis de forma medicinal é feito por diferentes povos há milênios (GREGORY et al., 2002). Este produto natural tem promovido uma ampla relação com numerosas propriedades, tais como antimicrobiano, anti-inflamatório e até mesmo antiácido, que foi provado pelo costume popular e vem sendo fortemente preservado em várias comunidades da América Latina. Entre uma série de atividades biológicas que a própolis apresenta, durante a última década foram reportadas e confirmadas cientificamente, a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SAWAYA et al., 2011; SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT et al., 2012; FABRIS et al., 2013). No entanto são raras as pesquisas sobre uso de produtos a base de própolis, no aspecto clínico (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Quanto à geoprópolis das abelhas Meliponini, ainda é muito baixo o número de pesquisas, porém destes, alguns estudos já demonstram bons resultados quanto suas ações imunomoduladora e antimicrobiana (VELIKOVA et al., 2000; LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012a; CUNHA et al., 2013). No que diz respeito à geoprópolis da abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* é inexistente relatos, estudos ou dados referentes a pesquisas em relação a atividades farmacológicas, características sensoriais e físico-químicas.

3.2 ABELHA *Plebeia* aff. *flavocincta*

A abelha *P.* aff. *flavocincta* é classificada de forma taxonômica no Reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, família Apidae, e gênero *Plebeia*, que apresenta 39 espécies diferentes (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2011). As abelhas da subtribo Meliponina conhecidas como abelhas indígenas, abelhas sem ferrão ou ainda, meliponíneos, são sociais nativas, de ampla distribuição geográfica, com mais de 300 espécies descritas e muitas outras ainda não descritas (SILVEIRA et al., 2002).

O pequeno gênero *Plebeia* contempla abelhas sem ferrão e foi anteriormente incluído no gênero *Trigona*, o mesmo ocorreu com gênero *Schwarziana*, que foi separado em uma categoria nova e distinta após o trabalho de 1943 do padre Jesus Santiago Moure, referencia na taxonomia de abelhas nativas (MICHENER, 2007).

A abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* ainda não foi catalogada como espécie, recebendo aff. em seu nome científico, por apresentar grande semelhança e afinidade em suas

características morfológicas com *Plebeia flavocincta* (Cockerell, 1912), espécie já descrita, a qual apresenta distribuição na região neotropical do Brasil, estando presente nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Figura 1) (CAMARGO; PEDRO, 2013).

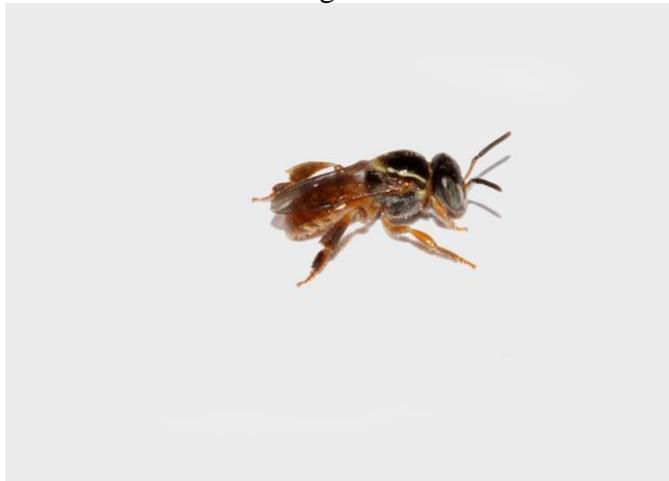
Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie *Plebeia flavocincta* (Cockerell, 1912) no Brasil



Fonte: moure.cria.org.br/catalogue?id=34997

A abelha *P. aff. flavocincta*, é considerada adaptada a condição semiárida nordestina, estando presente no território Norte Rio-grandense (Figura 2).

Figura 2 – *Plebeia aff. flavocincta*, popularmente conhecida por abelha mosquito, obtida na região do semiárido Norte Rio-grandense



Fonte: CARVALHO (2014)

Para manutenção da população dessas abelhas, existe dependência direta das características fenológicas presente no bioma Caatinga. A principal origem botânica das fontes de recursos visitadas pela *P. aff. flavocincta* na Floresta Nacional do Assú – RN (FLONA) são as espécies *Mimosa tenuiflora*, *Mimosa arenosa*, *Senna sp.* e *Chamaecrista*, apontando as subfamílias Mimosoideae e Caesalpinioideae como as mais importantes para o forrageamento (COSTA et al., 2013).

Em pesquisas realizadas por Pereira et al (2011), envolvem abelhas indígenas criadas no Rio Grande do Norte, observou-se que o gênero *Plebeia* apresentou uma frequência de distribuição geográfica no estado do Rio Grande do Norte, de 4,9%, sendo a segunda espécie com melhor distribuição. A espécie *P. mosquito* na região Oeste potiguar foi também a segunda mais encontrada, apresentando uma frequência de distribuição geográfica de 2,20%.

Inicialmente desenvolvida pelos índios, a meliponicultura foi ao longo do tempo praticado de forma tradicional por pequenos e médios produtores, principalmente por aqueles que usavam mão de obra familiar nas atividades agropecuárias em diversas regiões do Brasil (ALVES et al., 2007).

A meliponicultura é uma prática de fácil manejo, apresentando uma serie de vantagens por ser sustentável, atuando na conservação das abelhas e de seus habitats, na polinização da flora local, além de favorecer a restauração ambiental através da preservação e plantio de árvores, que servem de locais de nidificação (FREITAS, 1999; ZANELLA; MARTINS, 2003).

A criação de abelhas nativas no semiárido do nordeste brasileiro vem aumentando, pois além do mel, também cresceu o interesse comercial pela produção e qualidade de outros derivados meliponícolas, tais como, a própolis, o geoprópolis e o pólen (SOUZA et al., 2004; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2006).

Fora a enorme contribuição como polinizadoras, às abelhas produzem produtos de grande interesse como a cera, mel e própolis ou geoprópolis, podendo ser evidenciado em alguns desses produtos propriedades biológicas (BRUENING, 1990). As características sensoriais, nutricionais e terapêuticas presente no mel desperta apreciação pela população local, estando juntamente com os enxames vendidos em troncos ou em cortiços, os produtos que mais gera interesse econômico (CÂMARA et al., 2004).

A meliponicultura é uma atividade importante não só pelo papel social e econômico que representa, mas também pelo papel ecológico na manutenção de plantas

nativas (SILVEIRA et al., 2002; KOLING; MORETTO, 2010), a exemplo, as abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (KERR et al., 1996).

Apesar dos poucos estudos sobre a própolis dos Meliponini, alguns trabalhos já indicaram bons resultados quanto às suas propriedades terapêuticas, como a própolis de abelhas africanizadas, esta também parece ser muito variável em sua composição química e dependente da flora e do clima local.

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Própolis de diferentes localidades apresentam em sua composição química uma grande diversidade de substâncias, com mais de duzentas já identificadas, dentre estas podemos incluir ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Essa considerável complexidade permite alguns autores afirmarem que a composição química heterogênea da própolis explicaria a sua eficácia, relacionando os flavonoides e os ácidos fenólicos, a uma enorme contribuição para as atividades biológicas da própolis (WALKER; CRANE, 1987; GREENAWAY et al., 1991; BONVEHÍ; COLL, 1994; MARKHAN et al., 1996; TAZAWA et al., 1998; MARCUCCI et al., 2000; BANKOVA et al., 2002; EL HADY; HEGAZI, 2002; KARTAL et al., 2002; PARK et al., 2002; PEREIRA et al., 2003; FUNARI; FERRO, 2006).

Para uma melhor compreensão da bioatividade que a própolis apresenta, é de suma importância aprofundar os conhecimentos a respeito dos componentes de interesse presentes nos extratos a serem testados nos estudos de atividade biológica (SFORCIN; BANKOVA, 2011), sendo diretamente ligadas essas atividades com os teores dos componentes químicos, que por sua vez, podem sofrer influência da flora local e da sazonalidade (SILVA et al., 2006). A diversidade na flora brasileira oferta condições favoráveis para uma grande variabilidade na composição química da própolis produzida em todo território nacional, caso não semelhante às condições europeias (CASTRO et al., 2007; NUNES; GUERREIRO, 2012).

Os compostos fenólicos encontrados na própolis estão entre os grupos mais relevantes que apresenta elevada atividades biológicas. Entre os compostos, destacam os flavonoides, que de acordo com a presença ou ausência de um anel central, de uma dupla ligação e de grupo hidroxila ligado ao anel, são classificados quimicamente (MARCUCCI et

al., 1998). Os flavonoides em conjunto com os ácidos carboxílicos modificados recebem título de componentes estratégicos, por serem atuantes na ação contra vários microrganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Os diferentes tipos de própolis de três regiões brasileira foram classificados de acordo com critérios de similaridade físico-química em doze grupos. De acordo com a pesquisa, foi evidenciado na região nordeste seis diferentes tipos de amostras de própolis, na região sudeste uma e na região sul cinco. Após análise para avaliar a composição qualitativa e quantitativa de flavonóides e compostos fenólicos das referidas amostras, foi verificado que houve grande variação qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos presentes nas amostras de própolis (na forma de extrato etanólico) provenientes das diversas regiões do Brasil. Nas amostras de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, existiu notória diferença qualitativa dos extratos, estando as amostras da região Sul e Sudeste com os maiores teores de compostos fenólicos (PARK et al., 2004).

A análise do perfil químico de extratos obtidos da planta *Baccharis dracunculifolia* por HPLC, comparados com as própolis oriundas da região sudeste do Brasil em forma de extratos, demonstraram incontáveis similaridade. Corroborando com essas evidências foi comparada as características químicas e biológicas de extratos de própolis verde com os de *B. dracunculifolia* através da espectroscopia de massas (BANKOVA et al., 1999; KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2002, 2004), ainda como *in vitro*, através da avaliação da atividade antimicrobiana (LEITÃO et al., 2004).

3.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

3.4.1 Atividade antibacteriana

Entre as propriedades farmacológicas que a própolis apresenta, a atividade antibacteriana se torna uma entre as mais esclarecidas. Comumente a sensibilidade das bactérias gram-positivas é maior do que as gram-negativas frente aos extratos de própolis (GONSALES et al., 2006; FERNANDES JÚNIOR et al., 2006; CARDINAULT et al., 2012).

Os diferentes mecanismos atribuídos à inibição do crescimento bacteriano podem ser dados pelo bloqueio da divisão celular, desorganização do citoplasma por inibição da síntese de proteína, ou ainda, pela inibição do processo adesão (SCAZZOCCHIO et al., 2006; CAYEUX e SERT, 2012).

O efeito sinérgico do extrato hidroalcoólico da própolis da região sudeste foi observado com a administração concomitante de antibióticos contra *Salmonella typhi* (ORSI et al., 2006). A potencial atividade contra isolados de diferentes sorovares de *Salmonella* foi comprovada neste mesmo extrato, constatando que *Salmonella typhimurium* demonstrou maior resistência (ORSI et al., 2007).

A ação contra *Paenibacillus larvae*, um agente gram-positivo que forma esporos e ataca os estágios larvares das abelhas provocando a loque americana, foi comprovada utilizando os extratos da própolis verde da região sudeste (BASTOS et al., 2008). Em estudos realizados contra *Staphylococcus aureus*, extratos etanólicos de própolis vermelha inibiram crescimento contra esse microrganismo gram positivo (DAUGSCH et al., 2008). Frações do extrato apresentaram-se biologicamente mais ativas do que o extrato etanólico contra esta mesma bactéria (CABRAL et al., 2009).

As frações hexânica e clorofórmica apresentaram respectivamente maior atividade sequestradora de radicais livres e maiores potencial antibacteriano. Favorecendo com que os autores concluam que as duas atividades não são devido a um efeito sinérgico entre os vários componentes do extrato etanólico. Após o isolamento da fração clorofórmica obtida a partir do extrato metanólico da própolis vermelha, dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina) foram avaliadas quanto a sua ação antibacteriana contra *S. aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*, levando aos autores concluir que isoliquiritigenina foi o composto com maior atividade (OLDONI et al., 2011).

Bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*) e gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium* e *Escherichia coli*), foram sensíveis a um extrato metanólico de própolis vermelha. Ao se avaliar a concentração microbicida mínima (MMC), a bactéria *K. pneumoniae* foi a que mais demandou concentração, refletindo maior resistência das bactérias gram-negativas, como já citado (RIGHI et al., 2011). Todas as bactérias gram-positivas foram sensíveis à fração acetanólica (BISPO JÚNIOR et al., 2012).

Em pesquisa realizada por Koo et al. (2000), foi verificado que embora as amostras de própolis do nordeste, sul e sudeste apresentem diferentes composições químicas, as três diferentes amostras tiveram atividade antibacteriana contra *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus cricetus*. Não ocorrendo o mesmo com os resultados obtidos com a própolis da região nordeste, Silva et al. (2006), demonstraram que a inibição do crescimento de *S. aureus*, não foi observada com própolis obtida na Paraíba.

As própolis do tipo 6 (nordeste) e 12 (sudeste), foram avaliadas em função da sazonalidade frente à bactéria *S. mutans*, onde os resultados obtidos permitiram os autores concluir que existem influência direta da sazonalidade no perfil químico e potencial antimicrobiano das amostras testadas. Na própolis do tipo 6, obtidas na Bahia, melhor atividade antibacteriana foi observada em uma subfração da fração hexânica, rica em compostos da classe das benzofenonas. O isolamento desta fração a hiperibona A, uma benzofenona prenilada, demonstrou atividade contra *S. aureus* e *S. mutans*, mas também possui atividade contra patógenos relacionados as infecções orais como: *S. sobrinus*, *Streptococcus oralis* e *A. naeslundii* (CASTRO et al., 2009).

Contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Streptococcus faecalis*, três dos quatro compostos isolados de uma própolis obtida no Paraná, foram efetivos (MARCUCCI et al., 2001). Com própolis obtida no estado do Rio Grande do Sul, observou inibição do crescimento de 92,6% dos isolados de bactérias gram-positivas e 42,5% de gram-negativas (VARGAS et al., 2004). Extratos hidroalcoólicos elaborados a partir da própolis, também obtidas na região sul, foram capazes de inibir o crescimento de patógenos comumente associados à otite canina: *Staphylococcus* coagulase-positivo e o fungo *Malassezia pachydermatis* (CARDOSO et al., 2010).

O crescimento de *S. aureus* foi inibido através do uso de um óleo essencial, rico em monoterpenos (α -pineno, β -pineno e limoneno), que foi obtido a partir de hidrodestilação de própolis coletadas em três municípios no Rio Grande do Sul (SIMIONATTO et al., 2012).

Na comparação do potencial antimicrobiano da própolis coletada na região sul e sudeste, os resultados mostraram que a própolis do sudeste possuiu maior atividade anti-coagulase-negativa e a do sul, maior raio de sinergismo com medicamentos antimicrobianos.

Para *E. coli* foi verificado que algumas amostras de própolis marrom, coletadas na região Centro-Oeste, apresentaram efeito antibacteriano, onde 42,9% dessas amostras demonstraram concentração inibitória mínima (MIC) de 250mg/mL (BASTOS et al., 2011). Nesta mesma região, foram coletadas amostras de própolis, que atuaram contra *S. aureus*, mas quando a bactéria era ressuspensa do leite, a atividade bactericida diminuía consideravelmente (SANTANA et al., 2012).

Na região norte, precisamente no estado de Manaus, Ishida et al. (2011), demonstraram que a própolis apresentou atividade antimicrobiana positiva contra bactérias de interesse odontológico ligadas à formação de cárie dentária *Streptococcus mitis*, *S. mutans* e

Streptococcus salivarius. As amostras com bioatividade eram ricas em benzofenonas preniladas.

A propriedade antibacteriana também pode ser referida a própolis produzida por abelhas nativas. A abelha *Frieseomelitta varia* apresentou atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

A conclusão após isolamento e identificação da artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), foi que este composto apresenta maior atividade antibacteriana (CAMPOS et al., 2011). Para a própolis de abelha *Melipona fasciculata*, observou atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, com significativa atividade inibitória contra biofilmes de *S. mutans* (LIBERIO et al., 2011) e o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* e sua fração hexânica inibiram o crescimento de *S. aureus* e *S. mutans* (CUNHA et al., 2013).

3.4.2 Atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante de extratos de própolis, os métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e o de inibição da oxidação do sistema β - caroteno/ácido linoléico vem sendo os mais utilizados, sendo que para as formas farmacêuticas tópicas os mais adequados métodos são os ensaios de inibição da peroxidação lipídica e sistema xantina/xantina oxidase/luminol (MARQUELE et al., 2005). A atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de extratos aquosos de própolis verde e marrom foram maiores quando comparados a extratos metanólicos do mesmo tipo de própolis (BANSKOTA et al., 2000).

Foi constatado por Nagai et al. (2003), que o extrato aquoso da própolis brasileira demonstrou atividade antioxidante superior a encontrada no ácido ascórbico 5 mM nas concentrações de 1 e 5 mg/ml, utilizando o modelo de peroxidação lipídica.

Após elaboração dos extratos etanólicos de amostra de própolis brasileira e fracionamento por fluido supercrítico, através da capacidade sequestradora dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH), foi possível ser evidenciado que atividade antioxidante apresentou ação concentração dependente (WANG et al., 2004).

Na comparação do potencial antioxidante de diferentes extratos obtidos através da própolis brasileira, adotando-se o método DPPH e tiocianato férrico para avaliação, o extrato etanólico exibiu maior atividade que o extrato éter de petróleo nos dois métodos (SHENG et

al., 2007). A Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é um dos compostos bioativos presentes na própolis verde, sendo capaz de prevenir o dano oxidativo em células HepG2 (hepatócitos cancerígenos humanos), demonstrando biodisponibilidade e capacidade antioxidante (SHIMIZU et al., 2004). Após tratamento com extratos etanólico de própolis verde, neutrófilos foram avaliados quanto à produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), sendo demonstrado maior efeito inibitório pela fração hexânica e pelo canferide (flavonol) no ensaio dependente de luminol (SIMÕES et al., 2004).

Pesquisas comparativas quanto a ação antioxidante da própolis verde de diferentes países na qual inclui o Brasil, enfatiza que a própolis chinesa exibiu maior potência em sequestrar o radical DPPH, quando comparado com a própolis verde e alguns de seus compostos isolados. Uma possível explicação para atividade antioxidante da própolis chinesa, é o fato de possuir fenetil éster do ácido caféico (CAPE) e para própolis verde, a presença de derivados do ácido cafeoilquínico e ácido caféico (IZUTA et al., 2009). Foi possível observar que após avaliação da própolis obtidas na Rússia, Itália e Brasil, as amostras brasileiras apresentaram menores valores de concentração capaz de inibir em 50% o radical DPPH (IC50%). Dentre essas amostras, a própolis verde exibiu maior potencial antioxidante, quando comparada as própolis do Pantanal e de São Paulo (FABRIS et al., 2013).

O extrato aquoso da própolis verde foi utilizado no tratamento de ratos Wistar machos, concluindo neste estudo que em virtude da sua capacidade antioxidante a própolis verde foi capaz de melhorar a função reprodutiva dos ratos, atuando favorecendo maior produção de espermatozoides e maior altura do segmento inicial do epitélio do epidídimo (sem indução de estresse oxidativo) (CAPUCHO et al., 2012).

Também é relevante a ação antioxidante da própolis vermelha, pesquisas realizadas por Cabral et al. (2009) apontam que frações hexânicas apresentam maior atividade antioxidante (74,4%), através do método de sequestro de radical DPPH. Já no método de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, a fração clorofórmica apresentou maior atividade (64,84%), concluindo nesse estudo que existe uma maior correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico. Esses resultados corroboram com os encontrados por Oldoni et al. (2011), que após o isolamento de dois compostos obtidos da fração clorofórmica, os isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina), constataram que vestitol foi o que apresentou maior atividade antioxidante frente aos demais, também através do método β -caroteno/ácido linoleico.

Através do método de oxidação do β -caroteno foi possível observar que um extrato metanólico da própolis vermelha demonstrou maior atividade antioxidante, quando comparado ao método do DPPH, onde Righi et al. (2011) indicaram que isoflavonas e chalconas, considerados os principais compostos ativos, apresentam maior relação pela fase orgânica.

Após análise de um extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, foi constatado acentuada atividade enzimática tipo superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), importantes no estresse oxidativo (FROZZA et al., 2013).

A ação antioxidante apresenta íntima ligação com as propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. A própolis marrom atuou efetivamente reduzindo danos histológicos e lesões causados pela infecção pelo vírus *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2), nos tecidos genitais de animais, tendo ação em processos oxidativos e inflamatórios (SARTORI et al., 2011).

A partir da mensuração por quimiluminescência, neutrófilos estimulados por zimosan, tiveram a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) inibidas pela ação antioxidante da própolis verde. Ao se analisar qualitativamente a própolis, evidenciou que tanto a aromadendrina-4-metil éter como também a bacarina apresentam essencial função na atividade antioxidante (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

3.4.3 Atividade cicatrizante

A própolis como cicatrizante e agente regenerador de tecidos no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras já vem sendo utilizada e largamente empregada na dermatologia. Com propósito de demonstrar a atividade cicatrizante da própolis, estudos clínicos *in vitro* e *in vivo* já foram realizados. Na presente revisão de literatura diferentes modelos experimentais foram observados, constatando bons resultados após tratamento com própolis e evidenciando diminuição no recrutamento de células inflamatórias em muitos estudos (ABREU et al., 2012).

A redução do tempo de cicatrização, o aumento da contração da ferida e da aceleração do reparo tecidual, ocorre devido às suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Durante a cicatrização de feridas, interações celulares e moleculares se sincronizam para reparar os tecidos danificados (BARBOSA et al., 2009). A propriedade cicatrizante da própolis está relacionada à presença de flavonoides e ácidos fenólicos (ARVOUET-GRAND et al., 1994).

Há vários estudos comparando a propriedade cicatrizante de cremes de própolis com cremes de sulfadiazina de prata em feridas cirúrgicas abertas, sendo que em todos os trabalhos, a própolis demonstrou igual ou maior rapidez na cicatrização e menor inflamação local que o antibiótico (GREGORY et al., 2002; HAN et al., 2005; KHORASGANI et al., 2010). Ahmed et al. (2011) avaliaram a efetividade da própolis egípcia em feridas de queimaduras cirúrgicas em ratos diabéticos. O creme de própolis testado foi capaz de diminuir as superfícies das queimaduras e inibir o crescimento bacteriano local, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram com os encontrados por Baracho et al. (2009), que avaliaram o efeito do uso tópico do extrato hidroalcoólico da própolis na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos diabéticos (tipo I), comparando-os a um grupo controle. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato hidroalcoólico da própolis a 30% acelerou a cicatrização das feridas nesses animais.

A eficácia do creme de própolis foi avaliada em estudo clínico comparativo com o tratamento padrão de sulfadiazina de prata em queimaduras de 2º grau. Os resultados obtidos demonstraram que os pacientes tratados com creme de própolis apresentaram menor tempo de cicatrização e reduzida intensidade dos sinais de inflamação (calor, rubor e inchaço), porém a sulfadiazina de prata demonstrou com maior potencial antimicrobiano, quando comparado com o creme de própolis (GREGORY et al., 2002).

Em pesquisa realizada com própolis verde, avaliando a absorção de compostos fenólicos por um pó-de-pele e o efeito sobre fibroblastos de ratos, foi possível observar que 68% dos compostos fenólicos aderiram ao pó-de-pele, em concentrações iguais ou inferiores a 15,62 µg/ml, além disso, o extrato de própolis não foi capaz de alterar a viabilidade dessas células (FUNARI et al., 2007).

Testes com pomada a base de própolis em feridas crônicas (úlceras vasculares, diabéticas e por pressão) realizados por Santos et al. (2007), mostraram um tempo médio de cicatrização de 13,1 semanas, apresentando brandos sinais da inflamação, sugerindo eficiente ação do tratamento. A pomada de própolis foi à forma farmacêutica usada em estudo comprovando que a própolis atua influenciando no processo de cicatrização através do estímulo da proliferação de queratinócitos, reduzindo significativamente as áreas das feridas. O uso da técnica de espectroscopia fotoacústica indicou variada taxa de penetração da formulação nos diferentes estágios da cicatrização (SEHN et al., 2009).

Foi constatado que ocorreu eficaz debridamento das lesões no período inicial e estimulou a produção de colágeno em todo o período de avaliação da capacidade

reepitelizante de uma pomada de própolis 5% em queimaduras de 2º grau induzidas em ratos (PESSOLATO et al., 2011).

Administrando oralmente extrato aquoso de própolis verde (500mg/kg) Moura et al. (2011), avaliaram o reparo tecidual através do modelo de implantação de matrizes esponjosas subcutâneas. O tratamento com própolis proporcionou processo inflamatório reduzido na matriz esponjosa nos primeiros dias pós-implante, quando comparado ao grupo controle não tratado, levando aos autores concluírem que a própolis na fase inicial do processo cicatricial foi capaz de afetar a deposição de colágeno.

Estudo em que se comparou e correlacionou os dados obtidos na reparação de tecidos *in vivo* com o teor de flavonóides, utilizando pomada a base de 20% de própolis verde e outra a base de própolis vermelha, demonstrou que os animais tratados com a pomada de própolis verde apresentaram evolução ligeiramente melhor. Com isso, não foi possível fazer correlação entre o teor de flavonóides e o potencial cicatrizante, demonstrando que flavonóides diferentes nos dois tipos de própolis podem estar envolvidos no processo cicatricial (BATISTA et al., 2012).

Na forma farmacêutica de gel contendo variadas concentrações do extrato padronizado de própolis (EPP-AF®), foi avaliado o tratamento de feridas induzidas em ratos Wistar (BERRETTA et al., 2012).

Entre as concentrações avaliadas, o gel com concentração 3,6% (p/p) do EPP-AF® apresentou maior atividade cicatrizante, evidenciando epitelização concluído com sete dias pós-injúria. A partir da análise histológica dos fragmentos das feridas, observou que o gel de própolis diminuiu a quantidade de leucócitos e estimulou a angiogênese e a produção de colágeno. Dentre os compostos químicos do EPP-AF® houve predominância de substâncias das classes dos flavonóides, compostos fenólicos prenilados e ácidos fenólicos. Confirmado com esses dados, pesquisa avaliando o efeito da administração tópica de extrato de própolis 30% sobre feridas cutâneas em ratos, observou que o tratamento foi capaz de promover a fibroplasia e re-epitelização das feridas e acelerar a cicatrização, quando comparado a um grupo controle (ABREU et al., 2012).

De acordo com pesquisa realizada por Barroso et al. (2012), foi avaliada a ação de um extrato alcoólico de própolis 30% em mastócitos, a partir de administração tópica sobre feridas orais induzidas em hamsters. Em estudo comparativo utilizando dois métodos de tratamento: creme de dexametasona 0,1% e o extrato alcoólico de própolis 30%, o segundo favoreceu redução significativa do número de mastócitos, tanto na região central, quanto nos

bordos das feridas durante a fase inflamatória de cicatrização, demonstrando potente ação anti-inflamatória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÕES DAS AMOSTRAS

Durante o período de julho a setembro de 2014, oito amostras de geoprópolis produzidas por abelhas mosquito (*Plebeia* aff. *flavocincta*) no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil, foram coletadas (Figura 3).

Figura 3 – Amostra de geoprópolis produzida por abelhas mosquito *Plebeia* aff. *flavocincta*, obtida na região do semiárido Norte Rio-grandense



Fonte: Acervo do autor

Uma amostra foi coletada no município de Serra do Mel (A) e as demais em assentamentos localizados na zona rural de Mossoró (B, C, D, E, F, G e H). As técnicas de coleta utilizada seguiram as determinações da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura. Depois de retirada manual de sujidades, as amostras foram avaliadas quanto a sua consistência, pesadas em balança de precisão, identificadas e armazenadas em frascos esterilizados e mantidos sobre refrigeração a temperatura próxima de -20 °C, até a produção dos respectivos extratos.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE GEOPRÓPOLIS

Realizou-se a maceração a frio, na proporção de 1:6,25 (m/v), para cada 1g de geoprópolis triturada, utilizou 6,25ml de álcool etílico 70°GL. As amostras foram

aconditionadas em frasco de vidro âmbar devidamente identificados e agitados manualmente por 30 segundos, diariamente durante 20 dias consecutivos de infusão, conforme Garcia et al. (2004). Na etapa seguinte realizou-se processo de filtragem do sobrenadante em papel filtro e posteriormente em algodão, para retenção de partículas insolúveis. Para remoção da cera, o filtrado permaneceu sobre refrigeração (4 °C) por 24h e logo após em freezer (-20 °C) por 30 minutos e em seguida, realizou-se nova filtragem do sobrenadante em papel filtro seguido de centrifugação, obtendo-se os extratos hidroalcoólicos de geoprópolis.

4.3 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS EXTRATOS

As análises sensoriais das amostras e dos extratos de geoprópolis foram realizadas segundo regulamento de identidade e qualidade de própolis e extrato de própolis, sendo avaliada a consistência para geoprópolis e o aroma, cor, sabor e aspecto para os extratos. Os resultados foram considerados com base no enquadramento das possibilidades disponibilizadas pelo regulamento citado, presente na Instrução Normativa nº 3 Anexo VII (BRASIL, 2001).

4.3.1 Requisitos físico-químicos

4.3.1.1 Determinação do extrato seco das amostras

Alíquotas de 6,0ml de cada extrato foram divididas em quantidade equivalente em três frascos de vidro previamente pesados em balança analítica de precisão, em seguida colocados em chapa aquecida a 40 °C para total evaporação do solvente presente.

Os frascos foram pesados novamente, após 48 h mantidas em dissecador sobre pressão reduzida, para obtenção e determinação do extrato seco, que foi obtida de acordo com a seguinte fórmula: $Es = Pmf - Pmi$. Onde: Es = Extrato seco (mg); Pmf = Peso médio final; Pmi = Peso médio inicial, e posteriormente expresso em porcentual.

4.3.1.2 Quantificação de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado empregando-se o método Waterman e Mole (1994), em que alíquotas de 0,02ml em triplicata de cada extrato hidroalcoólicos de geoprópolis foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se 0,08ml de Metanol

(MeOH) e em seguida, transferidas para balões volumétricos de 10ml, contendo 3,9ml de água destilada. Adicionando-se 0,75ml de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 0,25ml do reagente Folin-Ciocalteu. Após 60 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Coleman 33D) a 760nm. Utilizou-se como padrão o ácido tânico, nas concentrações de 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200mg/ml para construir uma curva de calibração (Figura 4). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido tânico, sobre a geoprópolis bruta (m/m).

4.3.1.3 Quantificação de flavonoides totais

A determinação dos teores de flavonoides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998), em que 10 μ l de cada amostra dos extratos hidroalcoólicos foi diluído em 3 ml de metanol, desta diluição retirou-se alíquotas de 0,5ml em triplicata e adicionado um volume igual de solução metanólica de Cloreto de alumínio 5% (AlCl_3). Após repouso por 15 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Coleman 33D) a 420nm. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de quercetina nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 300mg/ml (Figura 5). Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina, sobre a geoprópolis bruta (m/m).

4.4 AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

As cepas utilizadas foram provenientes de coleções padronizadas pela American Type Cell Culture (ATCC), devidamente caracterizadas morfológicamente, fisiologicamente e bioquimicamente. As cepas testadas foram de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 35032).

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes destes microrganismos (entre 18-24h a 37 °C) e foram, posteriormente, suspensos em solução salina peptonada estéril para obter turvação idêntica à do tubo 0,5 da escala McFarland (6×10^8) unidades formadoras de colônia (UFC) (KONEMAN; CURY, 2001).

Foram necessárias várias diluições seriadas desta alíquota, antes de se realizar o plaqueamento. As várias diluições foram feitas com a finalidade de possibilitar a contagem de

colônias em meio sólido para a certificação da quantidade de microrganismos utilizados nos testes. A partir dos três últimos tubos diluídos adicionou-se 500µl da amostra na placa.

Cada um dos oito extratos hidroalcoólicos de geoprópolis, com suas respectivas concentrações (massa seca - mg/ml), foram submetidos em tubos de ensaio a diluições seriadas com álcool etílico (70°GL) nas seguintes proporções de extrato para seu diluente: 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 12,5/87.5 e 6,25/93,75.

Os controles positivos utilizados nos experimentos foram definidos após realização de antibiograma, onde se empregou como controle positivo discos de antibiótico com ciprofloxacina (5µg) para bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e amoxicilina (10µg) para bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e como controle negativo 50µl de álcool 70°GL para todas as placas de Petri avaliadas.

As placas de Petri de 15 cm de diâmetro, foram preparadas com o Ágar Mueller-Hinton (AMH) com aproximadamente 4 mm de espessura e após a solidificação do meio, foram perfurados sete poços em cada placa com 6mm de diâmetro. Em seguida, foi realizada a semeadura dos microrganismos com o auxílio de swabs estéreis, em cinco direções, como padronizado por Wayne (2008) com o intuito de promover o crescimento bacteriano uniforme. Em um poço foi colocado 50µL do controle negativo e para outros seis poços o mesmo volume de cada respectiva diluição dos extratos testados. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por um período de 24h.

Os testes foram feitos em triplicata pelo método de (BAUER et al., 1966), em seguida com auxílio de paquímetro foram medidos os diâmetros dos halos de inibição e expressos em milímetros. A leitura dos resultados seguiu a tabela de halos padronizada pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2011). Foi considerada como atividade antimicrobiana positiva os halos que apresentaram tamanho igual ou maior a 9 mm, segundo Smânia et al. (1995).

4.4.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis foi utilizado o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor et al. (2001). Para a análise das amostras foi diluído cada extrato em metanol (5mg/ml). Em cada poço da placa de Elisa aliciou-se 220µl de uma solução metanólica de radical livre DPPH e transferiu-se 20µl do extrato a ser analisado, para o branco utilizou-se 20µl de metanol. Como controle foi utilizado 3,5 mg de DPPH diluído em

50ml de metanol. Após 20 minutos de reação, realizou-se a leitura em 515nm, utilizando-se Biotek Synergy H1 Microplate reader. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e com a média dos dados obtidos, foi calculado o percentual da atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis, pela seguinte fórmula:

$\%AA = 100 - [(Aa - Ab) \times 100] / Ac$. Onde %AA= Porcentagem de atividade antioxidante; Aa = absorbância da amostra; Ab = absorbância do branco; Ac = absorbância do controle.

4.4.3 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

4.4.3.1 Formulação do creme

Para a preparação da formulação do creme aplicado por via tópica nas feridas experimentais usado na avaliação da atividade cicatrizante, foi utilizado o creme base constituído de isodecila 5%, lanete WB 10%, butil-hidroxitolueno (BHT) 0,01%, Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,1%, aristoflex 1,5%, propileno glicol 5%, silicone BC245 2%, Phenonip® 0,1% e água bidestilada q.s.p. 100g. Foram adicionados ao creme base 20% da mistura dos extratos hidroalcoólicos de geoprópolis, concentrados em banho Maria (40 °C).

4.4.3.2 Animais utilizados e grupos experimentais

Foram utilizados princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Lei Auroca, nº 11.794 na condução do experimento, no qual iniciou após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN, sobre o protocolo nº 001/15 (Anexo A).

Na avaliação da atividade cicatrizante foram empregados 40 ratos da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, machos da linhagem Wistar e com peso médio de 250g, sendo todos provenientes e mantidos no biotério da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN) campus Mossoró. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40x50x20cm) forradas com maravalha contendo três animais em cada, as quais eram mantidas em sala adequada com temperatura 21 a 23 °C e com ciclo de luz claro/escuro de 12h. Água e ração comercial (Labina Purina®) foram oferecidas *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo experimental (GE), composto por 20 ratos com feridas cutâneas, tratados com aplicação tópica do creme base com 20% de geoprópolis, e o grupo controle (GC), com o mesmo número de animais que receberam a aplicação tópica do creme base sem adição de geoprópolis.

4.4.3.3 Protocolo anestésico, confecção das feridas experimentais e aplicação tópica do creme.

Para a realização das feridas cutâneas, os animais foram anestesiados através da técnica dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (8,0mg/kg) e cloridrato de ketamina (140mg/kg), administrado por via intramuscular.

Foi feita ampla tricotomia da região dorsal e antissepsia com álcool iodado 2% no local cirúrgico e sem realizar distensão da pele efetuou com auxílio de molde metálico circular de 1x1cm de diâmetro e caneta para retroprojeter 1 mm a demarcação para confecção da ferida. Em cada rato, realizou-se uma ferida cutâneas centralizada na região dorsal, a incisão com lâmina de bisturi frio nº 15 e tesoura de ponta romba com auxílio de pinça de dissecação para remoção e o descarte da pele e tecido celular subcutâneo, expondo a fáscia muscular. O dia da produção da lesão cutânea foi intitulado como dia 0.

O creme foi aplicado imediatamente após cirurgia e posteriormente a cada 24h com auxílio de espátulas estéreis, em quantidade suficiente para cobertura total das lesões.

4.4.3.4 Avaliação macroscópica e morfométrica das lesões

As lesões cutâneas foram avaliadas diariamente quanto à presença de hiperemia, edema, sangramento, secreção, odor e crostas.

As áreas das feridas foram medidas diariamente nos diâmetros maior e menor empregando-se paquímetro. Os dados obtidos foram avaliados mediante a equação formulada por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot R \cdot r$. Onde A = área (cm²); π = 3,14; “R”, o raio maior e “r”, o raio menor.

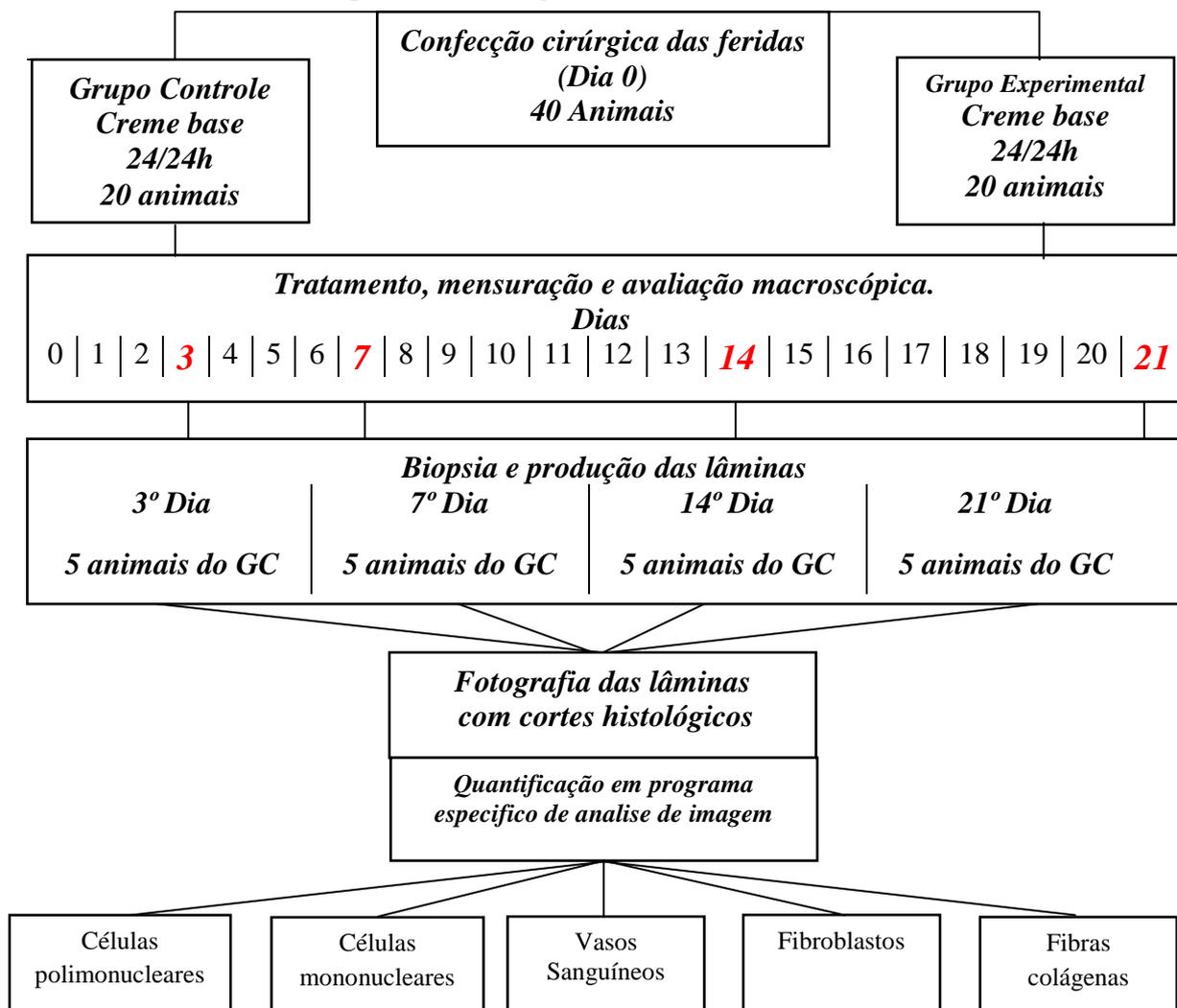
4.4.3.5 Biopsia das feridas e avaliação histológicas

Em todos os animais do grupo controle e experimental, foram realizadas biopsias nos 3º, 7º, 14º e 21º dias após a produção das lesões. O mesmo protocolo anestésico utilizado para realização das feridas foi adotado para realização das biópsias. Retirou-se fragmentos

de 1 cm² de tecido epitelial abrangendo a área da lesão e da pele íntegra, após, foram fixados em formalina a 10%. Os fragmentos fixados foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, submetidos à inclusão em parafina, cortados a 5µm de espessura e posteriormente corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Para quantificação de colágeno realizou-se coloração pelo tricômico de Masson.

Foram realizadas fotografias dos cortes histológicos com câmera digital Canon acoplada ao microscópio óptico convencional (Olympus modelo BX50) e conectado a um computador com programa específico de análise de imagem (Image Pro Plus, versão 6.0 para Windows), no qual foi quantificada a densidade dos elementos histológicos que indicam a evolução do processo cicatricial: células polimorfonucleares, células mononucleares, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas. A seguir fluxograma descritivo conforme as etapas e metodologia utilizada no delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante (Figura 4).

Figura 4 – Delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante, fluxograma descritivo conforme as etapas e metodologia utilizada

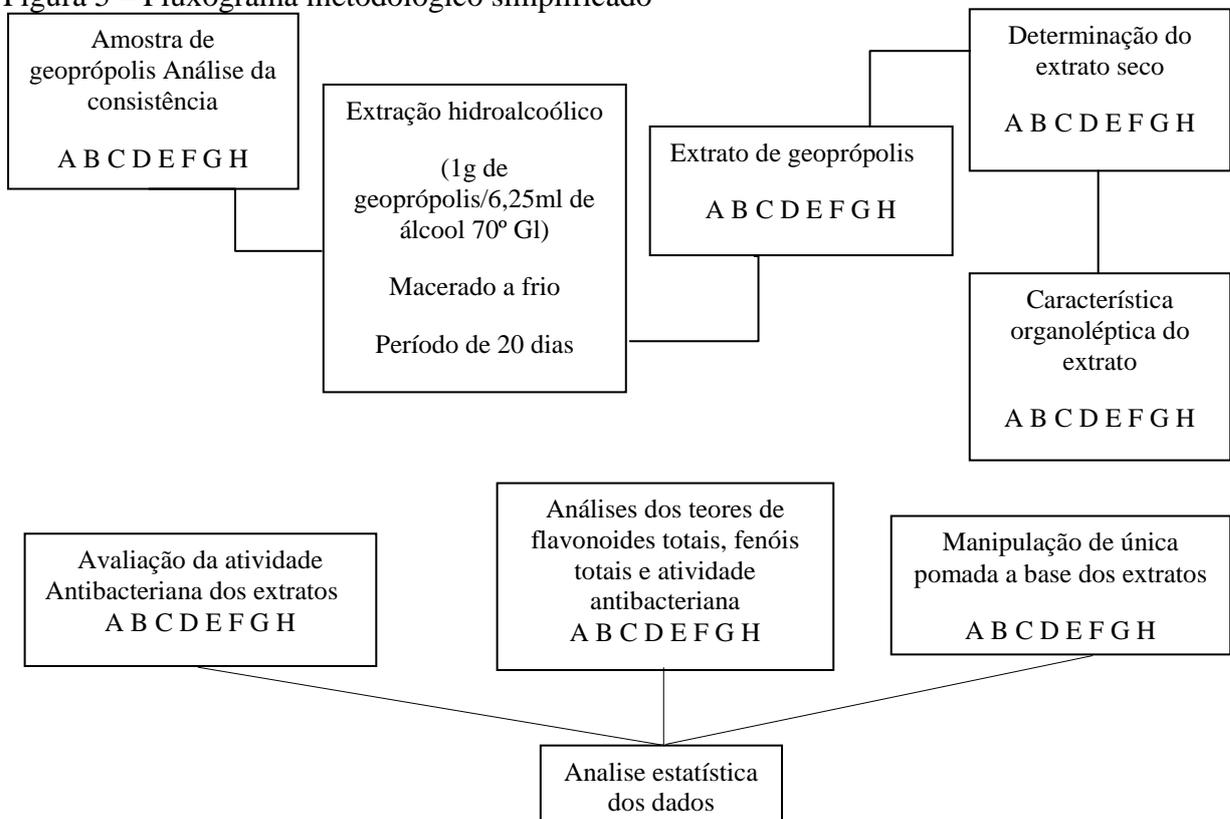


4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram expressos em valores de média e desvio padrão através do programa estatístico GrapPad Prism versão 5.0. Após análise dos pressupostos paramétricos, diferenças estatísticas das variáveis da densidade dos parâmetros histológicas (polimorfonucleares, vasos sanguíneos, mononucleares, fibroblastos, colágeno) entre grupos experimentais dentro de cada dia estudado foram obtidas através de teste t independente. Já diferenças entrem os dias para cada grupo utilizou-se análise de variância seguida por Tukey.

Em relação aos halos de inibição de crescimento bacteriano, diferença entre os extratos de geoprópolis dentro e entre diluições foram obtidas por análise de variância. A influência do extrato seco de geoprópolis frente atividade de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante foram feitas através da correlação de Spearman. Por fim, elaborou-se um modelo de regressão linear múltipla, tendo como variável dependente a atividade antioxidante (%). Quando rompido distribuição gaussiana, utilizou-se transformação logarítmica. Variáveis percentuais sofreram transformação arcoseno. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma metodológico simplificado



Fonte: Acervo do autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da análise das características sensoriais demonstraram que as amostras de geoprópolis utilizada para elaboração dos respectivos extratos apresentaram em temperatura ambiente, consistência que variaram de maleável pegajoso a rígido resinoso. Nos extratos hidroalcoólicos foi possível identificar seis distintos tipos de aroma: amadeirado, adocicado, neutro, balsâmico, hortelã, erva e adocicado. A maioria das amostras apresentou coloração âmbar. No entanto, a amostra C, apresentou-se incolor, amostra G, marrom escuro e amostra H esverdeada. Os sabores observados nas amostras variaram do característico amargo ao forte e adocicado. Em todas as amostras dos extratos verificaram-se aspectos líquido, límpido e homogêneo (Tabela 1).

Tabela 1 – Consistência das oito amostras brutas de geoprópolis produzido por *Plebeia aff. flavocincta* e respectivas características sensoriais dos extratos hidroalcoólicos

Extratos	Consistência*	Aroma	Cor	Sabor	Aspecto
A	Maleável (pegajoso)	Amadeirado adocicado	Âmbar	Característico picante amargo	Líquido límpido e homogêneo
B	Rígido (Resinoso)	Amadeirado	Âmbar	Característico amargo	Líquido límpido e homogêneo
C	Maleável (pegajoso)	Neutro	Incolor	Característico amargo	Líquido límpido e homogêneo
D	Maleável (pegajoso)	Balsâmico	Âmbar	Característico forte	Líquido límpido e homogêneo
E	Maleável (pegajoso)	Hortelã	Âmbar	Característico amargo	Líquido límpido e homogêneo
F	Rígido (Resinoso)	Erva	Âmbar	Característico amargo	Líquido límpido e homogêneo
G	Rígido (Resinoso)	Amadeirado adocicado	Marrom escuro	Característico adocicado	Líquido límpido e homogêneo
H	Rígido (Resinoso)	Adocicado	Esverdeado	Característico picante	Líquido límpido e homogêneo

*geoprópolis utilizada para elaboração dos respectivos extratos

Neste trabalho foi demonstrado que houve grande variação das características sensoriais das amostras de geoprópolis e dos extratos, da abelha mosquito *Plebeia* aff. *flavocincta*, provenientes de comunidades rurais do semiárida do estado do Rio Grande do Norte. Os diferentes tipos de aroma, cor, sabor e aspectos observados nos extratos hidroalcoólicos podem indicar diversidade da matéria-prima utilizada pelas abelhas para confecção da geoprópolis, bem como variação de sua composição química. A própolis é uma mistura complexa de substâncias produzidas a partir de componentes das plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração de um produto final (BRASIL, 2001). As espécies nativas pertencentes à Tribo Meliponini elaboram geoprópolis que difere da própolis produzidas por *Apis mellifera*, possui terra ou barro em sua composição (CUNHA et al., 2013).

Assim, as variações nas características sensoriais obtidas no presente estudo estão de acordo com dados da literatura, no qual afirma que a coloração da própolis ou geoprópolis, depende de sua procedência, podendo variar de marrom escuro, passando a uma tonalidade esverdeada até ao marrom avermelhado. Possui um aroma característico que pode variar de uma amostra para outra, como também existem amostras que não apresentam nenhum aroma. O sabor é característico, variando de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica (MARCUCCI, 1996a; DUTRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Os resultados indicam que cinco amostras apresentaram excelente atividade antioxidante acima de 90%. As amostras F e G se destacaram com relação às demais, por apresentar respectivamente altos valores de fenóis totais $5,67 \pm 0,39\%$ e $9,40 \pm 0,28\%$ (m/m), bem como de maiores concentrações de flavonoides totais $0,01005 \pm 0,00004$ e $0,02200 \pm 0,00037\%$ (m/m) (Tabela 2).

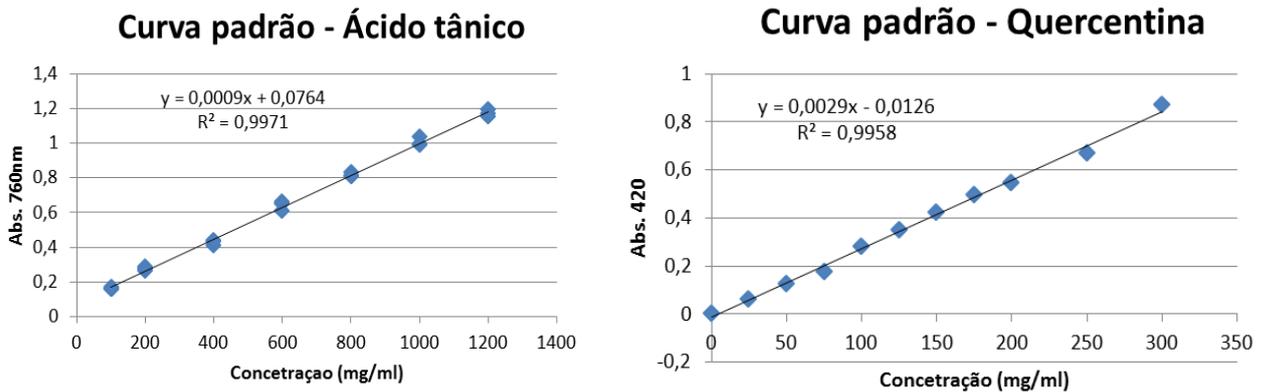
Tabela 2- Extrato seco % (m/v), teor de fenóis totais (%) (m/m), teor de flavonoides totais % (m/m) e atividade antioxidante (%) e seus respectivos desvio padrão dos oito extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta*

Amostras	Análises			
	Extrato seco % (m/v)	Teor		Atividade antioxidante (%)
		Fenóis totais (%) (m/m)	Flavonoides totais % (m/m)	
A	$3,34 \pm 0,53$ B	$2,67 \pm 0,21$ E	$0,0041 \pm 0,00007$ E	$94,31 \pm 1,12$ A
B	$1,89 \pm 0,36$ F	$0,99 \pm 0,09$ F	$0,00148 \pm 0,00007$ F	$89,72 \pm 2,38$ B
C	$2,2 \pm 0,24$ E	-	$0,0005 \pm 0,00003$ H	$24,45 \pm 1,50$ D
D	$3,25 \pm 0,25$ C	$3,13 \pm 0,24$ D	$0,00618 \pm 0,0003$ C	$94,97 \pm 0,39$ A
E	$2,65 \pm 0,30$ D	$4,01 \pm 0,55$ C	$0,0046 \pm 0,00$ D	$93,79 \pm 0,34$ A
F	$3,41 \pm 0,66$ B	$5,67 \pm 0,39$ B	$0,01005 \pm 0,00004$ B	$95,65 \pm 0,05$ A
G	$3,76 \pm 0,44$ A	$9,4 \pm 0,28$ A	$0,02200 \pm 0,00037$ A	$95,46 \pm 0,10$ A
H	$3,37 \pm 0,68$ B	-	$0,0008524 \pm 0,00009$ G	$49,93 \pm 0,07$ C

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$)

Os valores de 99% do coeficiente de regressão (R^2) refletem um alto grau de confiabilidade das curvas padrão, com sua respectiva equação da reta para ácido tânico e para quercentina (Figura 6).

Figura 6 – Curva padrão, com sua respectiva equação da reta, para o ácido tânico e quercentina



Fonte: Acervo do autor

Vale salientar que este é um estudo pioneiro, não sendo, portanto, encontrados na literatura dados relativos à quantificação de fenóis totais e flavonóides totais da geoprópolis produzida pela abelha *P. aff. flavocincta*.

Em relação a outros meliponídeos, cujas informações podem ser comparadas às observações do presente estudo, merece destaque a pesquisa realizada por Franchin et al. (2012b), que também observaram alto teor de fenóis totais na geoprópolis produzido pela abelha *Melipona scutellaris* (uruçu). O teor de fenóis totais encontrado nas amostras F e G também atende ao regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis do Ministério da Agricultura, que é de no mínimo 5% (m/m) (BRASIL, 2001).

Pode-se observar que houve uma correlação positiva entre extrato seco das amostras dos extratos e atividade antioxidante ($r_s = 0,828$), extrato seco e os teores de fenóis totais ($r_s = 0,841$) e flavonoides totais ($r_s = 0,833$). Se constatou correlação positiva entre atividade antioxidante e as variáveis fenóis totais ($r_s = 0,870$) e flavonoides totais ($r_s = 0,912$), como também fenóis totais e flavonoides totais ($r_s = 0,957$) (Tabela 3). Com o modelo matemático é possível obter a atividade antioxidante a partir da equação, $\%Y = 56,6683 + \% \text{ Fenóis totais} \times (19,6378) + \text{Flavonoides totais} \times (-6,5383)$, onde $\%Y$ é a atividade antioxidante. O coeficiente de determinação múltipla foi de $R^2 = 0,6027$.

Tabela 3 - Correlação entre extrato seco, atividade antioxidante %, fenóis totais % (m/m) e flavonoides totais % (m/m) dos oito extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta*

	Extrato seco	Atividade Antioxidante	Fenóis totais
Atividade antioxidante	0,828 (<0,0001)**	-	
Fenóis totais	0,841 (<0,0001)**	0,870 (<0,0001)**	-
Flavonoides totais	0,833 (<0,0001)**	0,912 (<0,0001)**	0,957 (<0,0001)**

** Significância estatística (p<0,001)

A relação entre os teores de fenóis totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante, apontam que à medida que aumentou os teores dos referidos compostos nas amostras, houve o aumento percentual da atividade antioxidante. Tal fato confirma dados da literatura que afirma que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada aos teores de fenóis totais e flavonoides totais (CASTRO et al., 2007; SOUZA; GONÇALVES, 2008; CABRAL et al., 2009; DA SILVA et al., 2013). Os compostos fenólicos são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas fenólicas. O método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância, a concentração desse radical é medida por espectrofotometria, onde é observada a redução da absorbância até sua estabilização (RIGHI et al., 2011).

Considerando que o consumo frequente de antioxidantes é associado com a baixa incidência de declínio do sistema imune, doenças degenerativas, entre as quais o câncer, diabetes, artrite, doenças cardiovasculares e até mesmo disfunções cerebrais (OLIVEIRA et al., 2011), a constatação da atividade antioxidante nos extratos da geoprópolis poderá contribuir para validar seu uso medicinal, uma vez que a utilização como remédios caseiro dos produtos elaborados pelos meliponíneos (mel, pólen, própolis e geoprópolis) faz parte dos hábitos de muitas comunidades rurais no semiárido do nordeste brasileiro (SOUZA et al., 2004).

Os ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* demonstraram que as amostras A, D, F, G e H promoveram halos de inibição em todas as bactérias testadas. Como esperado, as bactérias gram-positivas e gram-negativas utilizadas no experimento demonstraram sensibilidade à Ciprofloxacina 5µg e Amoxicilina 10µg, respectivamente. O álcool 70°GL, utilizado como controle negativo não demonstrou atividade inibitória contra os microrganismos testados, não havendo formação de halos de inibição. Na medida em que aumentou a proporção do extrato, houve ampliação dos halos de inibição do crescimento das

bactérias nas placas, demonstrando ação concentração dependente para as bactérias gram-positiva e gram-negativa.

Para a amostra G foram obtidos excelentes resultados, uma vez que, promoveu halos de inibição com tamanhos iguais ou superiores a 9 mm para a bactéria *Escherichia coli* em todas as diluições do extrato, apresentando halos de inibição superiores estatisticamente do que os valores do antibiótico nas concentrações de 100, 75 e 50% e não diferiram significativamente nas demais diluições. Os halos de inibição promovidos pela referida amostra para as bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, na concentração de 100%, não diferiram significativamente do valor médio do halo promovido pelo antibiótico, sendo que, para *Staphylococcus aureus* os halos promovidos pela amostra G também não diferiu significativamente em relação aos halos promovido pelo antibiótico nas concentrações de 100%, 75% e 50%, 25% (Tabela 4).

Tabela 4 – Média \pm desvio padrão dos valores dos halos de inibição, em milímetro de diferentes diluições (%) de extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, pelo método de difusão em ágar. (CP: Controle positivo - Antibiótico); (E: Extratos hidroalcoólicos)

E	Concentração do extrato %						C.P**
	100	75	50	25	12,5	6,25	
<i>Staphylococcus aureus</i>							
A	9,33 \pm 0,57aA	8,33 \pm 0,58aB	*	*	*	*	8,67 \pm 0,58aC
B	*	*	*	*	*	*	11,00 \pm 1,00AB
C	*	*	*	*	*	*	10,00 \pm 0,00BC
D	11,67 \pm 1,53aA	11,00 \pm 1,00abA	9,33 \pm 0,58bA	7,00 \pm 0,00cA	6,00 \pm 0,00cAB	*	10,00 \pm 0,00abBC
E	*	*	*	*	*	*	9,00 \pm 0,00C
F	9,67 \pm 0,58abA	9,33 \pm 0,58abAB	9,00 \pm 1,00abA	3,33 \pm 5,77bB	2,67 \pm 4,62bB	*	10,50 \pm 0,50aAB
G	11,00 \pm 1,00aA	11,33 \pm 2,08aA	10,67 \pm 1,53aA	10,00 \pm 2,65aA	8,00 \pm 1,00aA	*	11,50 \pm 0,50aA
H	10,00 \pm 1,00aA	*	*	*	*	*	11,00 \pm 0,00aAB
<i>Escherichia coli</i>							
A	13,33 \pm 1,53aA	11,00 \pm 1,00abA	10,00 \pm 0,00abA	10,33 \pm 2,31abA	10,67 \pm 2,89abA	6,67 \pm 1,15bA	12,00 \pm 1,73a
B	3,00 \pm 5,20bB	2,67 \pm 4,62bB	2,33 \pm 4,04bB	2,67 \pm 4,62bA	2,33 \pm 4,04bA	*	14,00 \pm 0,00aAB
C	11,67 \pm 0,58abA	9,00 \pm 1,00bcA	9,33 \pm 1,15abcA	8,67 \pm 1,53cdA	6,67 \pm 1,15cdA	6,00 \pm 0,00dA	12,00 \pm 1,00aA
D	14,00 \pm 1,00aA	11,67 \pm 1,53abA	11,33 \pm 1,15abA	10,00 \pm 0,00bA	8,00 \pm 1,00bA	8,67 \pm 2,89bA	11,00 \pm 0,00abAB
E	13,67 \pm 2,52aA	10,67 \pm 1,15abA	10,67 \pm 1,53abA	3,33 \pm 5,77bA	3,00 \pm 5,20bA	2,67 \pm 4,62bA	9,00 \pm 0,87abBC
F	12,67 \pm 2,08abA	12,00 \pm 1,73abA	11,67 \pm 1,53abA	9,33 \pm 0,58abcA	5,33 \pm 4,73bcA	2,33 \pm 4,04cA	13,00 \pm 0,00aAB
G	15,33 \pm	13,00 \pm	12,00 \pm	9,67 \pm	9,00 \pm	9,00 \pm	11,00 \pm

H	3,21aA 10,67± 0,58aA	1,73abA 8,00 ± 1,00abAB	1,00abA 8,00 ± 1,00abA	0,58bA 7,00 ± 1,00abA	1,00bA 2,67 ± 4,62bA	0,00bA 2,33 ± 4,04bA	0,00bBC 11,00 ± 0,00Abc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
A	11,67 ± 0,58bBCD	10,00 ± 1,00bBC	9,67 ± 0,58bB	9,00 ± 0,00bB	2,67 ± 4,62cB	* *	25,00 ± 0,00a
B	*	*	*	*	*	*	20,00 ± 1,00
C	8,67 ± 1,53bD	8,33 ± 0,58bC	*	*	*	*	22,00 ± 0,00a
D	15,67± 1,15bB	13,33 ± 1,15bB	13,00 ± 1,73bcAB	10,00 ± 1,73cdB	8,67 ± 0,58dA	*	21,00 ± 0,00a
E	10,00 ± 0,00aCD	9,67 ± 0,58aBC	10,00 ± 1,00aB	*	*	*	9,00 ± 0,00a
F	14,33 ± 0,58abBC	11,67 ± 1,53bBC	11,33 ± 1,53bB	10,00 ± 1,00bB	9,00 ± 2,00bA	2,33 ± 4,04cB	18,00 ± 0,00a
G	20,33 ± 3,79aA	18,33 ± 3,79abA	16,00 ± 2,65abA	14,00 ± 2,00abcA	12,33± 2,52bcA	8,00 ± 4,04cA	21,00 ± 0,00a
H	11,00 ± 1,73bCD	9,00 ± 1,00bBC	9,33 ± 2,52bB	*	*	*	20,00 ± 0,00a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>							
A	10,67 ± 1,15bBC	9,33 ± 0,58bcBC	9,33 ± 1,53bcBC	8,33 ± 0,58cB	*	*	17,00 ± 0,00a
B	*	*	*	*	*	*	20,00 ± 0,00
C	9,00 ± 1,00bC	8,67 ± 0,58bBC	*	*	*	*	25,00 ± 0,00a
D	14,00 ± 1,00aB	11,33 ± 0,58bB	10,33 ± 0,58bcBC	8,67 ± 0,58cdB	8,00 ± 1,00dA	*	10,00 ± 0,00bc
E	9,33 ± 1,15bC	8,33 ± 0,58bcBC	7,67 ± 0,58cC	*	*	*	21,00 ± 0,00a
F	13,67 ± 1,53aB	11,67 ± 1,15abAB	12,00 ± 2,00aB	10,67 ± 0,58abcAB	3,33 ± 5,77bcA	2,67 ± 4,62cA	16,00 ± 0,00a
G	19,33 ± 2,52aA	17,33 ± 3,51abA	16,33 ± 2,52abA	11,33 ± 2,31bcA	9,00 ± 1,73cA	7,00 ± 0,00cA	20,00 ± 0,00a
H	10,33 ± 0,58abBC	5,00 ± 4,36bC	*	*	*	*	13,00 ± 0,00a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na linha e ^{A,B} Maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística (p<0,05)

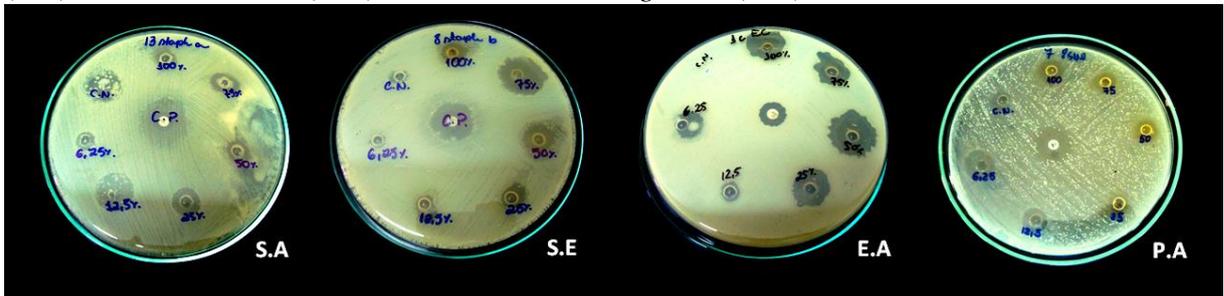
* Não houve crescimento de halos de inibição.

**controle positivo foi comparado somente na linha

C.N (controle negativo - Álcool 70° Gl) não apresentou formação de halo de inibição em nenhum ensaio

O extrato de geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta* foi considerado eficaz sob o ponto de vista da atividade antimicrobiana, uma vez que, das oito amostras testadas, cinco promoveram halos de inibição ≥ 9 mm frente todas às cepas testadas em relação aos controles, fato indicativo que nas amostras analisadas apresentam compostos bioativos com ação antimicrobiana. Outro dado importante refere-se à obtenção de atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), indicando, portanto atividade inibitória de amplo espectro (Figura 7).

Figura 7 – Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha *Plebeia* aff. *flavocincta*, sobre *Staphylococcus aureus* (S.A); *Staphylococcus epidermidis* (S.E); *Escherichia coli* (E.A); *Pseudomonas aeruginosa* (P.A)



Fonte: Acervo do autor

Vale ressaltar que geralmente atividades antimicrobianas *in vitro* de produtos naturais são mais ativas contra cepas de bactérias gram-positivas (PINTO et al., 2001; ORSI et al., 2007).

As bactérias gram-negativas apresentam uma parede celular composta por uma grande parte de lipopolissacarídeo (LPS), que age como barreira, impedindo a ação dos componentes ativos da própolis, o que resulta em baixa sensibilidade às diferentes concentrações dos extratos de própolis (OLIVEIRA et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a observação de Bankova (2005), no qual afirma que os diferentes tipos de própolis possuem atividade antimicrobiana, uma vez que, as abelhas têm esse material como mais importante mecanismo de defesa química, utilizando contra microrganismos patogênicos, no reparo de danos à colméia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha. Dessa forma, assim como já demonstrado pela própolis das abelhas do gênero *Apis*, alguns estudos vêm comprovando a capacidade da própolis ou geoprópolis produzido pelos meliponídeos em inibir o crescimento de bactérias patogênicas que adquirem com bastante frequência resistência aos antibióticos sintéticos e apresentam alto grau de patogenicidade para seres humanos e animais.

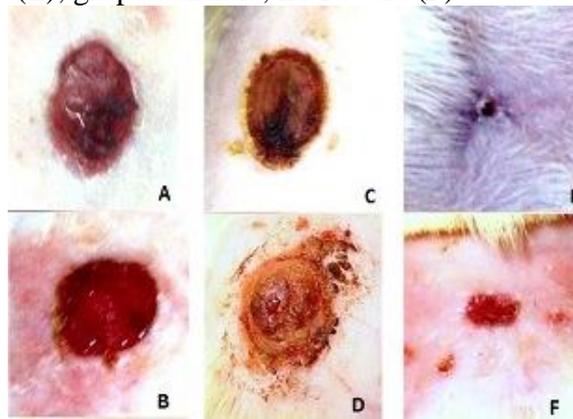
A própolis produzida por *Melipona fasciculata* exerceu atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, com significativa atividade inibitória contra *S. mutans* (LIBERIO et al., 2011). A atividade antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi observado através do uso da própolis meliponídeo *Frieseomelitta varia* (CAMPOS et al., 2011).

O extrato etanólico da geoprópolis de *M. scutellaris* e sua fração hexânica inibiram o crescimento de *S. aureus* e *S. mutans* (CUNHA et al., 2013) e a atividade

antibacteriana do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG) de *Melipona subnitida*, foi demonstrada tanto em bactérias gram-positivas *Salmonella typhimurium* e *S. aureus*, quanto em gram-negativas *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* (SOUSA et al., 2015).

Na avaliação da atividade cicatrizante do creme a base de geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta* foi possível observar durante o exame macroscópico que até o quarto dia pós-operatório as feridas da maioria dos animais do grupo experimental (GE), apresentaram discreta hiperemia e edema dos bordos (Figura 8 A), enquanto que os animais do grupo controle (GC), no mesmo período, apresentam bordos edemaciados, elevados e com presença de exsudato serosanguinolento (Figura 8 B).

Figura 8 – Aspecto macroscópico de ferida cutânea pós-cirúrgico em *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, grupo experimental (GE), no 3º dia (A); grupo controle, no 3º dia (B); grupo experimental, no 7º dia (C); grupo controle, no 7º dia (D); grupo experimental, no 14º dia (E); grupo controle, no 14º dia (F)



Fonte: Acervo do autor

No sétimo dia, os animais dos grupos (GE) e (GC) apresentaram evidências de formação de crosta que recobria o leito da ferida. As crostas dos animais do GE apresentaram-se finas, uniformes, secas e niveladas com a pele (Figuras 8 C), enquanto que as crostas dos animais do (GC) apresentaram-se espessa, granular e elevada acima do nível do bordo da ferida (Figuras 8 D). No oitavo dia pós-operatório houve desprendimento espontâneo da crosta que recobria a superfície das feridas em todos os animais dos (GE) por essa ocasião, foi possível verificar que as feridas se apresentavam com marcada redução do tamanho original, secas, de coloração esbranquiçada no decorrer do processo cicatricial (Figuras 8 E), enquanto que nos animais do (GC) as crostas se desprenderam no décimo primeiro dia pós-operatório e as feridas apresentavam-se visivelmente maiores com coloração rósea, brilhante e úmida após o decimo quarto dia pós-cirurgia (Figuras 8 F).

Na avaliação histológica das feridas cirúrgicas foi possível observar que no GE, os valores médios da densidade de células polimorfonucleares foram menores ($P < 0,05$) que os animais do (GC) no terceiro (Figura 9A e 9B), sétimo e décimo quarto dia. Com relação ao número de vasos sanguíneos e densidade de células mononucleares, no referido período, não se observou diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos (Figura 10C e 10D).

No sétimo (Figura 10E e 10F) e décimo quarto dia (Figura 11G e 11H), observou-se aumento ($P < 0,05$) da contagem dos fibroblastos e fibras colágenas no GE (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de média \pm desvio padrão dos achados histológicos dos animais, pertencentes aos Grupos Controle (GC) e Experimental (GE) nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório

	Grupos	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO (DIAS)		
		3º	7º	14º
Polimorfonucleares	(GE)	103456,68 \pm 64680,81aB	453,00 \pm 172,08bB	19,00 \pm 11,57bB
	(GC)	219021,80 \pm 69107,13aA	7210,00 \pm 3586,96bA	350,00 \pm 2814,12bA
Vasos Sanguíneos	(GE)	13,80 \pm 2,77aA	11,0 \pm 3,80aA	4,20 \pm 2,48bA
	(GC)	7,60 \pm 5,31aA	7,40 \pm 3,84aA	3,20 \pm 1,09aA
Mononucleares	(GE)	72,86 \pm 26,44cA	99981,40 \pm 75596,99aA	27509,60 \pm 18870bA
	(GC)	89,60 \pm 15,40cA	104052,40 \pm 34840,70aA	3517,80 \pm 52521,90bA
Fibroblastos	(GE)	0	249,80 \pm 57,44aA	9469,60 \pm 28488,57bA
	(GC)	0	39,46 \pm 28,48bB	190,26 \pm 169,02aB
Colágeno	(GE)	0	5312,20 \pm 2147,62bA	29033,00 \pm 15419,25aA
	(GC)	0	630,20 \pm 195,10bB	918,42 \pm 97,91aB

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na linha e ^{A,B} Maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) (GE) = Grupo experimental; (GC) = Grupo controle

O efeito benéfico do uso tópico do creme de geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta* foi constatado pela aceleração do processo cicatricial, os quais foram evidenciados pelo desprendimento da crosta que recobriam as feridas no oitavo dia pós-operatório, bem como pelo fechamento mais rápido da ferida, além da redução significativa da densidade de células polimorfonucleares, aumento significativo da contagem dos fibroblastos e fibras colágenas nos animais do (GE).

Evidencias de edema e hiperemia discreta, bem como a baixa densidade de células polimorfonucleares observadas nas feridas do (GE) e diferença estatística em relação ao (GC), sugere à geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta* atividade anti-inflamatória.

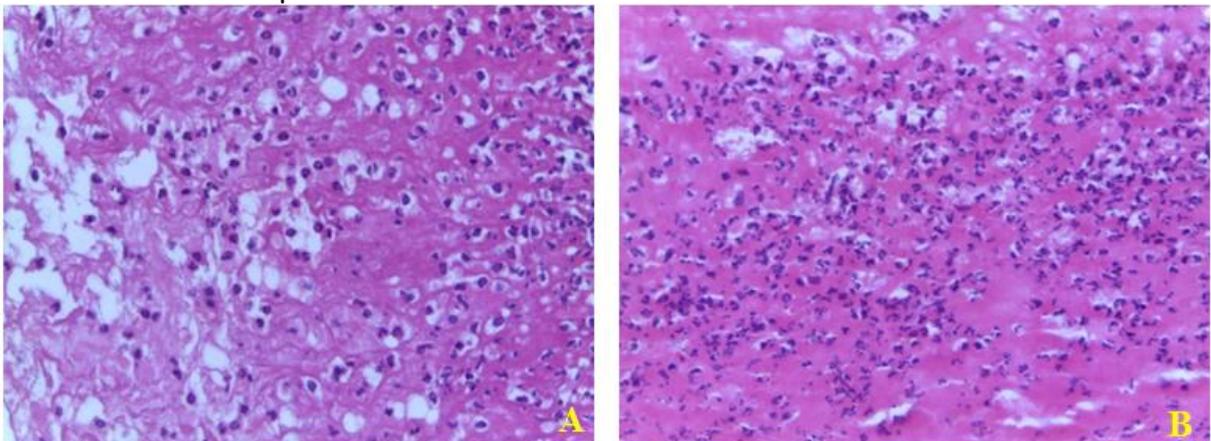
O processo inflamatório é uma etapa fundamental ao processo cicatricial. A inflamação promove a exsudação de células leucocitárias que realizam fagocitose e destroem agentes lesivos, restos tissulares e tecido necrótico (MANDELBAUM et al., 2003).

Contudo, com a persistência do processo inflamatório, inicia-se a fase dos efeitos colaterais gerados pela resposta exacerbada do organismo, que promove edema, quantidade excessiva de exsudato e lesão tecidual, os quais favorecem a deiscência e crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a inibição da proliferação de fibroblastos e da deposição de colágeno (ROBBINS et al., 2009).

Os resultados da análise histológica realizada no presente estudo foram semelhantes aos obtidos por Berretta (2012), que observou diminuição do recrutamento de células inflamatórias e produção de colágeno em feridas cutâneas experimentais em ratos tratadas com gel de própolis verde após o terceiro dia de tratamento.

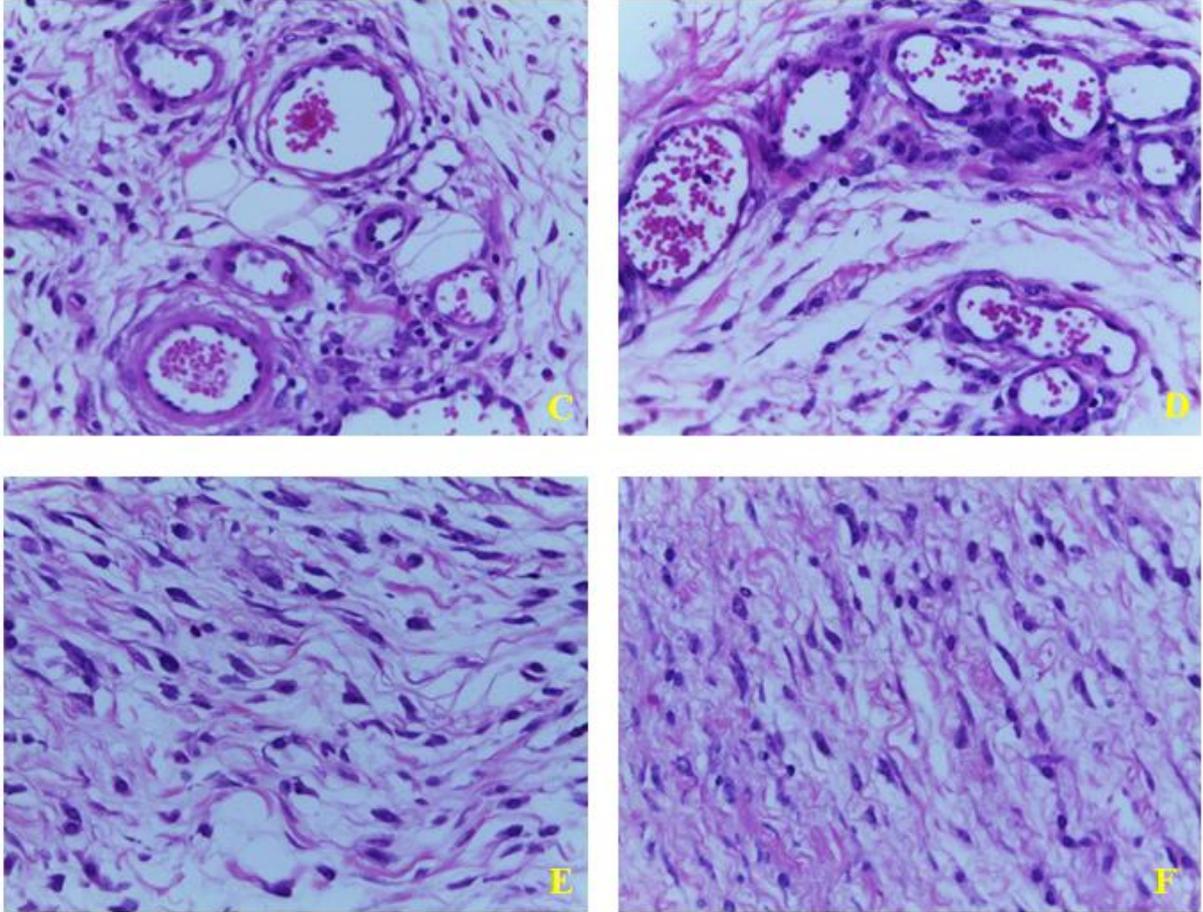
Corroborando com esses achados, um estudo realizado por Abreu et al., 2012 demonstrou que o aplicação tópica de extrato de própolis a 30% foi capaz de promover a fibroplasia, a re-epitelização e aceleração da cicatrização quando comparada a um grupo controle

Figura 9 – Aspecto histológico das feridas cutâneas, (A) ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do Grupo experimental (GE), nota-se infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares discreto e em (B) Grupo controle (GC), infiltrado inflamatório de células intenso. Obj. 20x. Barra de escala = 200µm



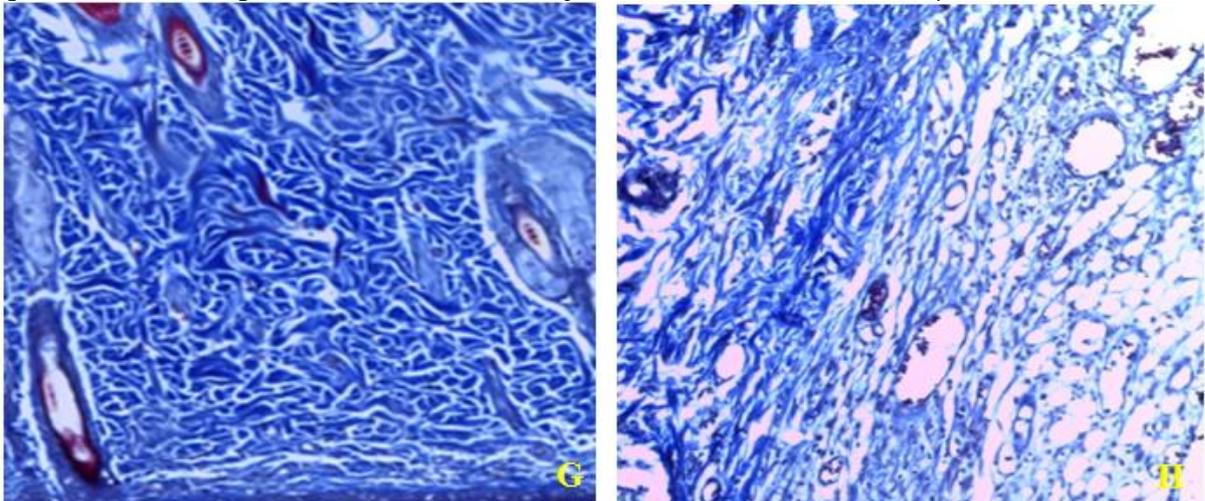
Fonte: Acervo do autor

Figura 10 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica, (C) no Grupo experimental (GE) e (D) no Grupo Controle (GC), nota-se presença de tecido de granulação com vasos sanguíneos e células mono nucleares. Obj. 5x. Barra de escala = 500µm. (E) Nota-se, presença de maior quantidade de fibroblastos em (GE) e menor quantidade de fibroblasto em (GC) (F). Obj. 20x. Barra de escala = 200µm



Fonte: Acervo do autor

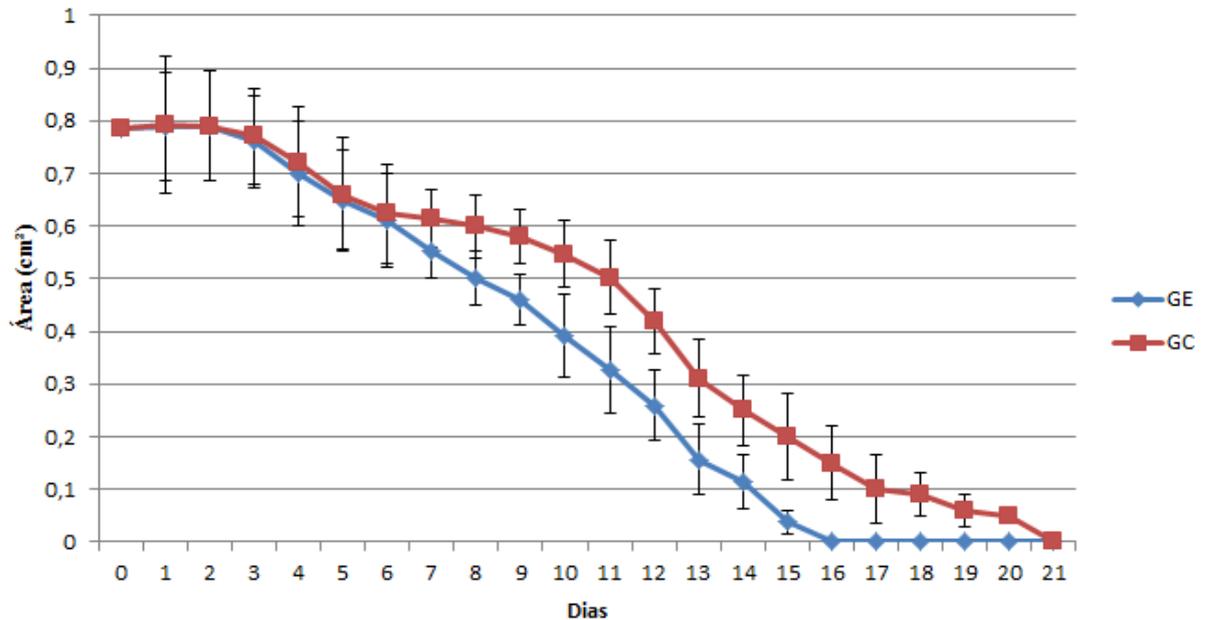
Figura 11 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução pós-cirúrgica, (G) Grupo Experimental (GE), nota-se maior quantidade de fibras colágenas e menor quantidade no Grupo Controle (GC) (H). Obj. 20x. Barra de escala = 200µm



Fonte: Acervo do autor

Quanto à área da ferida, verificou-se diminuição progressiva do tamanho ao longo do tempo, com diferença significativa, entre o (GE) e (GC) a partir do nono dia. No décimo sexto dia as feridas dos animais do (GE) estavam completamente fechadas, enquanto que no (GC), o fechamento das feridas ocorreu no vigésimo primeiro dia (Figuras 12).

Figura 12 – Gráfico do valor médio \pm desvio padrão das áreas das feridas em animais do Grupo Experimental (GE) e Grupo Controle (GC)



Fonte: Acervo do autor

A Figura 12 mostra que entre e dentro de cada grupo experimental (GE) para os dias estudados, utilizou-se teste t independente e Análise de Variância (ANOVA One Way) seguida por Tukey respectivamente. Valores percentuais tiveram transformação arcoseno. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Uma ampla variedade de produtos naturais possuem condições de otimizar os eventos envolvidos no processo cicatricial, e assim promover aceleração do reparo tecidual. Pela facilidade de utilização, inocuidade, baixo custo e poder bactericidas ou bacteriostáticos alguns produtos naturais têm sido utilizados no tratamento de feridas (RAHAL et al., 2003). Nesse sentido, o emprego do uso de cremes ou extratos de própolis tem sido amplamente testado na dermatologia no tratamento de feridas abertas, queimaduras e úlceras externa, com resultados promissores por apresentar propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (GREGORY et al., 2002; BARBOSA et al., 2009; MOURA et al., 2011; PESSOLATO et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

A geoprópolis produzidas no semiárido Norte Rio-grandense por abelhas *P. aff. flavocincta*, apresentou eficácia nas atividades farmacológicas testadas. Todos os resultados obtidos favorecem a fundamentação para utilização da geoprópolis de *P. aff. flavocincta* como princípio alternativo e natural, nas atividades antibacteriana, cicatrizante e antioxidante, caracterizando por ser fonte de compostos fenólicos. Os dados obtidos neste estudo ressaltam a importância do controle de qualidade e contribuem para a padronização e caracterização desse tipo de própolis.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. M. et al. Effect of topical application of different substances on fibroplasia in cutaneous surgical wounds. **ISRN Dermatology**, v. 2012, p. 1-5, 2012.
- AHMED, E. T.; ABO-SALEM, O. M.; OSMAN, A. The influence of egyptian propolis on induced burn wound healing in diabetic rats; antibacterial mechanism. **Science Journal of Medicines and Clinical Trials**, v. 11, n. 3, p. 21-29, 2011.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A. Notas sobre a Bionomia de *Melipona mandacaia* (Apidae: Meliponina). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 204-212, 2007.
- ARVOUET-GRAND, A. et al. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 49, n. 6, p. 462-468, 1994.
- BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 190-193, 1999.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n. 6, p. 530-533, 2002.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 2, p. 239-246, 2000.
- BARACHO, N. C. V. et al. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: Estudo experimental. **Revista Científic@ Universitas**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2009.
- BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- BARROSO, P. R. et al. Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 5, p. 289-294, 2012.
- BARTH, O. M.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do Rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico**, v. 19, n. 1, p. 277-290, 2009.
- BASTOS, E. M. et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.

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

BATISTA, L. L. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF[®]), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 512-521, 2012.

BEZERRA A. M. F. et al. Action of Propolis on Microorganisms of the Oral Cavity: an Integrative Review. **International Archives of Medicine**, v. 8 n. 118, p. 1-13, 2015.

BISPO JUNIOR, W. B. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 3-10, 2012.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49, n. 12, p. 712-718, 1994.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da União], Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p. 18.

BRUENING, H. **Abelha jandaíra**. 2. ed. Mossoró: Coleção Mossoroense, 1990. 181p.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

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

CÁMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs.). **Catalogue of Bees (HYMENOPTERA, Apoidea) in the Neotropica Region – online version**. 2013. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

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

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

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

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

CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. In: Florio, R. M. **Em Bees: Biology, Threats and Colonies**. New York, Nova Science Publishers, 2012. p. 147-168.

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

CASTRO, M. L. et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 9, n. 25, p. 1-6, 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement**. Wayne: CLSI document M100-S21, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

COSTA, C. C. A. et al. Origem floral dos recursos coletados por *Melipona subnitida* e *Plebeia aff flavocincta* (Apinae, Meliponini) em ambiente de caatinga. In: CONGRESSO NORDESTINO DE APICULTURA E MELIPONICULTURA - ABELHA E MEIO AMBIENTE: DESENVOLVIMENTO COM SUSTENTABILIDADE, 3. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. **Anais...** João Pessoa-PB, 2013.

CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, p. 1-9, 2013.

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

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

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

EL HADY, A. F. K.; HEGAZI, A. G. Egyptian propolis 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n. 4, p. 386-394, 2002.

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

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

FIANCO, A. L. B. et al. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). **Revista Liberato**, v. 14, n. 21, p. 1-112, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* "in vitro". **Acta Scientiarum, Animal Sciece**, v. 26, n. 1, p. 69-77, 2004.

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

GREENAWAY, W. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46, p. 111-121, 1991.

GREGORY, S. R. et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazina naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 77-83, 2002.

HAN, M. C. et al. Effects of Turkish Propolis and Silver Sulfadiazine on Burn Wound Healing in Rats. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, n. 12, p. 624-627, 2005.

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

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. *Plebeia flavocincta* (Cockerell, 1912). **Catalogue of Life**. 2011. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011/details/species/id/6972136/source/tree>> Acesso em: 15 nov. 2015.

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

KARTAL, M.; KAYA, S.; KURUCU, S. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n. 10, p. 905-909, 2002.

KERR, W. K.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú, 1996. 157p.

KHORASGANI, E. M.; KARIMI, A. M.; NAZEM, M. R. A comparison of healing effects of propolis and silver sulfadiazine on full thickness skin wounds in rats. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n. 2, p. 72-74, 2010.

KOLING, D. F.; MORETTO, G. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. **Apidologie**, v. 41, n. 4, p. 454-462, 2010.

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

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

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEITÃO, D. P. et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 108, p. 1-9, 2011.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MANDELBAUM, S. H. et al. Cicatrization: current and auxiliary resources - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 1-17, 1995.

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

MARCUCCI, M. C.; CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. Identification of amino acids in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51, p. 11-14, 1996b.

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

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, n. 2, p. 76-81, 2000.

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

MARKHAN, K. R. et al. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.

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

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 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, n. 2, p. 127-130, 2001.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 992p.

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

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

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Tecnapis, 1997. 447p.

- NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.
- OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208- 213, 2011.
- OLIVEIRA, D. S. et al. Vitamina C, carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.
- OLIVEIRA, K. A. M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211-222, 2012.
- ORSI, R. O. et al. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.
- ORSI, R. D. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 108-112, 2006.
- ORSI, R. O. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 748-757, 2007.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composite of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002a.
- PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002b.
- PARK, J. H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.
- PEREIRA, A. S. et al. Distribution of quinic acid de- Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, n.8, p. 590-593, 2003.
- PEREIRA, D. S. et al. Abelhas indígenas criadas no Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 81-91, 2011.
- PESSOLATO, A. G. et al. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.
- PINTO, M. S. et al. Efeito de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

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

RAHAL, S. C. et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 61-67, 2003.

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

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

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

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

SANTOS, C. R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 71-74, 2003.

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

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

SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 27, p. 1-10, 2011.

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

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

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Boletim Estatístico de Micro e Pequenas Empresas. Observatório SEBRAE, 1º semestre, 2005. 2006.

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

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

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

SILVA, R. A. D. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

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

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002. 253p.

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

SIMÕES, C.M. O. et al. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5. Ed. Florianópolis: Ed. UFRGS, 2004. 821p.

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

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.177- 181, 1995.

SOUSA, D. M. N. et al. Prospecção fitoquímica, toxicidade in vitro e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134-140, 2015.

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

SOUZA, R. C. S. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333-336, 2004.

SOUZA, J. A. M.; GONÇALVES, G. M. S. Avaliação da ação antioxidante de substâncias ativas cosméticas destinadas à prevenção da fotoenvelhecimento cutâneo. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA, 13. PUC. Anais... Rio de Janeiro- RJ, 2008.

SOUZA, F. B. R. et al. Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science and Animal Health**, v. 1, n. 1, p. 24-37, 2013.

TAZAWA, S. et al. Studies on the constituents of Brazil- Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1.477-1.479, 1998.

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

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

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

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. **Blackwell Scientific Publications**, v. 38, n. 4, p. 1064, 1994.

WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: Ninth informational supplement NCCLS document M100-S9. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. p. 1-188.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. In: LEAL., I. R., TABARELLI M., SILVA J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003. p. 75-134.

ZUNINI, M. P. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.

ANEXO A – Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)



Governo do Estado do Rio Grande do Norte
Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA
BR 110, KM 48 - Rua Prof. Antonio Campos, s/n - Costa e Silva - Fone: (84)3318 - 2596
Home Page: <http://www.uern.br> - e-mail: ceea@uern.br - CEP: 59610-090- Mossoró - RN

PARECER CONSUBSTANCIADO CEEA/UERN Nº 001/15

Nº PROTOCOLO (CEEA)	001/15
Título do Projeto	Atividades biológicas, ação antioxidante e quantificação dos teores de fenóis totais e flavonoides dos própolis das abelhas amarela (<i>Frismelitta varia</i>), cupira (<i>Partomona cupira</i>), jandaira (<i>Melipona subnitida</i>) e mosquito <i>Plebeia aff. flavocincta</i> (Cockerell, 1912).

1 – RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(a) relator(a)

Própolis é um material resinoso que apresenta diversas propriedades sendo produzido por diferentes espécies de abelhas. Pouco se conhece da constituição química e atividades biológicas das própolis das abelhas amarela (*Frismelitta varia*), cupira (*Partomona cupira*), jandaira (*Melipona subnitida*) e mosquito *Plebeia aff. flavocincta* (Cockerell, 1912), podendo essas representarem uma alternativa terapêutica para várias doenças. Neste estudo será realizada uma análise da composição química e avaliação das atividades biológicas das própolis produzida por abelhas sem ferrão. Para avaliar a ação antibacteriana *in vitro* será utilizado o método de difusão em agar, na atividade antioxidante o método sequestrador de radicais livres DPPH, na ação cicatrizante serão feito estudos em ratos, sendo os mesmos submetidos a lesão circular em cirurgia única de 1x1cm de diâmetro na região dorso-lombar onde receberão a aplicação imediata do creme a base de própolis após cirurgia, as aplicações serão diárias com intervalo de 24 horas, durante os períodos experimentais de 3,7,14 e 21 dias, posteriormente aspectos histológicos serão avaliados. Serão 5 tratamentos (um para cada própolis testada e um controle), cada um com 4 grupos de 6 animais cada, num total de 120 animais. Serão utilizados ratos mantidos no biotério da UERN em condições padronizadas. Detalhamento experimental. para a realização das feridas cutâneas, os animais serão anestesiados através da técnica dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10mg kg-1) e cloridrato de cetamina (50mg kg-1), administrado por via intramuscular. Após anestesia, será feitas tricotomia e antisepsia do local cirúrgico com iodopovidona 1%. Com auxílio de um molde ($\varnothing = 1,0$ cm de diâmetro), a pele da região dorsolombar será divulsionada, expondo a fáscia muscular. O creme será aplicado imediatamente após cirurgia e, posteriormente, uma vez ao dia, nos três primeiros dias será utilizado analgésico (meloxicam 2 mg/kg). As lesões serão medidas diariamente, em seu diâmetro maior e menor, empregando-se paquímetro. No 3º, 7º, 14º e 21º dia pós-operatório, será realizado eutanásia dos respectivos grupos de animais com uma superdose de cloridrato de xilazina (30mg/mL-1) e cloridrato de cetamina (150mg/mL-1) administrado por via intramuscular, associado ao cloreto de potássio (3ml) intracardíaco. Será retirado fragmentos de 1,5 X 1,5cm da pele, abrangendo a área da lesão e a pele íntegra, os quais serão fixados em formalina a 10%. Os tecidos fixados serão incluídos em parafina, cortados a uma espessura de 5 micrômetros e corados pela HE. Os cortes histológicos serão examinados para quantificação de células polimorfonucleares, macrófagos, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas,

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA/UERN Home Page: www.uern.br e-mail: ceea@uern.br

1/2

--

2 – ENTENDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O projeto apresentado pode ser executado, a partir da liberação deste parecer. Após o período de realização da pesquisa, o pesquisador deverá preparar um relatório final e em seguida encaminhá-lo a este CEEA.

3- PARECER

Protocolo de Pesquisa Aprovado.

Mossoró, 09 de 09 de 2015.

Paula V.S. Moreira
Paula Vivianne Souza de Queiroz Moreira
Vice-coordenadora do CEEA/UERN