



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-  
BRASILEIRA – UNILAB  
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO – PROGRAD  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA – ICEN  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS DA NATUREZA E MATEMÁTICA  
– CNeM**

**RAMALHO RAMOS MARTINS NOVO**

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E ATIOXIDANTE DA CERA DE ABELHA BRUTA  
(*Apis mellifera*) ENCONTRADA NA REGIÃO DO MACIÇO DE BATURITÉ**

**ACARAPE- CE**

**2017**

Ramalho Ramos Martins Novo

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E ATIOXIDANTE DA CERA DE ABELHA BRUTA  
(*Apis mellifera*) ENCONTRADA NA REGIÃO DO MACIÇO DE BATURITÉ**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) como requisito parcial para obtenção do título de Licenciatura em Ciências da Natureza e Matemática (CNeM) com Habilitação em Química do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza (ICEN).

Orientador: Professor Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

ACARAPE - CE

2017

Ficha Catalográfica da Biblioteca

RAMALHO RAMOS MARTINS NOVO

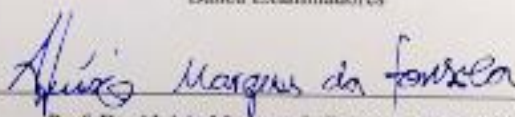
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E ANTIOXIDANTE DA CERA DE ABELHA  
BRUTA (*Apis mellifera*) ENCONTRADA NA REGIÃO DO MACIÇO DE  
BATURITÉ

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) como requisito parcial para obtenção do título de Licenciatura em Ciências da Natureza e Matemática (CNeM) com Habilitação em Química do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza (ICEN).

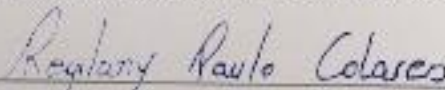
Orientador: Professor Dr. Aluisio Marques da Fonseca.

Aprovado em: 15/12/2017

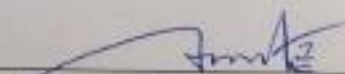
Banca Examinadores



Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca (Orientador)  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regilany Paulo Colares - [Examinador 1 ]  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB



Prof. Dr. José Berto Neto [Examinador 2 ]  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

A Deus

Ao meu pai, Manuel Novo e a minha mãe Delfina Martins.

Aos meus irmãos, Fidelia, Lucindo, Nazário, Alexandrino, Alexandrina.

Aos meus sobrinhos, Saderino, Saderina e Edyge.

Em memória dos meus irmãos, Jecoro e Zaime

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força, saúde, por me guiar e proteger em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Manuel Novo e Delfina Martins, pela dedicação, pelo amor, confiança, pelo apoio durante os estudos para alcançar o meu objetivo mesmo de longe.

Especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca. Pela orientação, pela oportunidade, pela confiança depositada em meu trabalho, pela paciência e por disponibilizar seu tempo para me ajudar na realização da pesquisa.

A Nércia Guterres Gusmão, por amor, por sempre me apoiar e me motivar durante esse tempo, Octavio Lisboa, Filomeno de Jesus, Blasco Quefin, Maria da costa Belina, Margareta do Carmo, Anita Juviana pela ajuda de todos, tanto nas práticas laboratoriais como na execução do presente Trabalho Conclusão do Curso (TCC).

Ao meu amigo Assis Anderson pela ajuda no desenvolvimento do meu Trabalho Conclusão do Curso (TCC).

Aos técnicos do laboratório da Química na Unilab, Camila Peixoto de Valle, Davino Andrade Neto, Ethanielda de Lima Coelho e Ana Kátia pela ajuda na realização da análise e pela disponibilidade do seu tempo para me ajudarem.

À técnica do laboratório da microbiologia, Livia Coelho de Assis pela disponibilidade e ajuda na realização da análise microbiana.

Aos companheiros de laboratório, Camila Peixoto, Davino Neto, Ethanielda Lima, Ana Kátia, Livia Coelho, Tatyane Bandeira, Roberta Tayane, Sarah Ramos, Blasco, Filomeno, Maria, Raimundo. Agradeço pela amizade e companheirismo.

Aos professores da banca examinadores Profa. Dra. Regilany P. Colares e o Prof. Dr. José Berto Neto pelas valiosas contribuições e pelas sugestões dadas para enriquecer meu trabalho.

A todos os professores do Curso da Ciência da Natureza e Matemática, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab), pelo ensinamento, pela dedicação, motivação e por tudo que vocês fizeram durante minha jornada acadêmica na Unilab, sinto muita honra em ter sido seu aluno. Obrigado por tudo.

Ao nosso governo, República Democrática de Timor Leste (RDTL) pelo apoio financeiro no início dos meus estudos até a minha graduação.

À Unilab, pela oportunidade e pelos conhecimentos durante o meu estudo nesta Universidade.

A Universidade Nacional de Timor Lorosa'e (UNTL) pela oportunidade de continuação dos meus estudos na Unilab.

Aos meus amigos Brasileiros e Africanos, pela ajuda durante período das aulas, e especialmente, aos amigos timorenses do Curso de Ciências da Natureza e Matemática.

Ao Jair Martins, o apicultor da região do maciço de Baturité do distrito de Aratuba, Camarão – CE, por ter cedido a matéria prima para o desenvolvimento de trabalho.

E por fim, a todos aqueles que passaram pela minha vida e que contribuíram de forma direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“A Família é base da sociedade e o lugar onde as pessoas aprendem pela primeira vez os valores que lhes guiam durante toda sua vida”.

São João Paulo II.



## RESUMO

A cera de abelha substancia oleosa que produzida pelas abelhas operarias que quando entra em contato com o ar ele se solidifica e forma uma lamina delgada. A cera de abelha (*Apis melífera*) muito utilizada na fabricação de cosmética e no revestimento de pílulas e confecção de pomadas. O estudo deste trabalho foi verificar as propriedades e aplicabilidade de lipídio encontrado na cera bruto de abelha (*Apis melífera*) para uso na medicina. Neste estudo foi utilizado a cera de abelha (*Apis mellifera*) bruto que foi obtida através de um apicultor da região do maciço de Baturité, no distrito de Aratuba, Camarão – CE. O período de coleta foi 20 a 25 de junho de 2016. As análises foram realizadas no Laboratório Biotecnologia e Ciências Naturais (LaBioCN) ou laboratório química orgânica e inorgânica na UNILAB. A cera de abelha bruto foi triturada e extraída utilizando etanol como solvente. Na sequência, o solvente foi evaporado com auxílio de um evaporador rotativo. Na análise físico-química foram realizados testes para verificar o índice de acidez através da titulação de uma base de hidróxido de sódio (NaOH), índice de saponificação através de uma titulação de uma ácido clorídrico (HCl) e o ponto de fusão do extrato através de um sistema montado. Os resultados das análises físico-química mostraram um índice de acidez de 11,4 mg KOH/g e índice de saponificação de 53 mg KOH/g com turbidez de saponificação entre 62 a 65 °C. A temperatura de fusão do extrato foi 62- 65 °C. O ensaio da toxicidade do extrato da cera de abelha (500, 250, 125, 62,5, 31,2 ppm) frente à larva *Artemia salina* não demonstrou mortalidade das larvas no período de 24 h, e no período de 48 h o extrato apresentou a 26,7 % da mortalidade. A análise contendo o controle negativo (água salina) apresentou 60% mortalidade, isso mostra que o extrato da cera de abelha não é considerado tóxico. Não foi possível calcular a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) devido ao baixo valor de mortalidade apresentado pelo extrato. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* realizada por meio do sequestro de radicais livres DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila). O extrato foi capaz de sequestrar o radical e mostrou atividade antioxidante com IC<sub>50</sub> = 0,218 mg/mL. Logo em seguida, foi calculado o índice de atividade antioxidante com IAA = 1,72 mg/mL, onde apresentou atividade antioxidante forte. Com base nestes estudos pode-se afirmar que a cera de abelha tem boa qualidade por não ser tóxica frente a larva *Artemia salina* e também por ter apresentado a atividade antioxidante. Com estes resultados pode-se concluir que as propriedades apresentadas pelo extrato obtido fazem com que ele seja promissor para uso e aplicações na medicina popular.

Palavras chave; Cera de abelha; Toxicidade; antioxidante.

## ABSTRACT

Beeswax is an oily substance produced by worker bees that when it comes in contact with the air it solidifies and forms a thin sheet. The wax of bee (*Apis mellifera*) much used in the manufacture of cosmetics and in the coating of pills and making ointments. The study of this work was to verify the and applicability of lipid found in the crude beeswax (*Apis mellifera*) for use in medicine. In this study, the crude beeswax (*Apis mellifera*) that was obtained through a beekeeper from the region of the Baturité massif, in the district of Aratuba, Camarão- CE. The collection period was June 20 to 25, 2016. The analyzes were carried out in the Laboratory Biotechnology and Natural Sciences (LaBioCN) or chemical laboratory organic and inorganic at UNILAB. The crude beeswax was crushed and extracted using ethanol as the solvent. Subsequently, the solvent was evaporated with the aid of a rotary evaporator. In the physical-chemical analysis, tests were carried out to verify the titration of a base of sodium hydroxide (NaOH), index by titration of a hydrochloric acid (HCl) and the extract through an assembled system. The results of the physical- showed an acid value of 11.4 mg KOH / g and a saponification index of 53 mg KOH / g with saponification turbidity between 62 to 65 o C. The melting temperature extract was 62- 65 C. The assay of the toxicity of beeswax extract (500, 250, 125, 62.5, 31.2 ppm) against larva *Artemia salina* did not show larval mortality in the period of 24 h, and in the period of 48 h the extract presented 26.7% of the mortality. The analysis containing the negative control (saline water) presented 60% mortality, this shows that the beeswax extract is not considered to be toxic. Could not calculate the 50% lethal dose (LD 50) due to the low mortality value presented by the extract. The antioxidant activity of the extracts was determined by the photocolorimetric method *in vitro* by free radical sequestration DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl- hydrazyl). The extract was able to sequester the radical and showed antioxidant activity with IC 50 = 0.218 mg / mL. The activity index was then calculated antioxidant with IAA = 1.72 mg / mL, where it presented strong antioxidant activity. With Based on these studies it can be stated that beeswax has good quality because it is not toxic to larvae *Artemia salina* and also for having presented the activity antioxidant. With these results it can be concluded that the presented properties by the extract obtained make it promising for use and applications in medicine popular.

Key words; Beeswax; Toxicity; antioxidant.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 01</b> - Reação envolvida na titulação de ácidos graxos com solução alcalina de hidróxido de sódio.....	24
<b>FIGURA 02</b> - Reação paralela de saponificação de uma molécula de triglicerídeo.....	24
<b>FIGURA 03</b> - Reação de estabilização do radical livre DPPH.....	27
<b>FIGURA 04</b> – Cera de abelha bruto que obtida do apicultor na região do maciço de Baturité .....	28
<b>FIGURA 05</b> - A criação das larvas <i>Artemia salina</i> na água salina foi submetido um período de 24 a 48 h com a iluminação artificial.....	30
<b>FIGURA 05</b> - Criação das larvas <i>Artemia salina</i> contendo solução salina e amostra cera de abelha.....	31

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Ciclo de desempenho de tarefas dentro da colmeia pela operária das abelhas <i>Apis mellífera</i> .....	18
<b>Tabela 2</b> – Potencial antioxidante de acordo com o índice da atividade antioxidante.....	33
<b>Tabela 3</b> – Resultado da extração da cera de abelha com solvente Etanol P.A.....	34
<b>Tabela 4</b> – Resultado da caracterização da cera de abelha.....	34
<b>Tabela 5</b> – valores de índice de acidez da cera de abelha.....	35
<b>Tabela 6</b> – Resultado do teste toxicidade frente das larvas <i>Artemia salina</i> do extrato Etanol da cera de abelha durante um período de 24h.....	36
<b>Tabela 7</b> – Resultado do teste toxicidade frente das larvas <i>Artemia salina</i> do extrato Etanol da cera de abelha durante um período de 48h.....	36
<b>Tabela 8</b> - Resultado da análise atividade antioxidante com sequestro radical livre DPPH através da Espectrofotômetro de Ultravioleta UV/Vis.....	38

**LISTA DO GRÁFICO**

<b>Gráfico 01</b> – Percentagem (%) de inibição do radical livre do DPPH em relação às concentrações de amostra do extrato da cera de abelha ( <i>Apis mellífera</i> ) .....	38
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. Objetivos</b> .....	16
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	16
<b>2.2. Objetivo específico</b> .....	16
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>3.1. Produção da cera de abelha</b> .....	19
<b>3.2. Classificação da cera de abelha</b> .....	19
<b>3.3. Composição química da cera de abelha</b> .....	20
<b>3.4. Cera de abelha no brasil</b> .....	21
<b>3.5. Utilização da cera de abelha pelo homem</b> .....	21
<b>3.6. Físico-químico da cera de abelha</b> .....	22
3.6.1. Índice de acidez.....	23
3.6.2. Índice de saponificação.....	24
3.6.3. Ponto de fusão.....	25
<b>3.7. Toxicidade</b> .....	25
<b>3.8. Atividade Antioxidante</b> .....	26
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	28
<b>4.1. Obtenção de amostra da cera de abelha</b> .....	28
<b>4.2. Preparação do extrato</b> .....	28
<b>4.3. Análise físico-químico da cera de abelha</b> .....	28
4.3.1. Determinação do índice de acidez.....	29
4.3.2. Determinação do índice de saponificação.....	29
4.3.3. Determinação da temperatura de difusão.....	30
<b>4.4. Teste toxicidade</b> .....	30
<b>4.5. Análise de atividade antioxidante</b> .....	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>5.1. Obtenção do extrato da cera de abelha</b> .....	34
<b>5.2. Caracterização físico-química da cera de abelha</b> .....	34
<b>5.3. Análise da toxicidade do extrato da cera de abelha</b> .....	36
<b>5.4. Análise de atividade antioxidante</b> .....	37
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas da espécie *Apis mellifera* foram introduzidas no Brasil em 1840, vindas da Espanha e Portugal, foram trazidas pelo Padre Antônio Carneiro. Provavelmente, as subespécies *Apis mellifera mellifera* (abelha preta ou alemã) e *Apis mellifera carnica* foram as primeiras abelhas a chegarem no Brasil (CAMARGO, 2002).

Em 1845 e 1880 os imigrantes italianos e alemães respectivamente introduzidas novas colônias da abelha no Brasil, que se estabeleceram no Sul país (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e no Sudeste do país (São Paulo) (BALLIVIÁN, 2008),

As colônias que foram introduzidas no Brasil são criadas pela apicultura. A apicultura é uma atividade de criação das abelhas mais antigas e a mais importante do mundo, e a produção da apícola é utilizado para consumo humano, quando os primeiros homens começaram a coletar o mel para alimentar-se (NUNES, et al., 2012). Para a criação dessa abelha a apicultura depende muito dos recursos naturais, a produção dessa atividade varia de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região (CARVALHO, 2010). O objetivo da criação de abelha especialmente para fins de produção de mel, pólen, geleia real, apitoxina, própolis e cera (NUNES et al., 2012).

A cera é subproduto do trabalho das abelhas operárias dentro da colmeia com idade entre 12 a 18 dias da vida. As abelhas utilizam a cera para a fabricação dos favos, e toda estrutura para armazenamento de alimentos e desenvolvimento das crias. A célula em que guarda o alimento se chama alvéolo. A cera é uma substância oleosa, que se solidifica em forma de lâminas delgadas, quase transparentes quando entra em contato com o ar (CARVALHO, 2010; NUNES et al., 2012).

A cera tem várias utilidades, como na indústria da beleza na fabricação de cosméticos (pomadas, loções, cremes faciais e labiais), indústria de velas, entre outros destinos. Além disso, a cera também é utilizada na indústria de farmacêutica, no revestimento de pílulas, confecção de pomadas, cânforas, na fabricação de graxas, e encáustica (técnica de pintura que utiliza cera), na composição de fita adesiva, gomas de mascar, tintas e vernizes, sendo um excelente isolante elétrico, (NUNES et al. 2012).

Nos últimos anos tem aumentando a área do estudo e o interesse por parte de pesquisadores no aproveitamento de fontes naturais, o produto da cera de abelha que tem a capacidade de uso farmacêutica. E também vários estudos realizados clínicos e pré-clínicos

sobre os produtos naturais em busca de melhoramento na medicina popular para tratar infecções (PONTE, 2003).

No presente estudo como um caminho para descoberta da atividade biológica e antioxidante para uso na farmacológica e na cosmética que poderia ser importante para tratamentos da pele. Deste modo, os estudos também podem contribuir significativamente no desenvolvimento da área de saúde, indústria da beleza e farmacêutica, e tentar descobrir novas substâncias que mais eficazes e menos tóxicas para tratamento da pele e no revestimento de pílula e confecção de pomadas.

No entanto, o estudo vem como objetivo de verificar as propriedades e aplicabilidade de lipídio encontrada na cera de abelha (*Apis mellífera*) para uso na medicina.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar as propriedades e aplicabilidade dos lipídios encontrados na cera de abelha (*Apis mellífera*) para uso na medicina.

### 2.2 Objetivo Específico

- Obter extrato da cera de abelha utilizado como solvente o etanol;
- Realizar testes físico-químicos do extrato da cera de abelha para identificar índice de acidez, índice de saponificação e temperatura de fusão.
- Calcular a Dose Letal (DL<sub>50</sub>) do extrato da cera de abelha através da análise da toxicidade contra larvas *Artemia salina*.
- Calcular o índice de atividade antioxidante do extrato da cera de abelha através da análise de atividade antioxidante como sequestradores do radical livre DPPH

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO

As abelhas, as formigas e as vespas são insetos que pertenciam à mesma família, ordem *Hymenoptera*, onde vivem em colônias ou solitária, mas um dos aspectos que as diferencia são as estruturas morfológicas. Para sua sobrevivência, elas dependem das flores (néctar e pólen) que são a base de alimentos da sua cria (BACAXIXI et al., 2011; MARQUES 2015).

O corpo da abelha é dividido em cabeça, tórax e abdome com um esqueleto externo chamado exoesqueleto, constituído de quitina, o qual lhe fornece proteção para os órgãos internos e sustentação para os músculos, além de proteger o inseto contra a perda de água; possuem aparelho bucal do tipo lambedor com mandíbulas adaptadas para moldar cera e cortar vegetais, e um lábio inferior alongado; antenas geniculadas e na tíbia posterior há uma concavidade chamada corbícula que tem como função o transporte do pólen, nas mamangavas há muitos pelos formando a escopa onde os grãos de pólen ficam aderidos BACAXIXI et al., (2011).

O néctar é uma matéria prima para a produção de mel que tem a base de açúcar e é considerado uma fonte de energia para as abelhas. O pólen é utilizado como fonte de proteína, principalmente para as crias. Além de néctar e pólen, as abelhas também coletam óleos nas flores e outros recursos que importantes para sua manutenção e reprodução, tais como néctar e resinas, que são coletados em outras plantas visitadas (WITTER et al., 2014)

As abelhas vivem em sociedades organizadas, também conhecidas como colônias, a qual comporta centenas até milhares de indivíduos organizados em três grupos principais: operárias, responsável pelo todo o trabalho para a manutenção da colmeia, desde a faxina até a defesa das colônias; rainha e os zangões, responsáveis pela reprodução. No geral, para uma colônia de tamanho médio existe uma rainha e cerca de cem zangões e milhares de operárias (SANTANA 2010; MARQUES 2015 e BACAXIXI et al., 2011).

Segundo Carvalho (2010), as abelhas operárias da colmeia dividem o trabalho conforme sua idade como mostra na Tabela 1 seguinte. Durante quatorze dias as abelhas operarias mais jovens se dedicam para alimentar as larvas, os zangões e a rainha. Logo em seguida, elas tornam-se coletoras (ou campineiras), saem para procurar flores e em busca do néctar e pólen. Quando as abelhas operarias já estão com a idade avançada, elas deixam as tarefas de coleta e voltam aos trabalhos no interior da colmeia. Suas glândulas secretoras, são ativadas e elas transformam-se em "pedreiros", passando a construir e consertar as células, dentro das quais armazenam pólen e mel. As células são alvéolos hexagonais que servem também de ninhos para os ovos da rainha.

**Tabela 1.** Ciclo de desempenho de tarefas dentro da colmeia pela operária das abelhas *Apis mellifera*, CARVALHO (2010).

IDADE	DEVERES	ATRIBUIÇÕES
1 a 3 dias	Faxineiras	Fazem a limpeza e reforma polindo os alvéolos
3 a 7 dias	Cozinheiras	Alimentam com mel e pólen as larvas, com mais de três dias.
	Nutrizes	Alimentam com o mel e pólen as larvas, com idade inferior a três, com geléia real.
7 a 14 dias		
14 a 18 dias	Engenheiras ou Carpinteiras	Segregam a cera e constroem os favos.
18 a 20 dias	Guardiãs	Defendem a colméia contra inimigos.
21 dias até morte	Campeiras	Trazem néctar, pólen, água e resina.

Fonte: CARVALHO (2010).

As abelhas visitam diariamente um grande número de flores em busca de néctar e pólen para satisfazerem suas necessidades alimentares individuais, das crias ou das suas colônias. Nestas visitas as abelhas também executam a polinização, um serviço muito importante. O serviço de polinização é importante tanto para os ecossistemas quanto para a agricultura, (WITTER et al, 2014). Com esses serviços as abelhas *Apis mellifera* são conhecidos como principais polinizadores das plantas, (SANTANA e OLIVEIRA 2010; MARQUES 2015).

Segundo Macêdo (2012) e Roberto (2015), as abelhas são responsáveis pela maior parte da polinização que acontece nas plantas, o restante, é responsabilidade de abelhas solitárias, borboletas, coleópteros, morcegos, aves e alguns mamíferos. As abelhas são atraídas pelas flores por causa dos principais alimentos que são pólen e néctar que possuem uma substância açucarada. Além disso, o vento e a água também contribuem na polinização das plantas. No entanto as abelhas serem conhecido como grandes polinizadores das plantas, conseguem produzir uma grande produção de mel, própolis, cera e geleia real (MARQUES, 2015).

As abelhas utilizam a cera na construção dos favos para armazenamento de alimento (alvéolos e opérculos), o lugar onde as ceias se desenvolvem, além disso a cera também compõe

a construção da própolis. Hoje em dia, muitas empresas usam a cera como principal componente ou parte de alguns produtos, (NUNES et al., 2012).

### **3.1 Produção da cera**

A cera de abelha é material fundamental na construção de suas colmeias. Ela também é muito importante para colônia, que sem a cera não existiria a colmeia. Na sua obra de construção da colmeia as abelhas sempre aplicam a cera com cuidado e de forma delicada para não desperdiçar (ZIEGLER; SINIGAGLIA e MICHELS 2016).

A cera é produzida pelas abelhas operárias dentro da colmeia com idade entre 12 a 18 dias da vida. Neste período de tempo as suas glândulas cerígenas já alcançam o máximo da sua produção. A cera é secretada por quatro pares de glândulas cerígenas situadas no lado ventral do abdômen. Para produzir um quilo de cera, as abelhas precisam consumir em torno de seis a sete quilos de mel, e a média de produção de cera corresponde a 2% da produção normal de mel. As abelhas utilizam a cera para o desenvolvimento da criação, armazenamento do mel e pólen, além disso eles usam a cera para controlar ou regular a temperatura e odores dentro da colônia. A cera imediatamente secretada é branca, modificando sua coloração após a incorporação de pólen, casulos e restos larvais, apresentando tons variados de amarelo, (BARROS et al., 2009; LIRA 2011 e NUNES et al., 2012).

A cera geralmente utilizada pelas abelhas para construção dos favos, armazenamento dos alimentos, controlador de umidade e a temperatura dentro da colmeia, também como lar onde as crias se desenvolvem, (BARROS et al., 2009). Pois, ele também faz parte na composição da própolis. As abelhas recolhem essas lâminas de cera do abdômen, mistura com a saliva, (secreções mandibulares) modelam e constroem os favos. Os favos servem para o depósito de alimento e espaço para a postura da rainha, (NUNES et al., 2012).

### **3.2 Classificação da cera de abelha.**

Existem vários tipos de cera alguns vem de origem mineral e outros de origem animais. De origem mineral, como por exemplo, a cerasina e parafina, as sintéticas, onde são obtidas de óleos originários do petróleo, as de origem vegetal, como a cera de carnaúba, e outras ceras que são de origem animal, onde a mais conhecida é a cera de abelhas (ZOVARO 2008).

Segundo o regulamento técnico para fixação da identidade e qualidade de cera de abelhas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do BRASIL (2001), classificou-se a cera de abelhas em dois grupos, que podemos citados abaixo:

- Cera bruta – A cera que não tiver passando por qualquer processo de purificação, e a cloração de cera apresenta a coloração amarelo até o pardo, untuosa ao tato, mole e plástica ao calor da mão, fratura granulosa, o odor dele lembrando o do mel, sabor levemente balsâmico e ainda com traços de mel;
- Cera branca ou pré-beneficiada quando tiver sido descolorida pela ação da luz, do ar ou por processos químicos, isenta de restos de mel, apresentando-se de cor branca ou creme, frágil, pouco untuosa e de odor acentuado.

A coloração da cera de abelha varia de branca a amarelo escuro e nessa cloração pode ser contaminado com pólen que encontrado no mel, e também o excesso de fervura pode afetar a cera se torna escura ou quase preta. Além disso a acumulação da impureza dos materiais da abelha também afeta as partículas de própolis e faz com que as própolis se torna escura (NUNES et al., 2012).

### 3.3 Composição química da cera

A substância de cera da abelha *apis mellifera* é secretada por meio de oito glândulas cerígenas, que estão situadas na parte inferior do abdômen da abelha, e liberado em forma líquida que entra em contato com o ar ele se solidifica, maciça, de consistência escorregadia, graxa e se torna uma lâmina branca que são perfeitamente visíveis (NUNES et al., 2012).

A cera de abelhas é formada através da mistura de substâncias com a caráter lipídico e são hidrofóbicos. Em seu composto é bastante complexo, e essa mistura inclui hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, monoésteres, diésteres, triésteres, hidroximonoésteres, hidroxipoliésteres, monoésteres de ácidos graxo, poliésteres de ácidos graxos, e alguns compostos não identificados. A variação que acontece na quantidade da cera é dependente dos diferentes compostos presentes na natureza. Também dependendo da sua subespécie de *Apis mellifera*, da idade de cera, e da condição climática da sua produção (BARROS et al., 2009).

A composição química da cera de abelha apresenta 70 a 72% de ésteres; 14 a 15% de ácidos céricos livres; 12% de hidrocarbonetos predominante saturados; 1% de álcool. A característica física da cera é estável, acima da temperatura 30°C ele tornasse plástica, podendo

ser moldado e em temperatura fria ele fácil de quebrar (ZIEGLER; SINIGAGLIA e MICHELS 2016).

Segundo BARROS et al. (2009), em cada família de compostos é constituída por uma série homóloga, diferindo entre si no tamanho da cadeia por dois átomos de carbono. Na família dos hidrocarbonetos encontram-se dois grupos de compostos mais abundantes, os alcanos e os alcenos. Entre os alcanos, os mais abundantes são moléculas lineares, apresentando um número ímpar de átomos de carbono com 23 a 31 átomos de carbono. Os alcenos mais abundantes são moléculas com um número ímpar de átomos de carbono, maioritariamente com 27 a 39 átomos de carbono, com uma dupla ligação cis na posição 10. O conteúdo de hidrocarbonetos na cera de *A. mellifera* varia entre 14 a 16%, sendo o alcano com 27 átomos de carbono o mais abundante (>5%).

Os ácidos graxos livres representam 12-15% da cera de abelha, sendo esta família de compostos constituídos por ácidos graxos de cadeia linear com um número par de átomos de carbono, na sua maioria por 20 a 36 átomos de carbono. O ácido graxo mais abundante na cera de abelha é o ácido tetracosanóico, representando aproximadamente 6% da cera de abelha, (BARROS et al., (2009).

### **3.4 Cera de abelha no Brasil**

Segundo Lira (2011), com a autorização de D. Pedro II (Decreto nº 72 de 12 de junho de 1839), as abelhas da espécie *Apis mellifera* foi entrar no Brasil levado pelo Padre Antônio pinto carneiro com o objetivo de obtenção da cera que é um dos principais produtos produzido pela abelha para fabricar as velas que são utilizadas na liturgia da igreja católica. Conforme (GONÇALVES, 2004), a exploração da cera foi uma das primeiras atividades praticadas com abelhas do gênero *Apis* no Brasil, utilizando-se abelhas eslovenas (*Apis mellifera carnica*), caucasianas (*A. m. caucasiana*), dentre outras subespécies introduzidas no País. Portanto, durante a fase inicial da apicultura brasileira as primeiras colônias foram trazidas principalmente para atender as necessidades dos religiosos que demandavam a cera para fabricação de velas.

### **3.5 Utilização da cera pelo homem**

As abelhas já assumiram tanta importância para o homem que foram consideradas sagradas para muitas civilizações. Com isso, várias lendas e cultos surgiram a respeito desses

insetos. Com o tempo, elas também assumiram grande importância econômica e a ser considerado um símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas, mantos reais, entre outros (NUNES et al., 2012).

A cera tem sido utilizada pelos humanos desde antes de Cristo. Os egípcios a utilizavam para conservar o corpo de pessoas importantes após falecimento, ou seja, no processo de mumificação. A palavra múmia possui origem persa e deriva da palavra “moum” que significa cera. Entre os romanos a cera servia para ser feitas esculturas do perfil humano, sendo ainda utilizada pelos povos na antiguidade em cerimônias religiosas. Na idade média os escribas utilizavam pedaços de madeira recobertos com uma fina camada de cera, escrevendo por cima da cera com estiletes (NUNES et al., 2012).

Os maiores consumidores de cera são as indústrias de cosméticos (pomadas, loções, cremes faciais e labiais), indústria de velas e indústria apícola. Outros usam na fabricação de cremes para calçados, em materiais de impermeabilização, indústria de armamento, polimento para pisos, móveis, couros e lentes telescópicas; na indústria farmacêutica, no revestimento de pílulas, confecção de pomadas, cânforas, na fabricação de graxas, e encáustica (técnica de pintura que utiliza cera), na composição de fita adesiva, gomas de mascar, tintas e vernizes, sendo um excelente isolante elétrico (NUNES et al., 2012).

O uso "farmacêutico" da cera de abelha remonta ao antigo Egito. A cera de abelha foi o ingrediente principal em muitas receitas para a preparação de pomadas e cremes usados para ajudar a tirar rugas faciais, para tratar queimaduras e feridas e para aliviar a dor nas articulações. Na Roma antiga, muitos médicos costumavam fazer aplicações de um creme conhecido como "creme frio", a partir do azeite, cera de abelha e água de rosas para o tratamento de queimaduras, feridas, cortes, hematomas e fraturas (FRATINI et al 2016).

A cera de abelha desempenha um papel importante também na medicina ayurvédica, e na medicina tradicional antiga, com o nome de Madhuchishtha. Nos países ocidentais, a busca de produtos naturais a serem usados junto com drogas ou, mesmo, para substituí-las, levou a uma "redescoberta" da medicina (FRATINI et al 2016).

### **3.6 Caracterização físico-químico da cera de abelha**

Segundo BRAGHINI (2013), a composição física e química da cera é variável devida a alguns fatores como condições climáticas, estágio de maturação da abelha operarias, tipo de florada, espécie de abelha, fontes vegetais dos qual é derivada, solo, processamento e

armazenamento. Muitos parâmetros são analisados com o objetivo de comparar tais resultados com padrões ditados por órgãos oficiais internacionais ou estabelecidos pelo próprio país, garantindo assim a qualidade e fiscalização da cera.

Conforme Freitas (2011), as ceras apresentam propriedades biológicas e mecanismo especificada. Atualmente, as ceras naturais são amplamente utilizadas na indústria têxtil, alimentícia (chicletes, chocolates, frutas), química, farmacêutica, na medicina, na fabricação de diversos tipos de cosméticos (emulsão, cremes, batons), na indústria de papel e embalagens, na produção de tintas e no setor de polimento (pisos, sapatos, automóveis), na restauração de pinturas em telas e modelagem (NUNES et al., 2012), a valorização destas ceras depende da sua composição e suas propriedades físico-químicas.

Segundo Brasil (2001) a cera de abelha destinada à comercialização deve atender aos requisitos mínimos de composição e qualidade. É caracterizada como um produto secretado pelas abelhas para formação dos favos nas colmeias de consistência plástica, de cor amarelado-parda, de fácil fusão, e quando não tiver passado por qualquer processo de purificação, untuosa ao tato, mole e plástica ao calor da mão, fratura granulosa, odor lembrando o do mel, sabor levemente balsâmico, temperatura de fusão 61°C a 65°C, insolúvel em água e álcool frios, parcialmente solúvel em álcool quente, óleos voláteis, éter, clorofórmio e benzeno, índice de acidez de 17 a 24 mg KOH/g, índice de ésteres 72 a 79, índice de relação de ésteres e acidez 3,3 a 4,2 e ponto de saponificação turva no máximo 65°C.

### 3.6.1 Índice de acidez

O índice de acidez é um indicador do conteúdo de ácidos gordos livres e mono e poliésteres ácidos presentes na cera (BARROS et al., 2009).

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo vegetal e gordura animais. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicérides é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a acidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (LUTZ, p.595 2008).

Segundo VALLE p.52 (2015), o método do índice de acidez é empregado para determinar a acidez dos óleos vegetais ou animais e gorduras animais. O índice de acidez corresponde ao número de miligramas de KOH necessário para neutralizar a acidez de 1 g de uma amostra de óleo vegetal ou animais e gordura animais (mg KOH/g), sendo essa acidez reflexo da presença de ácidos graxos livres na amostra. A reação ocorrida durante a



determinação é uma neutralização simples. Os ácidos graxos livres reagem com a base titulante, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, formando sais e água.

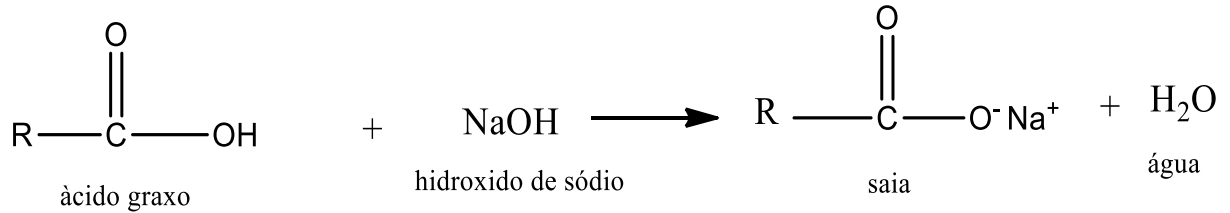


Figura 1. Reação da titulação de ácidos graxos com solução alcalina de hidróxido de sódio.

Fonte: VALLE (2015)

### 3.6.2 Índice de saponificação

O índice de saponificação um indicador do conteúdo de ácidos gordos livres e de ácidos gordos esterificados, os quais são libertados durante o processo de saponificação (BARROS et al., 2009)

Segundo VALLE p.52 (2015), óleo ou gordura quando aquecidos na presença de solução aquosa ou alcoólica de hidróxido de sódio ou potássio, forma-se glicerol e uma mistura de sais alcalinos de ácidos graxos, que são os sabões, caracterizando a reação de saponificação. E essa reação também indica a quantidade de base a ser utilizada para saponificar completamente o óleo, sendo definido como a quantidade de miligramas de hidróxido de potássio requerido para saponificar um grama de óleo ou gordura.

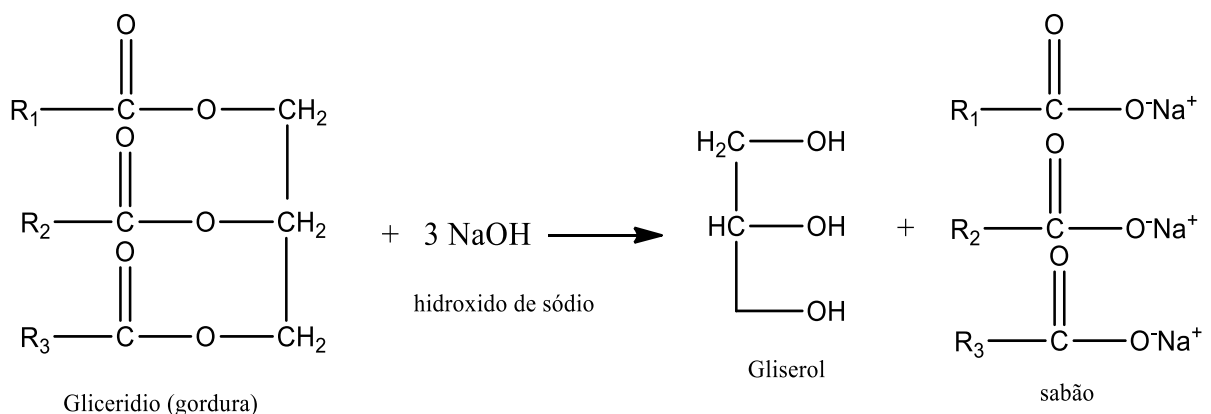


Figura 2. Reação paralela de saponificação de uma molécula de triglicerídeo.

Fonte; VALLE (2015)

### 3.6.3 Ponto de fusão

Os óleos e gorduras naturais, de origem vegetal ou animal, são misturas de glicerídeos e de outras substâncias e consistem de inúmeros componentes. Estas substâncias não exibem um ponto de fusão definido e nem preciso. Portanto, o termo “ponto de fusão” não implica nas mesmas características das substâncias puras de natureza definitivamente cristalina. As gorduras passam por um estágio de amolecimento gradual antes de se tornarem completamente liquefeitas. O ponto de fusão deve ser definido por condições específicas do método pelo qual é determinado e, neste caso, é a temperatura na qual a amostra torna-se perfeitamente clara e líquida (LUTZ p.604 2008).

## 3.7 Toxicidade

Na avaliação da toxicidade dos produtos naturais é realizada para avaliar a segurança no tratamento com fitoterápicos. A necessidade de realizar ensaios com técnicas simples e rápidas levou à busca por novos testes (Silva et al., 2013).

O uso dos produtos naturais baseados na tradicionalidade não é suficiente para validá-las cientificamente como medicamentos eficazes e seguros. Como corpo estranho no organismo, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos até que se comprove a sua eficácia sem danos ao organismo humano (PONTE, 2003). A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um monitoramento rápido e relativamente simples da resposta biológica onde exista apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Portanto os resultados podem ser tratados estatisticamente com maior facilidade. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral, sendo considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, (SILVA et al., 2013).

O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade. Desta forma, *A. salina* tem sido utilizada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos nos extratos, nesse ensaio de toxicidade para este crustáceo tem demonstrado uma boa relação com a atividade citotóxica contra tumores humanos e atividade contra o *Trypanossoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (AMARANTE et al, 2011). As larvas *Artemia salina* Leach são espécies de microcrustáceo marinho (PONTE 2003).

A importância de realização o teste de toxicidade na busca de uma terapêutica eficaz e menos tóxica, trazendo assim um maior conforto e melhor qualidade de vida aos pacientes (HOCAYEN et al., 2012),

### 3.8. Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são um grupo de substâncias ou compostos que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Eles também são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (RODRIGUES, et al. 2017).

Os antioxidantes têm a capacidade de reagir contra os radicais livres diminuindo os seus efeitos nocivos. O termo antioxidante refere-se a compostos químicos que diminuem os efeitos oxidativos de lipídios e protege o sistema biológico contra a reação que podem causar oxidação excessiva, proteínas e ácidos nucleicos causados pelos radicais livres. Em outras palavras, (RUFINO et al., 2007; OLIVEIRA,2017).

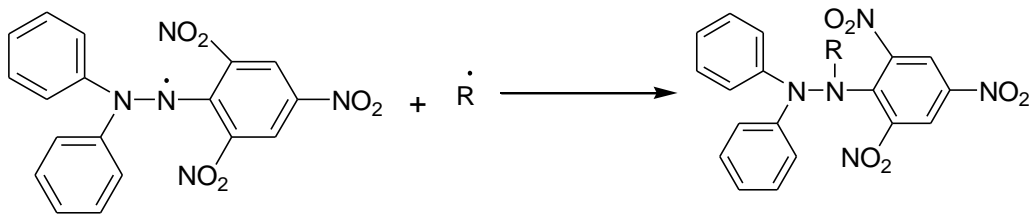
O nome radical livre refere-se a moléculas com átomos reativos que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Eles são moléculas instáveis e altamente reativas, que possuem um elétron não emparelhado em seu orbital. Eles também são conhecidos por desenvolver um papel duplo, como espécie benéfica e deletéria. A produção dos radicais livres contínua pelos sistemas enzimáticos é parte da função celular normal e, em nível moderados, é essencial à saúde por estarem envolvidos em vários processos biológicos. O equilíbrio entre produção e remoção de radical livre é realizado pelo mecanismo de defesa do corpo, que garante as concentrações ideais. Quando há um desequilíbrio causado por produção excessiva de radical livre de forma endógena (reação metabólica) ou por fatores exógenos (radiação ionizantes), ocorre o estresse oxidativo, que está fortemente relacionado a uma ampla variedade de doenças humana (NASCIMENTO, 2016).

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas normais que envolvem reações de transferência de elétrons. Apesar de ser um processo normal na vida dos organismos vivos, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, como artrites inflamatórias, diabetes e processos degenerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson (RODRIGUES, 2017; ANGÉLICA, 2011).

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A propriedade de

sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas ou micro-organismos tem sido recentemente apontada sugerindo um possível papel redutor destes compostos, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares em humanos. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes o método da captura do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila), é baseada na reação química apresentada na figura 4, que avalia essa captura do radical livre DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo na absorbância a 517 nm ou 520 nm. (SANTOS, et al., 2011).

Figura 3. Reação de estabilização do radical livre DPPH



Fonte: (SANTOS et al., 2011)

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção de Amostra da cera de abelha

A cera de abelha foi obtida de um apicultor na região do maciço de Baturité no distrito de Aratuba, Camarão – CE que situada a 868 metros de altitude e tem a seguintes coordenadas geográfico: latitude: 4<sup>o</sup> 13' 35" Sul, longitude: 39<sup>o</sup> 12' 1" Oeste. O período da coleta foi 20 a 25 de junho de 2016. A extração e as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório Biotecnologia e Ciências Naturais (LaBioCN) ou laboratório química orgânica e química inorgânica na UNILAB.



Figura 4. Cera de abelha bruto que obtida do apicultor na região do maciço de Baturité.

### 4.2 Preparação do extrato

A amostra de cera de abelha foi triturada e pesado 33,15 g posterior colocada em um Erlenmeyer de 250 mL. Depois foi adicionado em torno de 150 mL de etanol P.A. A solução ficou em repouso por três dias. Depois, ela foi filtrada e o solvente evaporado com auxílio de um evaporador sob temperatura inferior a 60 °C para retirada do solvente.

### 4.3 Análise físico-químico da cera de abelha

Nas análises físico-químicas da cera de abelha foram realizadas para obtenção do índice de acidez, índice de saponificação e temperatura de fusão. A metodologia utilizada foi a mesma de SANTOS apud BERNAL, (2015) e Lutz (2008).

#### 4.3.1 Determinação do índice de acidez

Na determinação do índice de acidez, 1,0 g de cera de abelha foi colocada dentro de um Erlenmeyer de 250 mL. Depois foram adicionados 50 mL de clorofórmio para solubilizar a amostra, que foi agitada manualmente até a solução ficar homogênea. Em seguida foram adicionadas duas gotas de indicador de fenolftaleína e a solução foi titulada com solução metanólica NaOH 0,05 M. Uma amostra em branco de clorofórmio também foi titulada para correção da acidez do solvente. O índice de acidez (em mg de KOH/g) foi calculado pela fórmula:

$$\text{índice de acidez} = \frac{56,11 \times M \times (V - V')}{m}$$

Onde:

M = molaridade da solução metanol NaOH; V = volume (mL) de solução de metanol NaOH que é necessário para a amostra; V' = volume (mL) de solução de metanol NaOH necessária para o ensaio em branco; m = a massa (g) da amostra de cera de abelha.

#### 4.3.2. Determinação do índice de saponificação

Para determinar o índice de saponificação foi utilizado 1,0 g de amostra cera da abelha. A amostra foi colocada dentro de um tubo de ensaio e foram adicionados 4 mL da solução alcoólica KOH 4M. Em seguida a mistura foi mantida em banho maria com a temperatura aproximadamente de 100 °C durante 1 hora. Depois, toda a amostra foi transferida para uma erlenmeyer de 150 mL. Na sequência foram adicionadas 2 gotas de indicador fenolftaleína para posterior titulação com a solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5M. Um ensaio em branco também foi realizado. As determinações foram feitas em triplicata. À saponificação, expressa em mg de KOH/g, foi calculada pela fórmula:

$$\text{índice de saponificação} = \frac{28,06 \times M \times (V - V')}{m}$$

Onde;

V é o volume (mL), de solução de ácido clorídrico exigido pelo branco; V' é o volume (mL), de solução de HCl necessário para a titulação; M é a molaridade da solução de HCl; e m é a massa (g), da amostra de cera de abelha.

#### 4.3.3 Determinação da temperatura de fusão;

Na determinação da temperatura de fusão da cera de abelha foi utilizado um sistema composto por um béquer de 100 mL e uma chapa aquecedora. Duas gramas de amostra da cera de abelha foram então colocados em um banho da água quente. A temperatura foi aumentada lentamente até a amostra passar do estado sólido para líquido. A temperatura no qual ocorreu este fenômeno foi registrada e a análise foi realizada triplicata.

#### 4.4 Teste Toxicidade

No ensaio de toxicidade do extrato da cera de abelha frente as larvas *Artemia salina* foi realizado através da metodologia adaptado pelo AMARANTE et al., (2011). Uma solução com sal marinho (sal cozinhar) na concentração de 30 gL<sup>-1</sup> foi preparada. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por até 48 horas, com iluminação artificial e temperatura ambiente que variou de 26 a 29 °C.

Figura 5. A criação das larvas *Artemia salina* na água salina com iluminação artificial.



Fonte: Autor.

Depois que as larvas nasceram, foi preparada uma solução do extrato da cera contendo 19 mg do extrato com 19 mL de DMSO 1% (dimetilsulfóxido). Esta solução foi preparada com ajuda de banho ultravioleta, resultando-se em uma solução estoque de concentração 1 mg/mL ou 1000 ppm. Depois foram preparados 5 tubos de ensaio com soluções a partir de solução estoque nas concentrações (500, 250, 125, 62,5, 31,2 ppm). Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo a solução salina e amostras a serem testadas. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo que a contagem das larvas mortas e vivas realizadas após 24 e 48 horas. O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina. Os resultados foram analisados por programa de probit analysis para obtenção da dose letal do extrato para 50% (DL<sub>50</sub>) da população.

Figura 6. Criação das larvas *Artemia salina* contendo solução salina e amostra cera de abelha



Fonte: Autor.

Passado 24 e 48 horas de incubação das larvas de *Artemia salina*, foi realizado a contagem de exemplares de *Artemia salina* vivas e mortas sendo o percentual de sobrevivências calculado através da seguinte fórmula:

$$%M = \frac{y}{x} \times 100$$



Onde;

%M = percentagem de mortalidade, x = número de organismos vivos, y = número total de organismo no tubo.

#### **4.5. Análise da atividade antioxidante**

Na análise da atividade antioxidante do extrato de cera de abelha utilizando o método que proposta pelo RODRIGUES et al. (2017).

A atividade antioxidante dos extratos de cera da abelha foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* realizada por meio do sequestro de radicais livres, usando o DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila). Essa análise é baseada na habilidade de compostos em doar um próton para o radical DPPH e formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre.

##### **4.5.1. Preparação 100 mL da solução Etanol de DPPH.**

Na preparação da solução Etanol do radical livre DPPH 60 $\mu$ M foi pesar 2,4 mg de DPPH e dissolvida em solução Etanol P.A em balão volumétrico até o volume de 100 mL em proteção da luz.

##### **4.5.2. Análise de atividade antioxidante.**

Nesta análise foi preparada uma solução do extrato da cera contendo 10 mL da cera de abelha bruto e diluído com 80 mL de solvente Etanol, a qual foi repouso por 2 horas. Depois foram preparados 5 tubos de ensaio para preparar soluções Etanólicos com extrato nas seguintes concentrações (0,5, 0,25,0,125,0,0625,0,0312 mg/mL), em triplicata. Nessa concentração foram adicionados 2 mL da solução Etanol de DPPH, foram deixados em ambiente escuro por 30 minutos para ocorre a reação. Posteriormente foram medidas as absorbâncias com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV/Vis com comprimento de onda ajustado para 520 nm. Um teste em branco foi realizado com o solvente Etanol para calibrar. Foi utilizado a mistura do solvente Etanol com a solução de DPPH em volume (1:1). Todas as leituras foram realizadas em triplicata e com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase.

A atividade antioxidante (AA) das amostras por sequestro do DPPH foi expressa em percentagem, segundo a equação:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{(\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

Onde,

Abs. DPPH = absorvância da solução etanólico do radical DPPH;

Abs. amostra = absorvância da amostra após 30 minutos de reação com a solução de DPPH.

O valor IC<sub>50</sub> (mg/mL) é a concentração necessário para inibir 50% do radical livre DPPH inicial, foi calculado através de regressão da reta do gráfico.

Devido à dificuldade em padronizar os resultados, o índice da atividade antioxidante (AAI-Antioxidant Activity Index) é um método para avaliar a eficiência do antioxidante considerando a concentração do DPPH e os valores de IC<sub>50</sub>. A índice de atividade antioxidante foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$AAI = \frac{[DPPH]_{total} (mg/mL)}{IC_{50} (mg/mL)}$$

Onde:

[DPPH]<sub>final</sub> = concentração final da solução etanólico de DPPH;

IC<sub>50</sub> = concentração de extrato antioxidante necessária para inibir 50 % do radical DPPH.

Ambos expressos em mg/mL.

**Tabela 2.** Potencial antioxidante de acordo com o índice da atividade antioxidante.

AAI	Capacidade antioxidante
< 0,5	Fraco
0,5 a 1,0	Moderada
1,0 a 2,0	Forte
> 2,0	Muito Forte

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção do extrato da cera de abelha.

No processo de obtenção da amostra bruta da cera de abelha utilizando Etanol como solvente, de 33,15 g de amostra bruta e obteve 12,143 g do extrato e cerca de 36,63 % do extrato extraída como mostra na tabela em baixo. O extrato foi utilizado para realizar as análises.

Tabela 3. Resultado da extração da cera de abelha com solvente Etanol P.A

A cera de abelha bruto	Solvente	Massa obtida do extração (g)	Rendimento do extrato da cera (%)
<b>33,15 g</b>	<b>Etanol.P.A.</b>	<b>12,143 g</b>	<b>36,63 %</b>

### 5.2 Caracterização físico-química da cera de abelha;

Os resultados da característica físico-químico do extrato da cera de abelha estão expressados na tabela 3 abaixo;

Tabela 3. Resultado da caracterização do extrato da cera de abelha

Ensaio	Referencias	Resultados	Unidades
Índice de acidez	SANTOS apud BERNAL, (2015) e Lutz (2008)	11,4	mg KOH/g
Índice de saponificação	SANTOS apud BERNAL, (2015) e Lutz (2008)	53	mg KOH/g
Ponto de fusão	Autor (sistema montada)	62 a 65	°C
Ponto de turbidez no processo de saponificação	SANTOS apud BERNAL, (2015) e Lutz (2008)	62 a 65	°C

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que, o índice de acidez está abaixo do proposto nas legislações BRASIL (2001), mas o índice de saponificação e a temperatura de

fusão da cera de abelha estão de acordo com a legislação. Segundo legislação BRASIL (2001), o índice de acidez deve ter em torno de 17 a 24 mg KOH/g, índice de saponificação observado pela sua turbidez máxima 65 °C, e o ponto difusão entre 61 a 65 °C.

De modo controverso, foi publicado um estudo que mostra na ficha de informações técnicas da cera de abelha um índice de acidez em torno de 7,0 a 12,0 mg KOH/g, um índice de saponificação entre 43,0 a 53,0 mg KOH/g e o ponto difusão entre 60 a 65 °C (GOMES, 2015). Os resultados apresentados pelo autor citado estão de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Por isso é possível afirmar que a cera de abelha obtida no distrito de Aratuba está em discordância com a legislação BRASIL (2001) apenas com relação ao índice de acidez.

Porém quando se compara com outras referências é possível encontrar a cera de abelha com índice de acidez na mesma faixa de valor encontrada nesta pesquisa, assim como revela a Tabela a seguir.

Tabela 4. Valores de índice de acidez da cera de abelha.

Referência	Faixa de índice de acidez (mg KOH/g)
MAIA, M. e NUNES, F. M. (2012)	8,2-18
BASTON et al (2008)	7,66- 10,52

Esta divergência quanto ao índice de acidez pode-se justificar baseado nas diferentes composições química e qualidade da cera de abelha, que dependem da parte das subespécies de *Apis mellifera*, da idade da cera, e das condições climáticas da sua produção. Esta variação ocorre principalmente na quantidade relativa dos diferentes componentes presentes do que na sua natureza (BARROS et al.,2009).

Podemos acrescentar que nos últimos cinco (5) anos o estado nordeste incluindo estado Ceará, principalmente no maciço de Baturité, foi registrado uma modificação brusca no clima, causado principalmente pela falta de chuva, fazendo com que o maciço de Baturité-CE sofra com a seca. Este fato pode afetar diretamente as propriedades das plantas, que o são a base dos alimentos das abelhas, afetando por fim também a sua produção (MARENCO et al (sd)).

### 5.3 Teste de toxicidade do extrato da cera de abelha;

O resultado do ensaio de toxicidade frente das larvas *Artemia salina* do extrato etanol da cera de abelha, em até 24 horas, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 5 - Resultado do teste toxicidade frente das larvas *Artemia salina* do extrato etanol da cera de abelha durante um período de 24h.

<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Total das larvas (<i>A. salina</i>)</b>	<b>Larvas (<i>A. salina</i>) mortos</b>	<b>% da mortalidade</b>	<b>DL<sub>50</sub> (ppm)</b>
500	30	-	-	-
250	30	-	-	-
125	30	-	-	-
62,5	30	-	-	-
31,2	30	-	-	-
controle	30	-	-	-

A Tabela 3 revela que em até 24 horas não foi possível observar o índice de toxicidade, por que não apresenta registo de mortalidade das larvas *Artemia salina*, tanto na água salina (controle negativo) quanto no extrato da cera de abelha por um período de 24 horas de incubação. E não foi possível calcular DL<sub>50</sub> através do programa DL<sub>50</sub> do probit analysis em função de não apresenta o valor mínimo de mortalidade que é de 50 %.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos em relação a morte das larvas *Artemia salina* por um tempo de até 48 horas.

Tabela 6. Resultado do teste toxicidade frente das larvas *Artemia salina* do extrato etanolico da cera de abelha durante um período de 48h.

<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Total das larvas (<i>A. salina</i>)</b>	<b>Larvas (<i>A. salina</i>) mortos</b>	<b>% da mortalidade</b>	<b>DL<sub>50</sub> (ppm)</b>
500	30	8	26,7	-
250	30	8	26,7	-
125	30	8	26,7	-
62,5	30	8	26,7	-
31,2	30	8	26,7	-
Controle	30	-	-	-

A Tabela 6 mostra que com 48 horas de análise a porcentagem da mortalidade das larvas foi de 26,7% para os extratos da cera de abelha. Nos resultados referentes ao controle negativo, não foi encontrada uma taxa de mortalidade das larvas. Também não foi possível calcular  $DL_{50}$  em função dos resultados não terem apresentado uma taxa mínima de mortalidade das larvas de pelo menos 50 %.

De acordo com AMARANTE et al., (2011) para determinar o grau de toxicidade ou dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) de uma amostra considerando seguintes forma: baixa toxicidade quando dose letal 50 % ( $DL_{50}$ ) > 500 ppm, quando moderada para dose letal  $DL_{50}$  entre 100 e 500 ppm e muito tóxico quando ( $DL_{50}$ ) < 100 ppm. Assim pode-se afirmar que a cera de abelha não tem toxicidade frente a larva *Artemia salina*. Isso significa que a cera é uma boa matéria que poderia utilizar na próxima análise mais profunda sua eficaz sem danos ao organismo humano, que útil para utilizar como medicamentos e também para fabricação da pomada para pele.

Não foi encontrado na literatura artigo que reportasse sobre a utilização da cera de abelha no ensaio de toxicidade frente das larvas *Artemia salina*. Mas de acordo com PONTE (2003) na sua pesquisa sobre toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel, própolis e extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globulus* ou da associação *Zingiber officinale* E *Allium sativum* frente aos animais não apresentaram efeitos tóxicos (agudo ou crônico) relevante do ponto de vista clínico, em camundongos Swiss e ratos Wistar de ambos os sexos.

#### **5.4. Análise de atividade antioxidante**

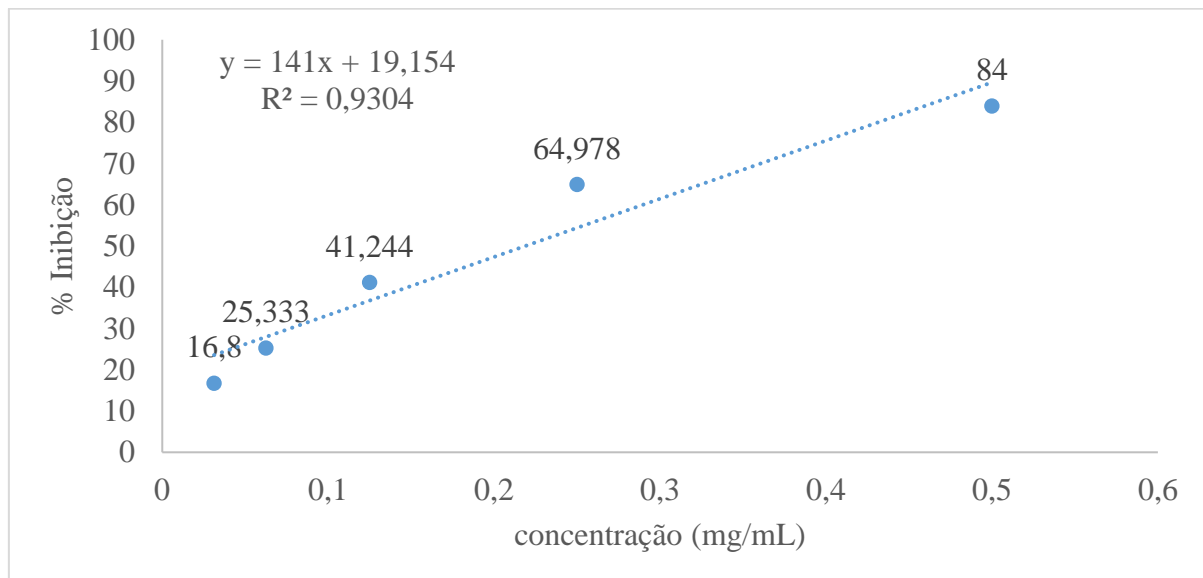
O resultado da atividade antioxidante frente ao radical DPPH são apresentados na tabela 7, revelou que o extrato da cera de abelha apresentou a atividade antioxidante com aumento da concentração, isso explica que o extrato de cera de abelha tem propriedades de óxido-redução, que é a adsorção ou neutralização de radicais livres DPPH. Segundo RODRIGUES et al., (2017), a intensidade da ação antioxidante pode ser apresenta devido ao número e posição de hidroxilas presentes nas moléculas. O valor de cálculo de concentração inibitória 50%  $IC_{50}$  foi 0,218 mg/mL e o valor de índice de atividade antioxidante IAA iguala 1,72 mg/mL. Como este resultado mostra que o extrato da cera de abelha apresenta a atividade antioxidante forte.

Durante a pesquisa não encontra a literatura que relata sobre o estudo do potencial antioxidante utilizando o extrato da cera de abelha. Mas vários estudos comprovaram que o mel e pólen apresentam a atividade antioxidante significativa.

Tabela 7. Resultado da análise atividade antioxidante com sequestro radical livre DPPH através da Espectrofotômetro de Ultravioleta UV/Vis.

Concentração (mg/mL)	% inibitória	Absorção			Absorção total	r	IC 50 (mg/mL)
		X	Y	Z			
0,5	84,000	0,058	0,062	0,06	0,060	± 0,002	
0,25	64,978	0,130	0,121	0,143	0,131	± 0,011	
0,125	41,244	0,224	0,221	0,216	0,220	± 0,004	0,218
0,0625	25,333	0,287	0,278	0,275	0,280	± 0,006	
0,0312	16,800	0,301	0,318	0,317	0,312	± 0,009	
<b>DPPH</b>		0,375					

Gráfico 1. Percentagem (%) de inibição do Radical livre do DPPH em relação às concentrações de amostra do extrato da cera de abelha (*Apis mellífera*).



## CONCLUSÃO

Com base nestes estudos pode-se afirmar que a cera de abelha do distrito de Aratuba, Camarão – CE apresenta a boa qualidade e ele não apresenta toxica frente a larva *Artemia salina* na avaliação de toxicidade e a cera também apresenta a atividade antioxidante forte com aumento de concentração e inibiu 84 % do radical livre de DPPH. Com estes resultados pode-se concluir que as propriedades apresentadas pelo extrato obtido fazem com que ele seja promissor para uso e aplicações na medicina.

Esses são estudos preliminares e servem como início para estudos posteriores como o isolamento, a purificação e a análise da sua ação antimicrobiana dessas substancias e a finalidade por testar a viabilidade terapêutica para o uso no futuro.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, C. B. MULLER, A. H. PÓVOA, M. M. Estudo Fitoquímico Biomonitorada Pelos Ensaio de Toxicidade Frente à *Artemia salina* e de Atividade Antiplasmódica do Caule de Aninga (*Montrichardia Linifera*). ACTA AMAZONICA, 2011.

ANGÉLICA, E. C. Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius* kunte e *croton blanchetianus* baill.- Patos - UFCG, CSTR. 2011. il.; Dissertação.

BACAXIXI, P.; BUENO, C. E. M. S. ; RICARDO, H. A. ; EIPHANIO, P. D. ; SILVA, D. P. ; BARROS, B. M. C. ; SILVA, T. F. ; BOSQUE, G. G. ; LIMA, F. C. C. A importância da apicultura no Brasil. Revista científico eletrônica de agronomia, FAEF,2011.

BALIVIÁN, J. M. P. P. - Abelhas Nativas sem Ferrão – São Leopoldo: Oikos, 128 p. 2008.  
BARROS. A.; I.; R.; N.; A.; NUNES, H. F. M. F.; COSTA, M. F. M. Manual de Boas Práticas na Produção de Cera de Abelha. FNAP – agosto de 2009.

BASTOS, E. M. A. F.; SÃO-THIAGO, P. S.; SANTANA, R. M. S.; MAGALHÃES, M. S. Controle de qualidade de cera de abelha bruta em uma central de alveolação. Mensagem Doce nº 99. 2008.

BRASIL, Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 de jan de 2001. Disponível em <file:///C:/Users/User/Downloads/RTIQ-Mel-completo-IN-11\_2000.pdf> acesso em 19/09/2016

CAMARGO, R. C. R. Produto de mel. – Teresina, PI: Embrapa Melo-Norte. (Embrapa Melo-Norte. Sistemas de Produção; 3). 138 p.: 2002.

CÂNDIDO, K. S. combinação de análises físico-químicas e técnicas analíticas para detecção da parafina à cera de *Apis mellífera* Linnaeus. Larvas-MG: UFLA, 2015. 59p.: il. Dissertação (mestrado acadêmico).

CARVALHO, G. R. *Apis mellifera*: reprodução, polinização e produção de mel. Bebedouro, 2010. Trabalho de conclusão de curso de bacharelado (graduação). Disponível em <<http://unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistabiologia/sumario/15/0203201082215.pdf>> acesso em 05/09/2017.

FRATINI, F. GILIA, G. TURCHI, B. FELICOLI, A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. Science Direct, 2016.

FREITAS, M. M. M. Obtenção de álcoois de cadeia longa a partir da cera de carnaúba. Fortaleza-CE, 2011.:il: Dissertação disponível em <<www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15888/1/2011\_dis\_mmmfreitas.pdf >> acesso em 20/08/2017.

- GOMES, V. J. ficha de informação técnica cera de abelha. Especialidades química; EMFAL, 2015. 1/3p.
- HOCAYEN, P. A. S. CAMPOS, L. A. POCHAPSKI, M. T. MALFATTI, C. R. M. Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. INSULA Revista de Botânica, Florianópolis, n. 41, p. 23-31. 2012.
- LIRA, T. S. Avaliação de dois métodos de produção de cera de abelhas na zona de mata alagoana. 2011. TCC (graduação) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. CECA/UFAL. Rio Largo, Alagoas-Brasil 2011.
- LUTZ, I. A. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4a Ed. São Paulo, 2008.
- MACÊDO, R, C, I. Manejo e conservação de meliponídeos e sua importância na preservação do bioma caatinga no município de angico – RN, Monografia (Graduação em Ciência e Tecnologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido) Angicos, RN: UFERSA,2012.
- MAIA, M. e NUNES, F. M. Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. ScienceDirect. Food Chemistry, 2012.
- MARENGO, J.A. CUNHA, A. P. ALVES, L. M. A seca de 2012 – 15 no seminário do Nordeste do Brasil no contexto histórico. CEMADEN, CCST/INPE, São Paulo, (sd).
- MARQUES, F, M. et al. Polinizadores na agricultura ênfase em abelhas: Funbio – Rio de Janeiro, 2015.
- NASCIMENTO, K. S. Composto fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul. UFP, São Paulo, 2016. 82p.; il Dissertação.
- NUNES, L.; A. OLIVEIRA, M. E. C. SILVEIRA, T. A. MARCHINI, L. C. DA SILVA, J. W. P. Produção de cera. Piracicaba: ESALQ. - Divisão de Biblioteca. il. (Série Produtor Rural. Nº52). P 37. 2012.
- OLIVEIRA, E, C, M. et al. Manejo da agressividade de abelhas africanizadas: Piracicaba – ESALQ, 2012.
- OLIVEIRA, I. P. BERGJOHANN, P. ADAMI, F. S. CONDE, S. F. FASSINA, P. Consumo de antioxidante entre praticantes e não praticantes de atividade física. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva. São Paulo, 2017.
- PERANOVICH, D. S. ORLANDO, G. CANDELLEIRO, A. ORSI, R. O. GOMES, S. M. A. Eficiência de três métodos na extração e purificação da cera apícola. PUBVET (Publicação em Medicina Veterinária e Zootecnia), Londrina, 2009.
- PONTE, F. L. R. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos à Base de Mel de Abelha, Própolis e Extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptu globulus* ou da Associação *Zingiber officinale* E *Allium sativum* em Roedores. RECIFE 2003. il: Dissertação.

RIOS, D. A. M. Ensaio de Toxicidade com *Artemia Salina* do Hidrolato de Laranja. Ciências Biológicas / Ecologia, Fortaleza, CE.

ROBERTO, B, P, G. et al. As abelhas polinizadoras nas propriedades rurais – Rio de Janeiro: Funbio, 2015.

RODRIGUES, O. G. ANGÉLICO, E. C. DA COSTA, J. G. M. LUCENA, M. F. A. NETO, V. Q. SILVA, W. W. Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius* kunte e *croton blanchetianus* baill. Agropecuária Científica no Semiárido: UFCG, 2017.

RUFINO, M. S. M. ALVES, R. E. BRITO, E. S. MORAIS, S. M. SAMPAIO, C. G. JIMÉNEZ, J. P. CALIXTO, F. D. S. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunidade técnica, Embrapa, Fortaleza, CE 2007.

SANTOS, K. C. Combinações de análises físico-químicas e técnicas analíticas para detecção da parafina à cera de *Apis melífera* Linnaeus. Universidade federal de lavrass, LAVRAS-MG, 2015. il.; Dissertação.

SANTOS, S. N. CASTANHA, R. F. HABER, L. L. MARQUES, M. O. M. SCHRAMIM, S. DE MELO, I. S. Determinação qualidade da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. Embrapa, Jaguariúna, SP, 2011.

SILVA, R. C. S. et al. Avaliação da toxicidade dos extratos do Araribá (*centrolobium tomentosum*) com utilização do bioensaio com *Artemia salina*. Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Universidade de Taubaté (UNITAU), SP, 2013.

SILVEIRA, T. D.; WOBETO, C. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de mel e pólen apícola de Mato Grosso. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. FAURGS-Gramado/RS, 2016.

VALLE, C. P. Síntese e caracterização de ésteres lubrificantes a partir da modificação do óleo da mamona (*ricinus communis*) e óleo das vísceras da tilápia (*oreochromis niloticus*) 114 f. il. Colo. Dissertação. UFC-Fortaleza, 2015.

WITTER, S. SILVA, P. N. BLOCHTEIN, B. LISBOA, B. B. FONSECA, V. L.I. - As abelhas e a agricultura. -Dados eletrônica. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014.143p. Disponível em <<<http://www.funbio.org.br/wp-content/uploads/2015/08/As-abelhas-e-a-agricultura-Parte-1.pdf>>> acesso em 20/08/2017.

ZIEGLER, C.; SINIGAGLIA, T.; MICHELS, A. Desenvolvimento de um equipamento para a produção de cera alveolada. Revista científica do instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Rio Grande do Norte.; HOLOS, 2016.