

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS - FCBA**

Cintia Miranda dos Santos

**Composição química e atividade antioxidante do geoprópolis  
de *Melipona quadrifasciata anthidioides***

Dourados - MS

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS - FCBA**

Cintia Miranda dos Santos

**Composição química e atividade antioxidante do geoprópolis  
de *Melipona quadrifasciata anthidioides***

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade Federal  
da Grande Dourados, como parte  
das exigências para a obtenção do  
título de bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Kely de  
Picoli Souza.

Co-orientadora: Ma. Jaqueline  
Ferreira Campos

Dourados - MS

2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S237c Santos, Cintia Miranda dos.  
Composição química e atividade antioxidante de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. / Cintia Miranda dos Santos. – Dourados, MS: UFGD, 2015.

39f.

Orientadora: Profa. Dra. Kely de Picoli Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Bioproduto. 2. Bioprospecção. 3. Compostos fenólicos. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD – 620.80

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

Cintia Miranda dos Santos

**Composição química e atividade antioxidante do geoprópolis  
de *Melipona quadrifasciata anthidioides***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

---

Ma. Débora da Silva Baldivia

---

Ma. Paola dos Santos da Rocha

Dourados – MS

2015

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Radicais Livres e estresse oxidativo .....	6
2.2. Danos ocasionados pelo excesso de EROs.....	7
2.3. Antioxidantes.....	9
2.4. Abelhas sem ferrão.....	11
2.4.1. Gênero Melipona Illiger 1806.....	13
2.5. Geoprópolis.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Coleta de amostras de geoprópolis.....	15
3.2. Preparação do extrato etanólico e hidroetanólico de geoprópolis.....	15
3.3. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides.....	16
3.4. Análises químicas.....	17
3.5. Atividade antioxidante.....	17
3.5.1. Atividade de captação do radical livre DPPH.....	17
3.5.2. Ensaio de captação do radical livre ABTS.....	18
3.5.3. Ensaio antioxidante utilizando modelo de eritrócitos humanos.....	18
3.5.4. Preparação das suspensões de eritrócitos.....	19
3.5.5. Ensaio de inibição de hemólise oxidativa.....	19
3.5.6. Dosagem de MDA.....	19
3.5.7. Análises estatísticas.....	20
4. RESULTADOS.....	20

4.1. Composição química.....	20
4.2. Atividade antioxidante.....	21
4.2.1. Atividade de captação dos radicais livres DPPH e ABTS.....	21
4.2.2. Ensaio de hemólise e inibição de hemólise oxidativa .....	22
4.2.3. Dosagem de MDA.....	24
5. DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

## RESUMO

Geoprópolis é produzido por abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, sendo composto por resinas de plantas, secreções mandibulares das abelhas e barro. Apesar de apresentar potencial terapêutico, existem poucos relatos na literatura sobre a composição química e atividades biológicas desse produto natural. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo investigar a composição química e atividade antioxidante do geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*, encontrada no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Para isso, foram preparados dois extratos de geoprópolis: etanólico (EEGP) e hidroetanólico (EHGP). A identificação de compostos fenólicos e flavonoides nos extratos foram realizados por métodos colorimétricos. A análise química do geoprópolis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A atividade antioxidante foi verificada pelos métodos de captura dos radicais 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Os ensaios de inibição da peroxidação lipídica foram realizados utilizando eritrócitos humanos incubados com o agente oxidante 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), sendo avaliada a inibição da hemólise oxidativa e os níveis de malondialdeído (MDA). A composição química revelou a presença de compostos fenólicos e flavonoides totais. O EHGP apresentou maior concentração de compostos fenólicos quando comparado ao EEGP. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) revelaram a presença de diterpenos e ácidos fenólicos. Ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante, sendo capazes de capturar os radicais livres DPPH e ABTS e inibir a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos quando incubados com agente oxidante AAPH. O EHGP apresentou melhores resultados, comparado ao EEGP. Neste contexto, os extratos etanólico e hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* demonstraram potencial terapêutico para serem usados no tratamento ou prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioproduto, bioprospecção, compostos fenólicos, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Geopropolis is produced by stingless bees of Meliponini tribe, consisting of plant resins, mandibular secretions from bees and clay. Despite having therapeutic potential, there are few reports in the literature on the chemical composition and biological activities of this natural product. In this context, this study aimed to investigate the chemical composition and antioxidant activity of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis, found in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. For this, were prepared two geopropolis extracts: ethanol (EEGP) and hydroethanolic (EHGP). The identification of flavonoids and phenolic compounds in the extracts were performed by colorimetric methods. Chemical analysis of the geopropolis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was detected by capture methods of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Inhibition of lipid peroxidation assays were performed with human erythrocytes incubated with the oxidizing agent 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), and evaluated the inhibition of oxidative hemolysis, and levels of malondialdehyde (MDA). The chemical composition revealed the presence of total flavonoids and phenolic compounds. The EHGP has a higher concentration of phenolic compounds when compared to EEGP. HPLC analysis revealed the presence of diterpenes, and phenolic acids. Both extracts showed antioxidant activity, being able to capture free radicals DPPH and ABTS and inhibit lipid peroxidation in human erythrocytes when incubated with AAPH oxidizing agent. The EHGP shows better results compared to EEGP. In this context, ethanolic and hydroethanolic geopropolis extracts of *M. q. anthidioides* demonstrate therapeutic potential for the use in treatment or prevention of diseases related to oxidative stress.

**KEYWORDS:** Bioproduct, bioprospecting, phenolic compounds, oxidative stress.



## 1. INTRODUÇÃO

O geoprópolis é um tipo de própolis, composto por resinas de plantas, barro, cera e secreções mandibulares (Bankova, 2009; Liberio *et al.*, 2011) de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* (Akatsu, 2009). Em sua composição química foram identificados compostos fenólicos, terpenos, saponinas e outros (Bankova *et al.*, 2000; Bankova, 2009; Cinegaglia *et al.*, 2013).

As atividades biológicas do geoprópolis de diferentes espécies de abelhas do gênero *Melipona* vêm sendo estudadas, como antioxidante (Silva *et al.*, 2013a; Souza *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014), antiproliferativa (Cunha *et al.*, 2013), citotóxica (Cinegaglia *et al.*, 2013), anti-inflamatória (Liberio *et al.*, 2011; Franchin *et al.*, 2012; Franchin *et al.*, 2013) e antimicrobiana (Liberio *et al.*, 2011), no entanto estudos com geoprópolis ainda são escassos.

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, a *Melipona quadrifasciata* é amplamente encontrada em todo o território brasileiro e apresenta duas subespécies, *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* (Tavares *et al.*, 2013), as quais são bem descritas na literatura quanto ao desenvolvimento e diversidade genética (Waldschmidt *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2013). Adicionalmente, Velikova *et al.* (2000) descreveram a composição química e ação antimicrobiana do extrato da própolis de *M. q. anthidioides*. Embora o geoprópolis seja utilizado para fins medicinais popularmente, apenas Bankova *et al.* (1998) investigaram a composição química de geoprópolis de *M. q. anthidioides* revelando a presença de ácidos diterpênicos.

Assim, a investigação do geoprópolis de *M. q. anthidioides* amplia as perspectivas de encontrar compostos e moléculas com potencial biológico dentre os quais destaca-se a atividade antioxidante. Substâncias antioxidantes são capazes de proteger as células dos danos ocasionados pelo estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade antioxidante do organismo (Sies, 1997; Hamid *et al.*, 2010). Esta condição está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como o câncer, diabetes, desordens neurológicas e aterosclerose (Sies, 1997; Birben *et al.*, 2012).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e atividade antioxidante dos extratos etanólico e hidroetanólico de geoprópolis produzido pelas abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*, decorrentes do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Radicais Livres e Estresse oxidativo**

Radical livre é qualquer molécula que apresenta elétrons não pareados em sua órbita externa (McCord, 2000). Por essa razão, muitos radicais são instáveis e altamente reativos (Pham-Huy *et al.*, 2008; Sultan, 2014), comportando-se como agentes oxidantes ou redutores (Cheeseman e Slater, 1993). As reações de oxidação-redução (redox) envolvem o processo de transferência de elétrons ou átomos entre moléculas (McCord, 2000).

Os radicais livres são importantes para o funcionamento do organismo, estes modulam vias de sinalização celular e regulam a expressão de genes em células eucarióticas (Rahal *et al.*, 2014). As células do sistema imune (macrófagos e neutrófilos) produzem radicais livres (Dröge, 2002; Pacher *et al.*, 2007). Os radicais livres também agem sob a resposta inflamatória, onde induzem a adesão celular das células imunitárias durante o processo de morte celular pelo mecanismo de apoptose (Pham-Huy *et al.*, 2008; Sena e Chandel, 2012). Além disso, são importantes na sinalização e diferenciação celular, participam da ativação de proteínas, além de promover aumento da transdução de sinais em receptores de membrana (Dröge, 2002; Pacher *et al.*, 2007; Sena e Chandel, 2012.).

Os radicais livres são provenientes de fontes endógenas, como fagocitose, metabolismo do citocromo P450, ativação de células anti-inflamatórias, exercícios físicos, estresse mental e emoções (Bagchi e Puri, 1998; Valko *et al.*, 2006; Sultan, 2014). Também são oriundos de fontes exógenas, como poluição ambiental, tabagismo, metais pesados ou de transição, dieta, radiação ultravioleta e produtos químicos industriais (Young e Woodside, 2001; Fusco *et al.*, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008; Rahal *et al.*, 2014).

Adicionalmente, os radicais livres e outras EROS, podem ser produzidos no processo fisiológico de geração de ATP (adenosina trifosfato) pelas mitocôndrias, durante a respiração celular (Sultan, 2014).

O aumento na produção de EROs em desequilíbrio com o sistema de defesa antioxidante endógeno, caracteriza o estresse oxidativo (Young e Woodside, 2001). Este estado desempenha um papel importante na patofisiologia de muitas doenças (Burton, 2011), decorrente de danos a células e tecidos (Fusco *et al.*, 2007).

## **2.2. Danos ocasionados pelo excesso de EROs**

A produção excessiva de EROs pode gerar danos ao organismo, sendo devido sua capacidade de atravessar a membrana celular e ocasionar alterações nas proteínas, DNA e na própria membrana celular (Dröge, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

A oxidação de proteínas está associada ao desenvolvimento de doenças no período senil. O envelhecimento decorre de proteínas oxidadas (Valko *et al.*, 2006). A alteração oxidativa da estrutura proteica pode acarretar consequências funcionais como, inibição enzimática, aumento da suscetibilidade de agregação, proteólise, imunogenicidade alterada e alteração de proteínas receptoras e transportadoras (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

EROs também são capazes de reagir com componentes da molécula de DNA (Zwart *et al.*, 1999), gerando danos que envolvem a degradação das ligações nucleotídicas (purinas e pirimidinas) ou modificações de desoxirriboses (Cooke *et al.*, 2003). Esses danos podem resultar em indução de transcrições, ativação de vias de transdução de sinal, erros no processo de replicação e instabilidade genômica (Valko *et al.*, 2006). Danos oxidativos no material genético acarretam o desenvolvimento de mutagênese, carcinogênese e envelhecimento precoce (Cooke *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006).

O excesso de EROs levam a peroxidação lipídica, iniciada quando um radical livre reage com a cadeia lateral de ácidos graxos, retirando um átomo

de hidrogênio de grupos metílenos posicionados em duplas ligações (Halliwell e Chirico, 1993). Os grupos metílenos são altamente reativos para agentes oxidantes e no processo de oxidação, seus átomos de hidrogênios são removidos para formar um radical lipídico centrado em carbono, que podem sofrer rearranjo molecular e reagir com oxigênio, formando radical peroxil (Frei, 1994).

O radical peroxil pode ser reduzido a hidroperóxido, dependendo de sua posição na cadeia carbônica do ácido graxo (Valko *et al.*, 2006). Estes são relativamente estáveis na ausência de metais, porém, complexos de metal e metaloproteínas, que são abundantes nas células, reduzem os hidroperóxidos para radicais alcóxila, que podem gerar outros produtos (Halliwell e Chirico, 1993). Assim, mesmo os mais simples produtos da peroxidação lipídica podem produzir peróxidos, hidroperóxidos, compostos carbonil, entre outros. Estas moléculas altamente reativas podem propagar uma reação em cadeia da peroxidação lipídica, gerando mais radicais e propagando a oxidação dos ácidos graxos centrados em carbono (Halliwell e Chirico, 1993; Valko *et al.*, 2006).

Os efeitos citotóxicos da peroxidação lipídica incluem desarranjo estrutural da bicamada lipídica, aumento da permeabilidade citosólica, inativação de enzimas transportadoras intrínsecas, ligação cruzada covalente de lipídeos e proteínas, danos ao DNA e mutagênese (Girotti, 1985; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

A peroxidação gera produtos, principalmente aldeídos reativos p-insaturados, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), e 2-propenal (acroleína) e os isoprostanos, indicadores de estresse oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Ou seja, estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de diversas doenças (Dalle-Donne *et al.*, 2006), como cardiovascular, aterosclerose, neurodegenerativas (como Parkinson, Alzheimer, e esclerose lateral amiotrófica), diabetes mellitus, isquemia e lesões de reperfusão, alergias, disfunções do sistema imunológico, artrite reumatoide, envelhecimento e câncer (Zwart *et al.*, 1999; Valko *et al.*, 2006; Vénus *et al.*, 2013).

### 2.3. Antioxidantes

Um agente antioxidante é qualquer substância que mesmo presente em baixas concentrações comparado com um substrato oxidável, impede a oxidação desse substrato (Halliwell, 1995). Entre suas principais funções, a proteção de células saudáveis contra ação de EROs é primordial. Sendo assim, a fim de prevenir os efeitos nocivos promovidos pelo excesso de EROs, as células desenvolveram um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante, os quais podem ser endógenos e enzimáticos e não enzimáticos (Zwart *et al.*, 1999).

Dentre os antioxidantes enzimáticos estão as enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (Young e Woodside, 2001). A SOD catalisa superóxido altamente reativo em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Matés *et al.*, 1999). O  $H_2O_2$  formado pela SOD pode ser removido pela CAT ou GPx (Young e Woodside, 2001). A enzima CAT localiza-se no interior das células em peroxissomas, onde há grande parte das enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogênio (Matéz *et al.*, 1999; Young e Woodside, 2001). Outra enzima que atua em conjunto com SOD e CAT é a glutatona peroxidase, que reduz  $H_2O_2$  pela glutatona reduzida, resultando na formação de glutatona oxidada (Birden *et al.*, 2012). Dentro das células sua presença é predominante no citosol e nas mitocôndrias, sugerindo que ela é o principal catalisador de peróxido de hidrogênio em tais compartimentos celulares (Birden *et al.*, 2012).

O organismo também apresenta antioxidantes não enzimáticos, como a Coenzima Q, presente em todas as células e membranas, sendo membro da cadeia respiratória mitocondrial (Deichmann *et al.*, 2010). Ela atua impedindo a formação de radicais peroxil lipídicos, assim como é capaz de neutralizar esses radicais após sua formação (Turunen *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2010). Outro composto antioxidante do organismo é o ácido úrico, um produto final do metabolismo do nucleotídeo purina (Kand'ár *et al.*, 2006). Ele impede a lise de eritrócitos pela peroxidação lipídica, sendo um potente sequestrador de radical oxigênio e hidroxila (Kand'ár *et al.*, 2006; Carochó e Ferreira, 2013).

Embora os antioxidantes endógenos sejam de suma importância para o organismo, é imprescindível a ingestão de antioxidantes oriundos de fontes vegetais, principalmente quando as defesas antioxidantes endógenas não são suficientes para impedir os danos ocasionados pelo aumento na produção de EROs (Babich, 1982).

Os antioxidantes naturais atuam por diferentes mecanismos, podem neutralizar diretamente os radicais livres, reduzir as concentrações de  $H_2O_2$  e reparar membranas oxidadas. Além disso, podem quelar metais, a fim de diminuir a produção de EROs (Berger, 2005). Dentre os antioxidantes naturais está o ácido ascórbico ou também conhecido como Vitamina C (Frei, 1994), capaz de proteger as lipoproteínas de baixa densidade da peroxidação lipídica (Frei, 1994; Birden *et al.*, 2012). Outra vitamina com ação antioxidante é o  $\alpha$ -tocoferol ou Vitamina E, um composto solúvel em lipídios que está presente em membranas lipoproteicas (Frei, 1994). Atua na quebra da cadeia de oxidação durante a peroxidação lipídica (Birden *et al.*, 2012). Além disso, desencadeia a apoptose em células cancerígenas inibindo a geração de radicais livres (Frei, 1994).

Além desses, compostos fenólicos, como flavonoides e taninos (Hertog *et al.*, 1993), também são importantes fitoquímicos naturais que conferem propriedades antioxidantes no organismo. Estruturalmente, os flavonoides são formados pelo esqueleto difenilpropano ( $C_6C_3C_6$ ) e são classificados a partir de sua estrutura química, podendo ser um flavonol, isoflavona, flavonas e antocianinas (Carocho e Ferreira, 2013). Suas propriedades antioxidantes são atribuídas a grupos fenólicos ligados a hidroxila que podem atuar como redutores, doadores de hidrogênio, eliminadores de radicais superóxido, inibidores da peroxidação lipídica, como queladores de metais, reduzir o radical  $\alpha$ -tocoferoxil e aumentar os níveis de ácido úrico (Carocho e Ferreira, 2013).

Outros antioxidantes obtidos em plantas são os carotenoides, um dos principais é o  $\beta$ -caroteno, substância lipossolúvel (Birden *et al.*, 2012), precursor da vitamina A, capaz de inibir a peroxidação lipídica, reagindo com peróxido, hidroxila e superóxido (Frei, 1994; Birben *et al.*, 2012).

Além dos antioxidantes naturais, existem os sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), utilizados pela indústria alimentícia (Ramalho e Jorge, 2006). O BHA e o BHT são compostos com propriedades similares, sendo antioxidantes insolúveis em água, utilizados para garantir e estabilizar o valor nutritivo, cor e sabor de produtos para alimentação (EFSA, 2012). Além disso, o BHT também é utilizado como estabilizante de produtos farmacêuticos, vitaminas solúveis em gordura e cosméticos (IARC, 1986).

Os antioxidantes sintéticos apresentam aplicação ampla, no entanto, estes podem ocasionar danos à saúde (Valenzuela e Nieto, 1996). Já os antioxidantes naturais conhecidos, como o ácido ascórbico, são considerados menos prejudiciais para o organismo, no entanto apresentam baixa estabilidade (Naidu, 2003). Nesta perspectiva, verifica-se a necessidade de investigar produtos naturais encontrados na biodiversidade brasileira, que apresentem menores efeitos colaterais e que possuam maior estabilidade.

O Brasil é um país rico em biodiversidade e oferece grandes oportunidades para o estudo de espécies que ainda não foram investigadas (Berlinck, 2012). As abelhas ocupam posição destaque na manutenção da biodiversidade, pois são as principais responsáveis pela polinização nos ecossistemas e conservação de espécies vegetais (Andena *et al.*, 2005). Além disso, alguns dos produtos produzidos por estas já foram descritos com potencial antioxidante, como a própolis (Miguel *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015) e o mel (Mohamed *et al.*, 2010; Moniruzzaman *et al.*, 2013).

#### **2.4. Abelhas sem ferrão**

Dentre as diferentes espécies de abelhas, temos os meliponíneos, conhecidos popularmente como “abelhas sem ferrão”, caracterizados por apresentarem ferrão atrofiado (Oliveira *et al.*, 2013). Os meliponíneos pertencem ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenóptera, superfamília Apoidea, família Apidae, sub-família Meliponinae, tribo Meliponini, subtribo Meliponina, gênero *Melipona* (Kerr, 1948). São

encontrados em regiões tropicais e subtropicais, vivem em colônias e são sociais (Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007).

Em geral, os meliponíneos possuem colônias perenes e apresentam divisão de castas, apresentando várias gerações de operárias, alguns machos, rainhas virgens, e geralmente uma rainha que é fecundada (Oliveira *et al.*, 2013). A maioria das espécies de meliponíneos constrói seus ninhos em cavidades, no interior de árvores vivas ou mortas, no chão ou entre raízes de árvores, em buracos de animais subterrâneos, no interior de ninhos de outros insetos, cavidades artificiais em áreas urbanas, entre outros (Silveira *et al.*, 2002). Seus ninhos são de cera, com resinas coletadas de plantas (Nogueira-Neto, 1997). Algumas espécies adicionam lama, fezes ou outros materiais à construção (Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2007). Estas espécies desempenham um importante papel como polinizadores da vegetação nativa (Michener, 2007) e são produtoras de produtos naturais como mel, cera, pólen apícola, própolis e geoprópolis (Oliveira *et al.*, 2013), os quais são utilizados na alimentação dos indivíduos da colmeia ou na manutenção das estruturas do ninho (Nogueira-Neto, 1997).

Embora os principais estudos na literatura sobre as abelhas da tribo Meliponini descrevam sua morfologia (Nunes *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2014), genética (Barni *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2013; Silveiro *et al.*, 2014), evolução (Bonatti *et al.*, 2014), organização social e comportamento (Kleinert, 2005; Souza *et al.*, 2006; Hrnir *et al.*, 2008), recentemente seus produtos naturais vem ganhando destaque por apresentarem propriedades terapêuticas para a saúde humana (Silva *et al.*, 2013b; Pimentel *et al.*, 2013; Borsato *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2014; Ribeiro-Junior *et al.*, 2015). Entretanto, relatos científicos de ação farmacológica ainda são escassos, frente a grande diversidade de espécies do gênero *Melipona*.

A criação destas abelhas, bem como a manutenção de suas atividades, é conhecida como Meliponicultura (Nogueira-Neto, 1997). O manejo dessas abelhas permite a multiplicação de colônias, visando à comercialização da produção dos seus produtos naturais, a reintrodução destas espécies em áreas



degradadas ou a polinização dirigida de vegetais de interesse econômico (Michener, 2007; Oliveira *et al.*, 2013).

#### **2.4.1. Gênero *Melipona* Illiger 1806**

As espécies de abelhas do gênero *Melipona* se destacam por apresentarem tamanho médio a grande (entre 8 a 15 mm de comprimento) (Kerr, 1948; Oliveira *et al.*, 2013). As melíponas podem ser encontradas praticamente em todo território brasileiro, porém, são amplamente encontradas na região Nordeste (Dutra, 2006; Dutra *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2013). Apresentam grande importância na preservação do meio ambiente, pois participam da polinização de plantas selvagens e cultivadas (Silva *et al.*, 2006). Além disso, algumas espécies, como *Melipona fasciculata*, são criadas para a produção comercial de mel (Silva *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2008).

Das espécies de melíponas já descritas, a espécie *Melipona quadrifasciata* é normalmente encontrada ao longo da costa brasileira, desde o estado da Paraíba, na região nordeste, até o sul do Rio Grande do Sul (Nunes *et al.*, 2013). Apresenta duas subespécies: *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Nunes *et al.*, 2008). A principal diferença entre as duas é a morfologia, onde *M. q. quadrifasciata* apresenta tergitos de coloração vermelho a castanho com faixas amarelas contínuas do terceiro para o sexto segmento, enquanto *M. q. anthidioides* apresenta tergitos de coloração preta e faixas amarelas descontínuas (Kerr, 1948).

Relatos na literatura sobre *M. q. anthidioides*, em geral se referem a estudos sobre morfologia (Neves *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013), variabilidade genética das subespécies de *M. quadrifasciata* (Waldschmidt *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2013) e impactos dos pesticidas sobre estes polinizadores (Tomé *et al.*, 2012).

Estudos sobre as propriedades terapêuticas dos produtos naturais produzidos por essa espécie de *Melipona*, como mel, própolis e geoprópolis ainda são escassos. Velikova *et al.* (2000) investigaram a atividade

antibacteriana e composição química do própolis de *M. q. anthidioides*, revelando a presença do diterpeno ácido caurenóico. Porém, apenas Bankova *et al.* (1998) investigaram a composição química do geoprópolis de *M. q. anthidioides* revelando a presença de ácidos diterpênicos.

## 2.5. Geoprópolis

Um dos produtos gerados pelas abelhas sem ferrão é o geoprópolis, um tipo de própolis composto por resinas secretadas pelas plantas a partir de brotos de flores e folhas, que são coletados pelas abelhas, sendo misturados a suas secreções mandibulares (Bankova, 2009). Além disso, são adicionados cera e barro em sua composição (Liberio *et al.*, 2011). Esse produto é depositado na colmeia, a fim de vedar rachaduras, delimitar as cavidades onde as abelhas residem e impedir a entrada excessiva de ar (Bankova *et al.*, 2014). Adicionalmente, também atua como agente antimicrobiano, auxiliando na proteção da mesma contra micro-organismos patogênicos que podem ser nocivos para as abelhas (Nogueira-Neto, 1997; Dutra *et al.*, 2014).

A composição química do geoprópolis varia de acordo com a especificidade floral do local de coleta (Souza *et al.*, 2013). Análises de composição química de diferentes geoprópolis demonstraram a presença de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), fenilpropanoides, terpenos (diterpênicos e cetonas), ácido gálico, benzofenonas prenilados, saponinas, alcaloides pirrolizidínicos e flavonas C-glicosil (Bankova *et al.*, 2000; Bankova, 2009; Cinegaglia *et al.*, 2013). Provavelmente esses compostos são responsáveis pelas atividades biológicas do geoprópolis de diferentes espécies de *Melipona* descritas. Dentre elas está a atividade antimicrobiana, contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras (Duailibe *et al.*, 2007; Liberio *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013), anti-inflamatória (Liberio *et al.*, 2011; Franchin *et al.*, 2013) e antinociceptiva (Franchin *et al.*, 2012).

Cinegaglia *et al.* (2013) constataram que o geoprópolis de *M. fasciculata* apresenta ação tóxica contra células de osteossarcoma canino (OSA). Já

Cunha *et al.* (2013) mostraram que o extrato do geoprópolis de *M. scutellaris* apresenta atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais humanas de glioma (U251), melanoma (UACC -62), mama (MCF-7), ovário (NCI-ADR / RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460) e próstata (PC-3), apresentando seletividade em comparação com linhagens normais. Estudos com extratos de geoprópolis produzido por *M. scutellaris* têm demonstrado atividade gastroprotetora em ratos *Wistar* (Ribeiro-Junior *et al.*, 2015).

O potencial antioxidante de geoprópolis produzidos por diferentes espécies de abelhas também foi verificado. Souza *et al.* (2013) determinaram a ação antioxidante do geoprópolis de *Melipona subnitida*, e atribuíram essa capacidade à presença de flavonoides e fenilpropanoides. Dutra *et al.* (2014), verificaram que o geoprópolis de *Melipona fasciculata* apresentou importante ação antioxidante, relacionada aos altos níveis de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, galotaninos e elagitaninos, encontrados neste produto natural.

Dessa maneira, a investigação do geoprópolis da espécie de abelha sem ferrão, *M. q. anthidioides* apresenta grande importância farmacológica, além de agregar valor científico e econômico a esse produto natural (Franchin *et al.*, 2012; Ribeiro-Junior *et al.*, 2015).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta de amostras de geoprópolis**

Amostras de geoprópolis da abelha *M. q. anthidioides* foram coletadas de meliponários, sob coordenadas geográficas 22° 13' 12" S - 54° 49' 2" O, no estado do Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil. As amostras foram armazenadas em freezer – 20° C.

#### **3.2. Preparação dos extratos etanólico e hidroetanólico de geoprópolis**

Foram preparados dois extratos utilizando diferentes solventes. O extrato etanólico de geoprópolis (EEGP) foi preparado a partir de 100g geoprópolis e 700 mL de etanol absoluto. A mistura permaneceu em banho-

maria a 70 °C, por 30 minutos, em seguida foi filtrada (Franchin *et al.*, 2012). O extrato hidroetanólico de geoprópolis (EHGP) foi preparado a partir de 80g de geoprópolis e 240 mL de etanol 70% a mistura foi mantida em agitação moderada (165 RPM), por 24 horas em temperatura ambiente, e posteriormente filtrada (Cinegaglia *et al.*, 2013). Ambos os extratos foram rotaevaporados a 40 °C e liofilizados. O rendimento foi de 8,2% e 4,8%, para EEGP e EHGP, respectivamente.

### **3.3. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides**

A concentração de compostos fenólicos foi determinada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Meda *et al.*, 2005). Para isso, 0,5 mL de extrato (100 µg/mL) foi adicionado a 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteu e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). A mistura foi incubada por 2 h de à temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi mensurada a 760 nm. O ácido gálico (0,4 – 11 µg/mL) foi utilizado como padrão para produzir a curva de calibração. A média de três leituras foi utilizada para determinação do conteúdo de compostos fenólicos, expresso em mg equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG)/g de extrato).

O teor de flavonoides foi determinado utilizando o método descrito por Liberio *et al.* (2011), com pequenas modificações. Para isso, 0,5 mL de extrato (100 µg/mL) foi adicionado a 4,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado 2% (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O). A mistura foi incubada por 30 min à temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi mensurada a 415 nm. A quercetina (0,4 – 11 µg/mL) foi utilizada como padrão para produzir a curva de calibração. A média de três leituras foi utilizada para determinação do conteúdo de flavonoides, expresso em mg equivalente à quercetina por grama de extrato (mg EQ/g de extrato).

### 3.4 Análises químicas

Para análise de composição química o geoprópolis foi solubilizado em MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 (1 mg/mL) e injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-20AD, Shimadzu), acoplado em linha a um detector DAD (SPD-M20A, Shimadzu) e ESI-QTOF (microTOF-Q III, BrukerDaltonics). O UV/VIS foi monitorado entre 240-800 nm e o espectro de massas foi adquirido no modo de ionização negativa e positiva (120-1200 Da), utilizando ácido trifluoroacético sodiado (TFA-Na) como calibrante interno. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa Kinetex (150 x 2.2 mm d.i., 2,6 µm) e pré-coluna com mesma fase estacionária, mantidas a 50 °C. A fase móvel utilizada foi água Milli-Q (A) e acetonitrila (B), ambos com ácido acético 1%, com fluxo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup> em sistema de gradiente linear: 0-2 min. 3% (B), 2-25 min. 3-25% (B), 25-40 min. 25-80% (B), seguido de lavagem e condicionamento da coluna (8 min). Para obtenção dos fragmentos MS/MS foi utilizado nitrogênio como gás de colisão e energia de colisão variando de 25-50 eV. Os dados foram processados pelo software Data Analysis versão 4.2 (Bruker).

### 3.5. Atividade antioxidante

#### 3.5.1. Atividade de captação do radical livre DPPH

A atividade de captação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos de geoprópolis foi avaliada de acordo com o método descrito por Gupta e Gupta (2011) com modificações. Para isso, 200 µL do extrato em diferentes concentrações (0,1 – 200 µg/mL) foram misturados a 1800 µL da solução de DPPH 0,11 mM. A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o butylated hydroxytoluene (BHT) foram utilizados como antioxidantes de referência. Uma solução padrão de DPPH foi utilizada como controle. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata. A porcentagem de inibição foi calculada a partir do controle utilizando a equação a seguir:

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = (1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Foi calculada para cada amostra a concentração do extrato necessária para inibir 50% dos radicais livres (IC50).

### **3.5.2. Ensaio de captação do radical livre ABTS**

A capacidade antioxidante dos extratos de geoprópolis foi verificada pelo método descrito por Re *et al.* (1999), através da atividade de captação do radical livre 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Para isso, foram preparadas solução de ABTS 7 mM e solução de persulfato de potássio 140 mM. O radical ABTS<sup>•+</sup> formou-se a partir da mistura de ambas as soluções (5 mL da solução de ABTS e 88 µL da solução de persulfato de potássio). A mistura foi incubada por 12 - 16 horas, à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, 1 mL do radical ABTS foi diluído até a obter absorvância de  $0,70 \pm 0,05$  a 734 nm. Posteriormente, 20 µL de EEGP ou EHGP em diferentes concentrações (0,1-200 µg/mL) foram misturados com 1980 µL do radical ABTS. A mistura foi homogeneizada e incubada por 6 minutos. A absorvância foi mensurada a 734 nm. O ácido ascórbico e BHT foram utilizados como controles positivos. Uma solução do radical ABTS foi utilizada como controle. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição do ABTS foi calculada a partir do controle utilizando a equação a seguir:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = ((\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Foi calculada para cada amostra a concentração do extrato necessária para inibir 50% dos radicais livres (IC50).

### **3.5.3. Ensaio antioxidante utilizando modelo de eritrócitos humanos**

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Brasil (CEP nº 123/12).

#### **3.5.4. Preparação das suspensões de eritrócitos**

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de doadores saudáveis, em tubo contendo anticoagulante (citrato de sódio). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min. Após centrifugação, o plasma sanguíneo e a camada de leucócitos foram descartadas e, os eritrócitos lavados três vezes com NaCl 0,9%. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 10% em NaCl 0,9%, para obter um final de 2,5 % após tratamento.

#### **3.5.5. Ensaio de inibição de hemólise oxidativa**

O efeito protetor dos extratos de geoprópolis sobre a hemólise oxidativa foi avaliado de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2014). Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C por 30 min na presença de diferentes concentrações de extrato ou ácido ascórbico (5 – 75 µg/mL). Em seguida, foi adicionada a solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 mM. Essa mistura foi incubada a 37 °C por 4 h, com homogeneização periódica. Os eritrócitos com etanol 1% foram utilizados como controle do solvente. A proteção contra a hemólise foi determinada após 120, 180 e 240 min de incubação. Após estes períodos as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. A absorbância do solvente foi mensurada a 540 nm. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição da hemólise (\%)}: A/B \times 100$$

Sendo (A) absorbância da amostra e (B) hemólise total (eritrócitos com água destilada).

#### **3.5.6. Dosagem de MDA**

Para verificar se os extratos EEGP e EHGP protegem os eritrócitos da peroxidação lipídica, foram quantificados os níveis de MDA, subproduto deste processo. O ensaio de dosagem de MDA foi realizado de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2015). Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C

por 30 min com diferentes concentrações do extrato ou ácido ascórbico (5 – 75 µg/mL). Foram utilizados eritrócitos com etanol 1% como controle do solvente. Em seguida, foi adicionada a solução de AAPH 50 mM, sendo incubados a 37 °C por 4 horas, com homogeneização periódica. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram transferidas para tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nmol. Como padrão MDA, foi utilizado 500 µL de solução de MDA (20 mM), em 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96 °C durante 45 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo e em seguida adicionados 4 mL de álcool n-butílico e centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Os níveis de MDA foram expressos em nmol/mL, obtidos pela seguinte fórmula:

$$\text{MDA} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \times (20 \times 220,32 / \text{Abs}_{\text{padrão MDA}})$$

### 3.5.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Dunnett, utilizando o Software GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram considerados significantes quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Composição química

A concentração total de compostos fenólicos presentes no EEGP foi de  $75,3 \pm 0,9$  mg EAG/g de extrato e no EHGP foi de  $118,7 \pm 2,8$  mg EAG/g de extrato. A concentração total de flavonoides presentes no EEGP foi de  $21,3 \pm 0,9$  mg EQ/g de geoprópolis e no EHGP foi de  $25,4 \pm 2,8$  mg EQ/g de extrato. A composição química de geoprópolis avaliada por HPLC revelou a presença de 24 compostos (**Tabela 1**).



**Tabela 1.** Compostos identificados de geoprópolis de *M. q. anthidioides*.

Pico	Tempo de Retenção (Min)	Fórmula molecular	[M-H] (M/Z)	Composto
1	35,4	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>4</sub>	333,2071	Desconhecido
2	35,8	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	319,2279	Diterpeno
3	35,8	C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> O <sub>6</sub>	661,4474	Desconhecido
4	36,1	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	313,1809	Desconhecido
5	36,3	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	319,2279	Diterpeno
6	36,5	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	313,1809	Desconhecido
7	36,8	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	317,2122	Desconhecido
8	37,2	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	301,2173	Diterpeno
9	38,0	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	299,2017	Ácido Fenólico
10	38,8	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	297,186	Desconhecido
11	38,1	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	299,2017	Ácido Fenólico
12	39,2	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>3</sub>	327,1966	Desconhecido
13	39,4	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>3</sub>	327,1996	Desconhecido
14	41,0	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	301,2173	Diterpeno
15	41,0	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	383,2228	Desconhecido
16	41,0	C <sub>42</sub> H <sub>57</sub> O <sub>4</sub>	625,4262	Desconhecido
17	41,2	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	301,2173	Diterpeno
18	41,7	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub>	371,2592	Desconhecido
19	41,7	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	325,1809	Desconhecido
20	43,5	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O	285,224	Ferruginol
21	43,5	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	347,2956	Desconhecido
22	43,6	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	347,2956	Desconhecido
23	44,2	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> O <sub>2</sub>	373,3112	Desconhecido
24	45,0	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	347,2592	Desconhecido

## 4.2. Atividade antioxidante

### 4.2.1. Atividade de captura dos radicais livres DPPH e ABTS

Nos ensaios de captura direta dos radicais livres DPPH e ABTS, o EHGP apresentou melhor desempenho, comparado ao EEGP. O EHGP apresentou IC<sub>50</sub> e atividade máxima semelhante ao padrão ABTS (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Capacidade do ácido ascórbico, BHT, EEGP e EHGP de capturar os radicais livres DPPH e ABTS, IC<sub>50</sub> e atividade máxima.

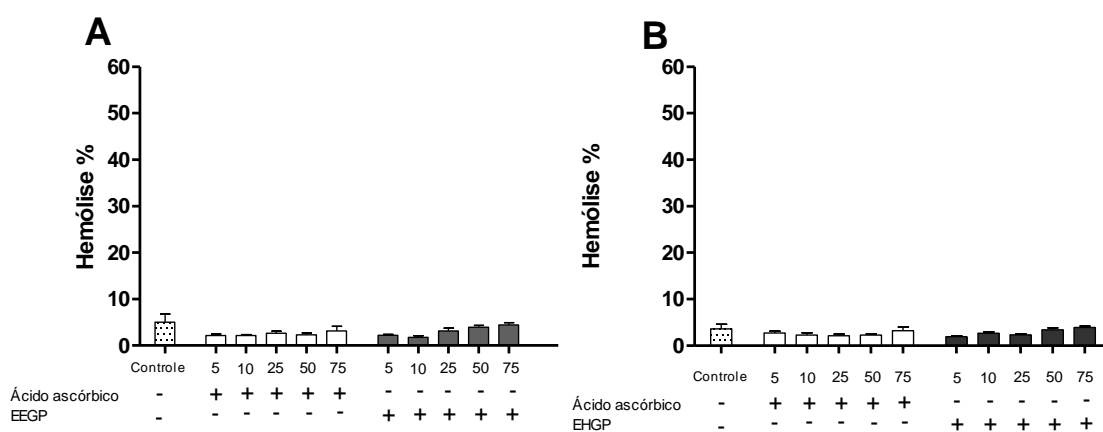
Amostras	DPPH			ABTS		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Atividade Máxima %	Atividade Máxima µg/mL	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Atividade Máxima %	Atividade Máxima µg/mL
Ácido ascórbico	2,7 ± 0,6	96,6 ± 0,3	25	1,8 ± 0,05	96,6 ± 2,4	5
BHT	16,9 ± 5,2	83,4 ± 2,1	50	8,1 ± 0,7	98,8 ± 0,2	50
EEGP	47,0 ± 8,7	95,1 ± 0,4	200	16,2 ± 0,3	97,9 ± 0,2	75
EHGP	28,9 ± 1,3	95,4 ± 0,6	75	9,5 ± 0,8	98,8 ± 0,2	50

Os valores são expressos com a média ± EPM.

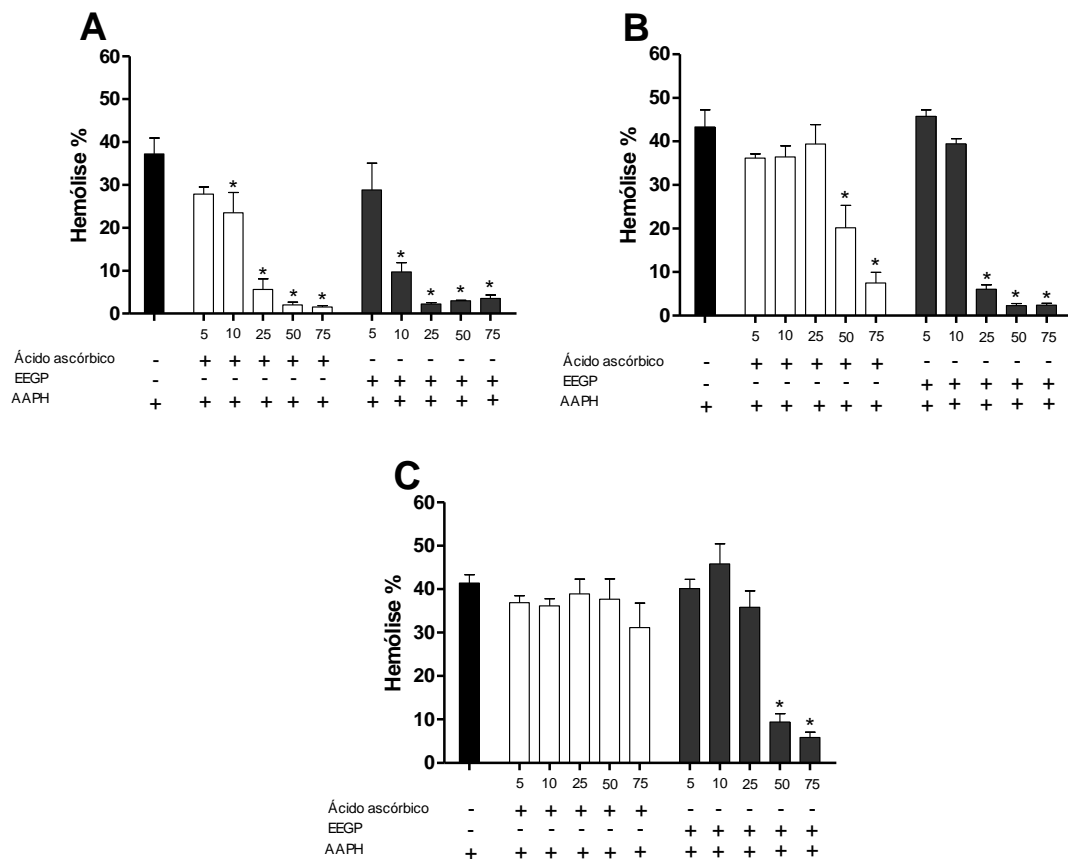
#### 4.2.2. Ensaio de hemólise e inibição de hemólise oxidativa

Os eritrócitos incubados com as diferentes concentrações dos extratos, não induziram a hemólise em eritrócitos humanos, isso indica que estes não promovem alterações neste modelo celular (**Figura 1**).

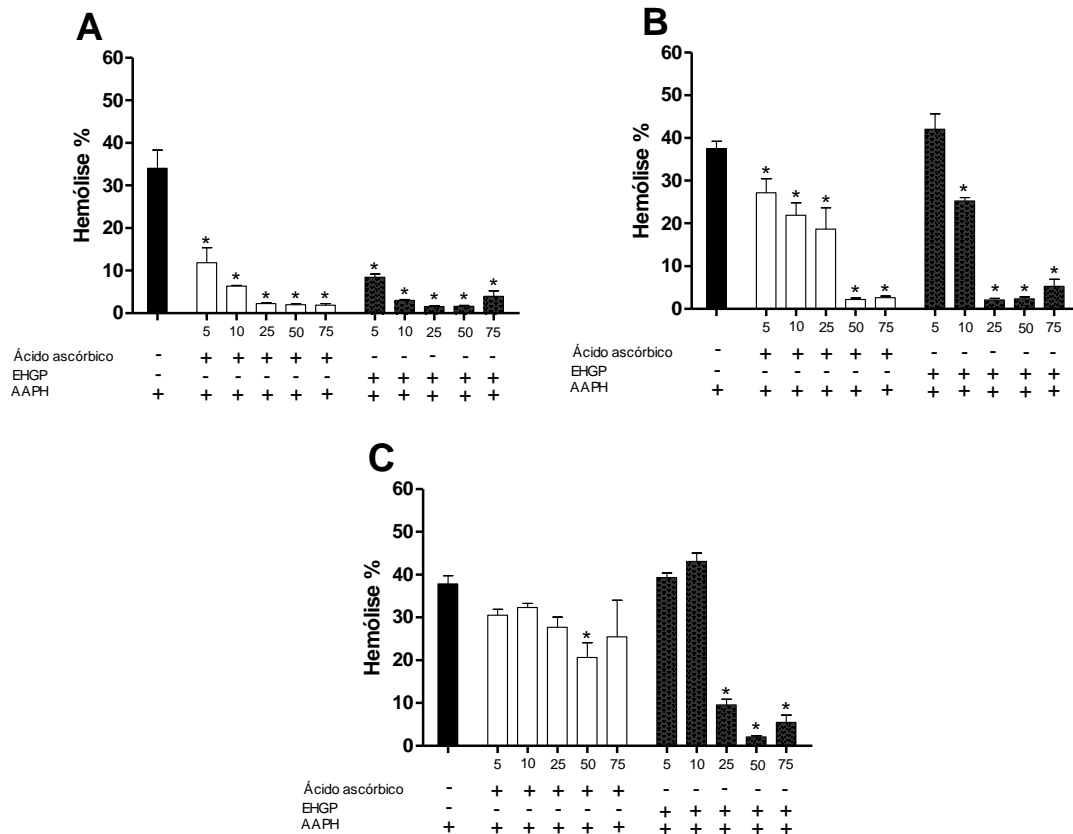
Na presença do AAPH o EEGP foi capaz de inibir a hemólise oxidativa, nas maiores concentrações (50 e 75 µg/mL) até 240 min (**Figura 2**). O EHGP protegeu os eritrócitos contra a hemólise oxidativa nas concentrações de 25-75 µg/mL no período de 240 min (**Figura 3**). Ambos os extratos apresentaram ação anti-hemolítica superior ao ácido ascórbico aos 240 min.



**Figura 1.** Percentual de hemólise de eritrócitos incubados durante 240 min, com diferentes concentrações (5-75 µg/mL) de ácido ascórbico e (A) EEGP ou (B) EHGP. O grupo controle foi incubado com NaCl 0,9%. (\*) (P<0,05) comparado ao controle.



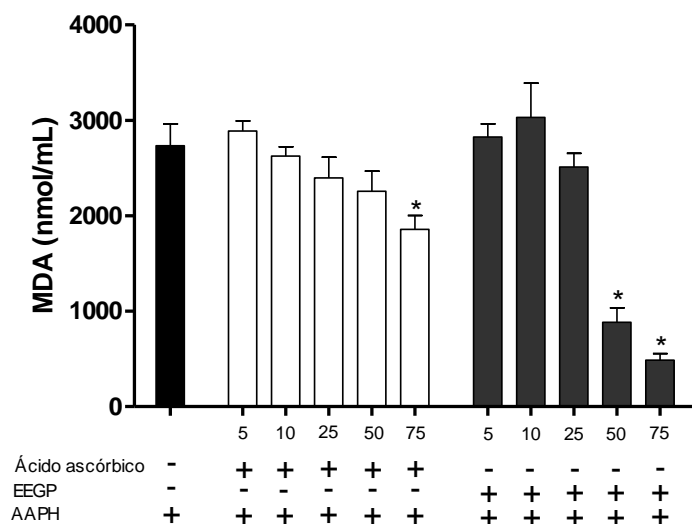
**Figura 2.** Percentual de hemólise de eritrócitos incubados com AAPH e diferentes concentrações (5-75 µg/mL) de ácido ascórbico e EEGP. (A) 120, (B) 180 e (C) 240 minutos. O grupo controle foi incubado com AAPH. Os valores são expressos com a média ± EPM. (\*) (P<0,05) comparado ao controle.



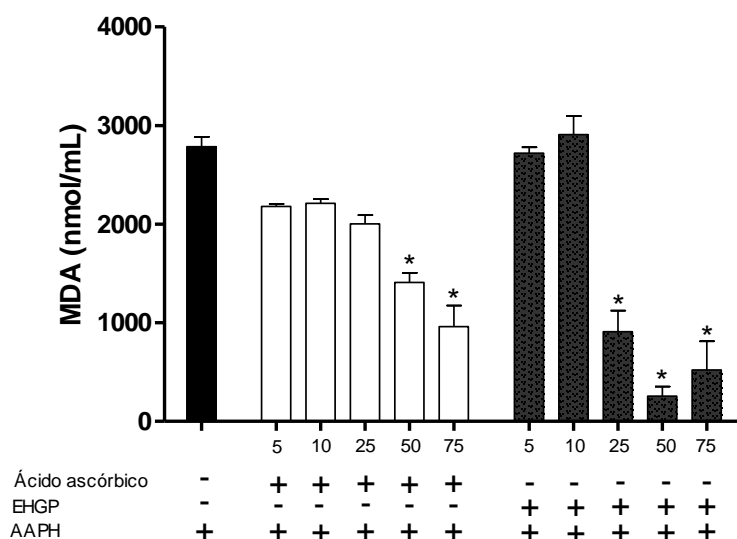
**Figura 3.** Percentual de hemólise de eritrócitos incubados com AAPH e diferentes concentrações (5-75 µg/mL) de ácido ascórbico e EHGP. (A) 120, (B) 180 e (C) 240 minutos. O grupo controle foi incubado com AAPH. Os valores são expressos com a média ± EPM. (\*) (P<0,05) comparado ao controle.

#### 4.2.3. Dosagem de MDA

A capacidade do extrato em inibir a peroxidação lipídica foi avaliada através da dosagem dos níveis de MDA. O EEGP (**Figura 4**) e EHGP (**Figura 5**) foram capazes de reduzir os níveis de MDA no período de 240 min em  $82,24 \pm 2,5\%$  e  $81,23 \pm 10\%$ , na concentração de 75 µg/mL, respectivamente.



**Figura 4.** Concentração de MDA em eritrócitos incubados com diferentes concentrações (de ácido ascórbico e EEGP 5-75 µg/mL), após 240 minutos. O grupo controle foi incubado com AAPH. Os valores foram expressos como média ± EPM. (\*) (P<0,05) comparados ao grupo controle.



**Figura 5.** Concentração de MDA em eritrócitos incubados com diferentes concentrações (de ácido ascórbico e EHGP 5-75 µg/mL), após 240 minutos. O grupo controle foi incubado com AAPH. Os valores foram expressos como média ± EPM. (\*) (P<0,05) comparados ao grupo controle.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que os extratos de geoprópolis de *M. q. anthidioides*, apresentam importante ação antioxidante. Os compostos identificados nos extratos EEGP e EHGP foram diterpenos, ácidos fenólicos e flavonoides, os quais são descritos por apresentar potencial antioxidante. Wang *et al.* (2002) e Bajpai *et al.* (2014) verificaram ação antioxidante dos diterpenos ferruginol e sugiol, isolados de extratos de coníferas. Já Dutra *et al.* (2014), observou a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata*, relacionada a presença de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis. Adicionalmente, Campos *et al.* (2014) verificaram a ação antioxidante do extrato hidroetanólico da própolis de *Melipona orbignyi*, pela captura de radicais livres DPPH e inibição de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, atribuída a presença de compostos fenólicos e terpenos.

Neste estudo, o EHGP apresentou maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides comparado ao EEGP. Provavelmente o extrato hidroetanólico foi capaz de extrair compostos de diferentes polaridades. A extração de compostos orgânicos varia de acordo com as características químicas e a polaridade desses compostos, que podem ser solúveis em diferentes solventes (Martins *et al.*, 2013). Os solventes mais adequados para extração de compostos são aqueles com misturas aquosas, que podem conter etanol, metanol, acetona ou acetato de etila (Sultana *et al.*, 2009).

Seo *et al.* (2014) demonstraram que o teor de fenólicos totais e flavonoides das folhas de goiabeira *Psidium guajava*, foi superior no extrato hidroetanólico comparado ao extrato aquoso e extrato etanólico. Resultado semelhante foi evidenciado por Sultana *et al.* (2009), que verificaram que os solventes hidroetanólico e hidrometanólico de diferentes plantas medicinais, exibiram concentrações mais elevadas de compostos fenólicos e atividade antioxidante, quando comparados aos extratos de etanol e metanol absolutos.

Após verificar a presença de compostos antioxidantes no EEGP e EHGP de geoprópolis de *M. q. anthidioides*, o potencial antioxidante foi determinado pela captura dos radicais livres DPPH e ABTS. Esses dois métodos foram eficientes em demonstrar a capacidade dos extratos em capturar radicais livres.

Mas eles apresentam algumas diferenças, o DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, solúvel em meios orgânicos (especialmente em meios alcoólicos (Arnao, 2000; Karadag *et al.*, 2009). Já o ABTS é um substrato de peroxidase, que ao ser oxidado por um agente oxidante forma um radical estável ABTS<sup>+</sup> (Arnao, 2000). Ele pode ser solubilizado em meios aquosos e orgânicos, assim utilizando a mesma amostra pode-se avaliar a capacidade antioxidante dos compostos hidrofílicos e lipofílicos (Arnao *et al.*, 2001; Karadag *et al.*, 2009)

Ambos os extratos apresentaram propriedade antioxidante provavelmente mediada pela presença de compostos fenólicos. O potencial antioxidante dos extratos de geoprópolis também foi observado em modelo de eritrócitos humanos. Os compostos fenólicos apresentam a capacidade de prevenir danos oxidativos na membrana dos eritrócitos e aumentar a resistência às lesões geradas pelos agentes oxidantes (Moreno, 2000; Asgary *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2011). Essa atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada à presença de grupos hidroxila em sua estrutura, que são propensos a doar hidrogênio ou elétrons (Daí e Mumper, 2010). Já os flavonoides agem doando hidrogênio e elétrons (Barreiros *et al.*, 2006) e também têm tendência de quelar metais devido a presença de grupos hidroxila e carboxila presentes em sua estrutura (Michalak, 2006; Symonowicz e Kolanek, 2012).

## **CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostram que os extratos de geoprópolis de *M. q. anthidioides*, apresentam capacidade antioxidante provavelmente relacionada à ação dos compostos fenólicos e terpenos. Além disso, os extratos não promoveram hemólise em eritrócitos humanos. Assim, o geoprópolis apresenta potencial para serem investigadas outras propriedades terapêuticas, incluindo sua utilização na prevenção ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, neurológicas, diabetes e câncer.

## REFERÊNCIAS

Akatsu, I. P. *Resinas vegetais coletadas por Scaptotrigona (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana*. Tese (Doutorado em Entomologia) – Departamento de Biologia. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.

Andena, S. R. A.; Bego, L. R.; Mechi, M. R. Comunidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) de uma área de cerrado (Corumbataí-SP) e suas visitas às flores. *Revista Brasileira de Zoociências*, v.7,n.1. 2005.

Arnao, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v.11, p.419–421. 2000.

Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, v.73, p.239–244. 2001.

Asgary, S.; Naderi, G.H.; Askari, N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental & Clinical Cardiology*, v.10, p.88–90. 2005.

Babich, H. Butylated Hydroxytoluene (BHT): A Review. *Environmental Research*, v.29, p.1-29. 1982.

Bagchi, K; Puri, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*, v.4, n.2. 1998.

Bajpai, V. K.; Sharma, A.; Kang, S. C.; Baek, K.-H. Antioxidant, lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging efficacy of a diterpenoid compound sugiol isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.2014, p.9-15. 2014.

Bankova, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v.1, n.2, p.23-28. 2009.

Bankova, V.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v.31, p.3–15. 2000.



Bankova, V.; Christov, R.; Marcucci, C.; Popov, S. Constituents of Brazilian Geopropolis. *Z. Naturforsch*, v.53c, p.402-406. 1998.

Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, v.8.1, n.2014. 2014.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1. 2006.

Barni, G. S.; Strapazzon, R.; Guerra, J. C.; Moretto, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, v.6, n.1, p.8-14. 2007.

Berger, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clinical Nutrition*, v.24, p.172–183. 2005.

Berlinck, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. *Ciência e Cultura*, v.64, n.3. 2012.

Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ Journal*, v.5, n.1, p.9-19. 2012.

Bonatti, V.; Simões, Z. L.; Franco, F. F.; Francoy, T. M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, v.101, n.1, p.17-24. 2014.

Borsato, D. M.; Prudente, A. S.; Doll-Boscardin, P. M.; Borsato, A. V.; Luz, C. F.; Maia, B. H.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F.; Miguel, M. D.; Farago, P. V.; Miguel, O. G. Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in southern Brazil. *Journal of Medicinal Food*. v.17, n.7, p.817-25. 2014.

Burton, G. J. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v.25, n3, p. 287–299. 2011.

Campos, J. F.; Santos, U. P.; Macorini, L. F.; Melo, A. M.; Balestieri, J. B.; Paredes-Gamero, E. J.; Cardoso, C. A.; De Picoli Souza, K.; Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, v.65, p.374-380. 2014.

Campos, J. F.; Santos, U. P.; Rocha, P. S.; Damião, M. J.; Balestieri, J. B. P.; Cardoso, C. A. L.; Paredes-Gamero, E. J.; Estevinho, L. M.; Souza, K. P.; Santos, E. L. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2015, p. 1-11. 2015.

Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v.51, p.15–25. 2013.

Cheeseman, K. H.; Slater T. F. An introduction to free radicals chemistry. *British Medical Bulletin*, v.49, p.481–93. 1993.

Cinegaglia, N. C.; Bersano, P. R. O.; Araújo, M. J. A. M.; Búfalo, M. C.; Sforcin, J. M. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells *in vitro*. *Journal of Evidence-Based Complementary*, v.2013. 2013.

Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, v.17, n.10, p.1.195-1.214. 2003.

Cruz, L. C.; Araújo, V. A.; Dolder, H.; Araújo, A. P.; Serrão, J. E.; Neves, C. A. Morphometry of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. *Neotropical Entomology*, v.40, n.6, p. 677-681. 2011.

- Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L. C. C.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M. A.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.13, n.23. 2013.
- Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, v.15, p.7313-7352. 2010.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, v.52, n.4, p.601-623. 2006.
- Deichmann, R.; Lavie, C.; Andrews, S. Coenzyme Q10 and Statin-Induced Mitochondrial Dysfunction. *The Ochsner Journal*, v.10, p.16–21. 2010.
- Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. International journal of Biomedical science*, v.82, n.1, p.47-95. 2002.
- Duailibe, S. A. C.; Gonçalves, A. G.; Ahid, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *Journal of Applied Oral Science*, v.15, n.5. 2007.
- Dutra, R. P. *Características Físico-Químicas do Geoprópolis de Melipona fasciculata Smith (Tiúba) produzido no estado do Maranhão*. Tese (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Centro de ciências biológicas e da saúde. Maranhão: Universidade do Maranhão, 2006.
- Dutra, R. P.; Abreu, B. V.; Cunha, M. S.; Batista, M. C.; Torres, L. M.; Nascimento, F. R.; Ribeiro, M. N.; Guerra, R. N. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, n.12, p.2549-57. 2014.
- Dutra, R. P.; Nogueira, A. M. C.; Marques, R. R. O.; Costa, M. C. P.; Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.4, p. 557-562. 2008.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT(E 321) as a food additive. *European Food Safety Authority Journal*, v.10, n.3, p.25-88. 2012.

Franchin, M.; Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Koo, H.; Alencar S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. 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. 2012.

Franchin, M.; Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Bueno-Silva, B.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2013. 2013.

Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, v.97, p.5–13. 1994.

Fusco, D.; Colloca, G.; Monaco, M. R. L.; Cesari, M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, v.2, n.3, p.377–387. 2007.

Girotti, A. W. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, v. 1, p. 87-95, 1985.

Gonçalves, W. G.; Fialho, M. C.; Azevedo, D. O.; Zanuncio, J. C.; Serrão, J. E. Ultrastructure of the excretory organs of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini): bee without rectal pads. *Microscopy and Microanalysis*, v.20, n.1, p.285-295. 2014.

Gupta, D., Gupta, R.K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.11, p.1–9. 2011.

Halliwell, B. Antioxidant Characterization. *Biochemical Pharmacology*, v.49, n.10, p.1341-1348. 1995.

- Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.57, n.5, p.715S-724S. 1993.
- Hamid, A. A.; Aiyelaagbe, O. O.; Usman, L. A.; Ameen, O. M.; Lawal, A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v.4, n.8, p.142-151. 2010.
- Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, v.342.1993.
- Hrncir, M.; Gravel, A. L.; Schorkopf, D. L.; Schmidt, V. M.; Zucchi, R.; Barth, F. G. Thoracic vibrations in stingless bees (*Melipona seminigra*): resonances of the thorax influence vibrations associated with flight but not those associated with sound production. *Journal of Experimental Biology*, v.211, n.5, p.678-685. 2008.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, butylated hydroxytoluene (BHT). *International Agency of Research on Cancer*, v.40, p.161–206.1986.
- Kand'ár, R.; Žáková, P.; Mužáková, V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, v.365, p.249–256. 2006.
- Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, v.2, p.41–60. 2009.
- Kerr, W. E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, v.5, p.181–276. 1948.
- Kleinert, A., M. P. Colony strength and queen replacement in *Melipona marginata* (Apidae: Meliponini). *Brazilian Journal of Biology*, v.65, n.3, p.469-476. 2005.

- Liberio, S. A.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R. P.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A. M.; Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N.; Nascimento, F. R.; Guerra, R. N.; Monteiro-Neto, V. 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, p.1–10. 2011.
- Martins, C. R.; Lopes, W. A.; Andrade, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, v.36, n. 8, p.1248-1255. 2013.
- Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; Castro, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, v.32, n.8, p.595–603.1999.
- McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, v.108, n.8, p.652-659. 2000.
- Meda, A.; Lamien, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, v.91, p.571–577. 2005.
- Michalak, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.15, n. 4, p.523-530. 2006.
- Michener, C. D. *The Bees of the world*. 2. ed. United States of America: The Johns Hopkins University Press, 2007.
- Miguel, M. G.; Nunes, S.; Dandlen, S. A.; Cavaco, A. M.; Antunes, M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*, v.34, n.1, p.16-23. 2014.
- Mohamed, M.; Sirajudeen, K. N. S.; Swamy, M.; Yaacob, N. S.; Sulaiman, S. A. Studies on the Antioxidant Properties of Tualang Honey of Malaysia. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, v.7, n.1, p.59–63. 2010.

Moniruzzaman, M.; Khalil, M. I.; Sulaiman, S. A.; Gan, S. H. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.13. 2013.

Moreno, M. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.109–114. 2000.

Naidu, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, v.2, n7. 2003.

Neves, C. A.; Gitirana, L. B.; Serrão, J. L. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, v.63, n.4, p.683-690. 2003.

Nogueira-Neto, P. *Vida e criação de Abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Nogueirapis, 1997. p.1-445.

Nunes, L. A.; Araújo, E. D.; Carvalho, C. A. L.; Waldschmidt, A. M. Population Divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) Endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brazil. *Sociobiology*, v.52, n.1. 2008.

Nunes, L. A.; Passos, G. B.; Carvalho, C. A.; Araújo, E. D. Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). *Brazilian Journal of Biology*, v.73, n.4, p.887-893. 2013.

Oliveira, F. F.; Richerds, B. T. T.; Silva, J. R.; Farias, R. C.; Matos, T. A. L. *Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)*. Teré: IDSM, 2013. p.1-267.

Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, v.87, n.1, p.315–424. 2007.

Pham-Huy, L. A.; He, H. Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of biomedical science*, v.4, n.2. 2008.

Pimentel, R. B.; Costa, C. A.; Albuquerque, P. M.; Júnior, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.13. 2013.

Pinto, L. Z.; Laure, M. A.; Bitondi, M. M.; Hartfelder, K.; Simões, Z. L. Ventral nerve cord remodeling in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata anthidioides*, Hymenoptera, Apidae) depends on ecdysteroid fluctuation and programmed cell death. *International Journal of Developmental Biology*, v.47, n.5, p.385-8. 2003.

Prakash, S.; Sunitha, J.; Hans, M. Role of coenzyme Q10 as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. *Indian Journal of Pharmacology*, v.42, n.6, p.334–337. 2010.

Rahal, A.; Kumar, A. Singh, V.; Yadav, B.; Tiwari, R.; Chakraborty, S.; Dhama, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, v.2014, p.1-19. 2014.

Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v.29, n.4, p.755-760. 2006.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v.26, n.9-10, p.1231–1237. 1999.

Ribeiro-Junior, J. A.; Franchin, M.; Cavallini, M. E.; Denny, C.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2015. 2015.

Sena, L. A.; Chandel, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, v.48, n.2. p.158–167.2012.

Seo, J.; Lee, S.; Elam, M. L.; Johnson, S. A.; Kang, J.; Arjmandi, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Science & Nutrition*, v.2, n.2, p.174–180. 2014.



- Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*, v.82, p.291-295. 1997.
- Silva, E. C. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Zilse, G. A. C. Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees. *Química Nova*, v.36, n.5. 2013.
- Silva, I. A.; Silva, T. M.; Camara, C. A.; Queiroz, N.; Magnani, M.; Novais, J. S.; Soledade, L. E.; Lima Ede, O.; Souza, A. L.; Souza, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, v.141, n.4, p.3552-3558. 2013.
- Silva, T. M. S.; Camara, C. A.; Lins, A. C. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, E. M. S.; Freitas, B. M.; Santos, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.507–511. 2006.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente, 2002. p.253.
- Silveiro, M. S.; Rodovalho, V. R.; Bonetti, A. M.; Oliveira, G. C.; Cuadros-Orellana, S.; Ueira-Vieira, C.; Santos, A. R. Preliminary Characterization of Mitochondrial Genome of *Melipona scutellaris*, a Brazilian Stingless Bee. *BioMed Research International*, v.2014. 2014.
- Souza, B. A.; Carvalho, C. A.; Alves, R. M. Flight activity of *Melipona asilvai* Moure (Hymenoptera: Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, v.66, n.2B, p.731-737. 2006.
- Souza, S. A.; Camara, C. A.; Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2013. 2013.
- Sultana, B.; Anwar, F.; Ashaf, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, v.14, p.2167-2180. 2009.

Sultan, S. Reviewing the Protective Role of Antioxidants in Oxidative Stress Caused by Free Radicals. *Asian Pacific Journal of Health Science*, v.1, n.4, p.401-406. 2014.

Sun, C.; Wu, Z.; Wang, Z.; Zhang, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing propolis extracts. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, v.2015. 2015.

Symonowicz, M.; Kolanek, M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, v.76, n.1, p.35-41. 2012.

Tavares, M. G.; Pietrani, N. T; Durvale, M. C.; Resende, H. C.; Campos, L. A. O. Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations. *Genetics and Molecular Biology*, v.36, n.1, p.111-117. 2013.

Tomé, H. V. V.; Martins, G. F.; Lima, M. A.; Campos, L. A. O.; Guedes, R. N. C. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One*, v.7,n.6. 2012.

Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v.1660, p.171–199. 2004.

Valente, M. J.; Baltazar, A. F.; Henrique, R.; Estevinho, L.; Carvalho, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, p.86–92. 2011.

Valenzuela, A. B.; Nieto, S. K. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, v.47, n.3, p.186-196. 1996.

Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v.160, n.1, p.1-40. 2006.

- Velikova, M.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, v.71, p.693-696. 2000.
- Vénus, S.; Moliné, T.; Somora, R.; Paciucci, R.; Kondon, H. Leonart, M. E. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, v.12, p.376–390. 2013.
- Viana, J. L.; Francisco, A. K.; Carvalho, C. A.; Waldschmidt, A. M. Variabilidade genética em *Melipona scutellaris* de Recôncavo, Bahia, Brasil. *Genetics and Molecular Research*, v.12, n.3, p.3444-3454. 2013.
- Waldschmidt, A. M.; Marco-Júnior, P.; Barros, E. G; Campos, L. A. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v.62, n.4B, p.923-928. 2002.
- Wang, B. S.-Y.; Wu, J.-H.; Shyur, L.-F.; Kuo, Y.-H.; Chang, S.-H. Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*, v.56, p.487–492. 2002.
- Young, I. S.; Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, v54, p.176–186. 2001.
- Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M; Vermeulen, N. P. E. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, p.202–226. 1999.