

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da
Biodiversidade - PPGECB

Caracterização da atividade antimicrobiana e antioxidante da
própolis das abelhas nativas *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca*
***angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)**

Jaqueline Ferreira Campos

Dourados – Mato Grosso do Sul
Fevereiro – 2012

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da
Biodiversidade - PPGECB

Caracterização da atividade antimicrobiana e antioxidante da
própolis das abelhas nativas *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca*
***angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)**

Jaqueline Ferreira Campos

Orientador:

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Dourados – Mato Grosso do Sul

Fevereiro – 2012

Caracterização da atividade antimicrobiana e antioxidante da própolis das abelhas nativas *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbigny* (Hymenoptera, Apidae)

Jaqueline Ferreira Campos

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Entomologia

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Orientador – UFGD

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero
Membro Titular – UNIFESP

Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri
Membro Titular – UFGD

Prof. Dra. Kely de Picoli Souza
Membro Titular – UFGD

Dedico este trabalho:

À Deus, por sempre ouvir minhas preces;

Aos meus pais Ivo Campos da Silva e Eunice Ferreira Carnaúba da Silva, pelo amor, dedicação, alegria, educação e por acreditar na minha capacidade de alcançar meus ideais;

Ao meu irmão Bruno Ferreira Campos, pelo grande carinho, risadas e amizade;

À minha irmã Angela Ferreira Campos (in memoriam), que muito cedo se tornou nosso anjo da guarda;

E ao meu noivo, Elieú Damacena do Amaral, pelo imenso amor, alegria e paciência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, pela confiança, oportunidade e orientação na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri (Zézo), pelo fornecimento das amostras de própolis;

À Prof^ª. Dr^ª. Kely de Picoli Souza, pelos ensinamentos, atenção e coordenação, juntamente com o Prof. Edson, dos seminários do GEBBAM (Grupo de Estudos de Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo), estes foram de grande valia para meu aprendizado;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, pelos ensinamentos;

À Prof^ª. Msc. Adriana Mary Mestriner e Luis Fernando Benitez Macorini, pela colaboração nos ensaios antimicrobianos;

Ao Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), por permitir o uso do laboratório de microbiologia;

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), onde realizei a graduação em Ciências Biológicas e o mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade;

Aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, pela grande ajuda quando precisávamos de materiais;

Aos membros do GEBBAM, pela grande ajuda na realização deste trabalho, pela troca de conhecimento e pelos momentos de descontração;

Aos colegas de mestrado, pelos grupos de estudos, almoços, pelas inúmeras festinhas de aniversário surpresa, pela inesquecível viagem à Natal/RN, pelas risadas, amizade...

Aos meus queridos vizinhos José e Zenilda, minha segunda família, pelo carinho, atenção e em especial, pelas caronas desde o pré-escolar até a universidade.

À minha amiga da vida inteira, Carolina de Souza Oliveira, ou apenas Carol, pela amizade verdadeira, amor, companheirismo, brincadeiras, conversas, risadas...

Às minhas queridas amigas Juliane, Juliana, Deborah e Milena, esta também cunhada, pelos momentos de descontração, amizade, alegria...

Em especial, à minha amiga e companheira Carolina Santos Pereira Cardoso Trindade, ou simplesmente CAROL! Esta, mais do que ninguém, faz parte deste trabalho, de cada detalhe. Obrigada pela amizade sincera, pelas conversas, conselhos, carinho, risadas (que não foram poucas), viagens, ensinamentos, estudos, paciência...

À banca julgadora, pela disponibilidade em avaliar minha dissertação e colaboração para melhoria da mesma;

À instituição FUNDECT, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho;

A todos, muito obrigada!!!

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1. Introdução.....	01
1.1. Abelhas sem ferrão.....	01
1.2. Mel.....	07
1.3. Pólen.....	08
1.4. Geoprópolis.....	09
1.5. Própolis.....	10
1.5.1. Potencial terapêutico da própolis produzida pelas abelhas sem ferrão.....	13
1.5.1.1. Potencial antimicrobiano.....	13
1.5.1.2. Potencial antioxidante.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. Materiais e métodos.....	19
3.1. Coleta da própolis.....	19
3.2. Preparo dos extratos etanólicos da própolis (EEP).....	19
3.3. Atividade antimicrobiana.....	20
3.3.1. Método de difusão em ágar (avaliação qualitativa).....	20
3.3.1.1. Preparação do inóculo e do ágar.....	20
3.3.1.2. Inoculação das bactérias e amostras a serem avaliadas.....	21

3.3.1.3. Incubação e leitura dos halos de inibição.....	22
3.4. Concentração Inibitória Mínima – CIM (avaliação quantitativa).....	22
3.5. Atividade antioxidante	24
3.5.1. Atividade de captação do radical livre DPPH	24
3.5.2. Proteção da hemólise de eritrócitos induzida por AAPH	27
3.6. Cálculos e Análises estatísticas	31
4. Resultados.....	33
4.1. Preparação do extrato.....	33
4.2. Atividade antimicrobiana.....	33
4.2.1. Método de difusão em Ágar.....	33
4.2.2. Concentração Inibitória Mínima – CIM	36
4.3. Atividade Antioxidante.....	39
4.3.1 Atividade de captação do radical livre DPPH – Própolis.....	39
4.4. Proteção contra hemólise de eritrócitos induzida por AAPH.....	44
5. Discussão	52
6. Conclusões.....	56
7. Referências	57

Resumo

As espécies de abelhas sem ferrão *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* são conhecidas popularmente pelo uso de seus produtos naturais, visando especialmente suas propriedades medicinais. Entretanto, o número de trabalhos científicos que comprovam suas ações terapêuticas ainda é escasso na literatura. Assim, este estudo buscou avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante da própolis das três espécies de abelhas citadas, encontradas no Mato Grosso do Sul. Na realização deste estudo, as amostras de própolis foram coletadas e os respectivos extratos preparados. O perfil antimicrobiano foi determinado utilizando-se as técnicas de difusão em ágar e microdiluição contra o fungo *Candida albicans* e as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para determinação da atividade antioxidante, foram realizados os métodos de captação do radical livre DPPH e proteção hemolítica de eritrócitos induzida pelo agente oxidante AAPH. Os resultados obtidos mostram que a própolis de todas as abelhas inibiram o crescimento do fungo *C. albicans* e da bactéria gram-positiva *S. aureus*, entretanto, não inibiram o crescimento da bactéria gram-negativa *E. coli*. A capacidade antioxidante da própolis de *M. orbignyi* apresentou-se relevante comparada aos controles utilizados. A própolis de *P. catamarcensis* e *T. a. fiebrigi* apresentaram menor atividade antioxidante, em relação aos seus controles. A capacidade de proteção de hemólise da própolis de *M. orbignyi* foi verificada após 60 e 120 minutos de incubação com o indutor de hemólise AAPH, além de não terem sido observados indícios de danos na membrana dos eritrócitos na ausência do oxidante. Em conjunto, os resultados mostram potenciais terapêuticos e biotecnológicos das própolis das abelhas sem ferrão

estudadas. Futuras análises serão realizadas para identificar e isolar as substâncias responsáveis pelos efeitos observados, bem como para investigar outras propriedades biológicas das própolis produzidas por estas espécies de abelhas.

Palavras-chave: Meliponíneos, CIM, radicais livres, hemólise.

Abstract

The species of stingless bees *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Melipona orbignyi* are known popularly by the use of its natural products, aiming especially its medicinal properties. However, the number of scientific studies that prove its therapeutic action is still scarce in literature. Thus, this study sought to evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of the three cited bee species that can be found in Mato Grosso do Sul. In this study propolis samples were collected and extracts were prepared. The profile antimicrobial was determined using techniques of agar diffusion and microdilution against fungus *Candida albicans* and bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. For determination of antioxidant activity, were performed the DPPH radicals free scavenging and protection against AAPH-induced erythrocyte hemolysis methods. The results obtained showed that propolis of all bees inhibited the growth of fungus *C. albicans* and gram-negative bacteria *S. aureus*, however, it did not inhibit the growth of gram-negative bacteria *E. coli*. The antioxidant capacity of *M. orbignyi* propolis showed to be relevant when compared to control. Propolis from *P. catamarcensis* and *T. a. fiebrigi* showed lower antioxidant activity compared to its controls. The protective capacity of hemolysis of *M. orbignyi* propolis was observed after 60 and 120 minutes incubation with AAPH hemolysis inductor and it was not observed signs of damage in erythrocyte membrane in absence of oxidant. Together the results showed therapeutic and biotechnological potential of propolis of the stingless bees studied. Future analyzes will be performed to identify and isolate the responsible substances for the observed

effects, as well as to investigate other biological properties of propolis produced by those bee species.

Keywords: stingless bees, MIC, free radicals, hemolysis.

1. Introdução

1.1. Abelhas sem ferrão

A ordem Hymenoptera é uma das mais diversas entre os insetos, a qual é considerada, do ponto de vista humano, a mais benéfica desta classe, pois incluem espécies parasitas ou predadores de outros insetos que promovem prejuízos econômicos, além dos mais importantes polinizadores de plantas, as abelhas. Estes últimos indivíduos exibem grande diversidade de hábitos, comportamentos e são altamente sociais (Triplehorn e Johnson, 2011).

A origem das abelhas ainda não está bem definida, pois os fósseis destes insetos são raros (Grimaldi e Engel, 2005). O fóssil mais antigo é de *Cretotrigona prisca*, datado do Cretáceo Superior, encontrado no leste da América do Norte (Michener e Grimaldi, 1988; Engel, 2000). Estima-se que *Cretotrigona prisca* tenha aproximadamente 65 milhões de anos (Engel, 2000) e, como estas abelhas pertencem a um dos grupos mais derivados, presume-se que grande parte da diversidade morfológica e comportamental exibida pelas abelhas hoje, já existia ao final do Cretáceo (Silveira e cols., 2002).

Em 2011, foi descrito um fóssil da superfamília Apoidea, em Myanmar, datado de meados do Cretáceo, há cerca de 100 milhões de anos, preservado em âmbar. Este fóssil, denominado *Melittosphex burmensis*, exibe uma combinação de características de vespas e abelhas, demonstrando uma importante forma de transição entre estes grupos. Possui pêlos ramificados na cabeça e pernas, sugerindo uma espécie coletora de pólen (Danforth e Poinar Jr., 2011).

Estimativas indicam que a origem das abelhas se assemelha com a das angiospermas (Silveira e cols., 2002; Grimaldi e Engel, 2005), e que sem estes insetos, muitas plantas não teriam chegado a existir (Nogueira-Neto, 1997). As abelhas sociais da família Apidae transportam o pólen das flores quase sempre nas corbículas, concavidade na tíbia das pernas posteriores das operárias, ladeada por grandes pêlos, que é utilizada para carregar pólen das flores ou outras substâncias para seus ninhos (Nogueira-Neto, 1997; Silveira e cols., 2002).

A biologia da família Apidae é altamente variável, pois contém espécies solitárias e sociais, além de parasitas e cleptoparasitas. Seus ninhos podem ser formados em orifícios no solo, em cavidades pré-existentes de madeiras ou construções. Podem ser classificados nas subfamílias Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Esta última é constituída por dois grupos de abelhas, as corbiculadas e não corbiculadas. Dentre as que possuem corbícula, estão às abelhas das tribos Apini, Euglossini, Bombini e Meliponini (Michener, 2007).

Apenas as espécies da tribo Meliponini não possuem ferrão (Silveira e cols., 2002). Os Meliponíneos, também denominados abelhas indígenas sem ferrão, ocupam grande parte das regiões de clima tropical e algumas regiões de clima temperado subtropical. São encontrados na maioria do território Latino-Americano, e em algumas regiões do México, África, Austrália, Índia e China (Nogueira-Neto, 1997).

Estas abelhas são eussociais, embora algumas delas vivam de alimento roubado de colônias de outras espécies (Silveira e cols., 2002). Em geral, nidificam em cavidades pré-existentes, como buracos em troncos de árvores, chão ou paredes, ninhos abandonados de cupins e formigas. Porém, também

podem construir ninhos subterrâneos, pendentes em ramos de árvores, paredes de casas ou edifícios, ou seja, a característica do ninho varia muito de acordo com a espécie (Nates-Parra, 2001).

As abelhas do gênero *Melipona* não constroem células reais. Rainha, machos e operárias nascem e se desenvolvem em células do mesmo tamanho. Geralmente a entrada de seu ninho possui um aspecto raiado, constituído de barro ou de geoprópolis, barro misturado à própolis (Figura 1 A). Nos outros gêneros, é comum a abelha rainha emergir de uma célula real. Muitas de suas espécies fazem a entrada do ninho em forma de tubo, mediano ou pequeno, composto por cerume, uma mistura de cera secretada pelas abelhas, e própolis (Figura 1 B) (Nogueira-Neto, 1997).



Figura 1. Entrada do ninho de meliponíneos. (A) Gênero *Melipona*; (B) Gênero *Tetragonisca*.

Dentre as abelhas nativas encontradas no Mato Grosso do Sul, destacamos neste estudo as espécies *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbigny* (Figura 2).



Figura 2. Distribuição geográfica das espécies de abelhas sem ferrão utilizadas nesse estudo. Fonte: <http://moure.cria.org.br/catalogue>.

A espécie *Plebeia catamarcensis* (Holmberg, 1903) é encontrada na Argentina e no Brasil nos estados de Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Camargo e Pedro, 2008). Poucos estudos relatam apenas seus aspectos comportamentais (Pinho e cols., 2010) e embora também gerem própolis, não há descrições sobre as propriedades ou características deste produto natural, ou de qualquer outra substância por elas produzidas.

Uma das espécies mais estudadas é *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), a qual já foi caracterizada quanto seus aspectos comportamentais (Grüter e cols., 2011; Grüter e cols., 2012), determinação de distância genética entre populações desta espécie (Oliveira e cols., 2004) e potencial terapêutico do mel, quanto à ação antimicrobiana (Miorim e cols., 2003; DeMera e Angert, 2004; Sgariglia e cols. 2010). *T. angustula* é conhecida popularmente com jataí, ou ainda, abelha-ouro, moça-branca, mosquitinha-verdadeira, dentre outros. Pode ser encontrada no Brasil, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador,

Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname, Venezuela e Argentina (Camargo e Pedro, 2008; Sgariglia, e cols. 2010).

De acordo com Nogueira-Neto (1997), *T. angustula* é uma das melhores abelhas utilizadas na meliponicultura, pois se adapta a qualquer ambiente, inclusive urbano, é resistente, de fácil manutenção e multiplicação, produz um mel excelente, além de ser extremamente higiênica. Produz própolis, a qual é extremamente viscosa e armazenada praticamente sem mistura.

São encontradas duas subespécies de *Tetragonisca angustula*: *T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*. A primeira apresenta distribuição no Panamá e no Brasil, na região Nordeste (Maranhão), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina). *T. a. fiebrigi* é encontrada no nordeste da Argentina e em algumas regiões brasileiras, tais como Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (Oliveira e cols., 2004). Nesta espécie, como na maioria das abelhas sem ferrão, a entrada do ninho é em forma de tubo constituído de cerume, ao qual podem adicionar um pouco de cera amarela ao tubo (Nogueira-Neto, 1997).

Popularmente conhecida como mandaçaia ou mandurí-de-Mato-Grosso, a espécie *Melipona orbignyi* (Guérin, 1844) encontra-se distribuída na Argentina, Bolívia, Paraguai e no Brasil (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) (Camargo e Pedro, 2008). Nesta, assim como nas demais espécies do gênero *Melipona*, há formações de barro misturado à própolis, denominado geoprópolis. Esta mistura, preparada pelas abelhas, é utilizada para vedar frestas ou delimitar as cavidades onde estes indivíduos residem (Nogueira-Neto, 1997).

Estas espécies de abelhas sem ferrão são capazes de gerar produtos a partir de fontes vegetais, tais como mel, pólen manipulado, geoprópolis e própolis, os quais são muito apreciados quanto a suas propriedades nutricionais e/ou terapêuticas.

1.2. Mel

O mel é um produto gerado pelas abelhas, muito apreciado tanto pelo seu valor nutricional quanto medicinal. É uma substância natural produzida a partir de néctar das flores, composto principalmente por carboidratos (cerca de 95% do seu peso seco), e poucas quantidades de proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, minerais e polifenóis (principalmente flavonóides) (Alvarez-Suarez e cols., 2010).

Estudos apontam que há diferenças quanto às características físico-químicas entre o mel dos meliponíneos e de abelhas *A. mellifera*. O mel de abelhas sem ferrão apresenta um maior teor de água, valores estes que excedem a quantidade máxima, que é de 20%, de acordo com a atual regulamentação (DeMera e Angert, 2004; Anacleto e cols., 2009).

O alto teor de umidade presente nos méis de meliponíneos propicia um maior risco de fermentação e, caso não haja cuidados especiais de higiene durante a coleta, estes podem sofrer contaminação por leveduras. Se a contaminação for grande, a proteção antibiótica que os méis destas abelhas contêm pode não ser suficiente para inibir o crescimento destes microrganismos (Nogueira-Neto, 1997).

Estudos prévios demonstram a ação antimicrobiana do mel das espécies *Tetragonisca angustula* (Miorim e cols., 2003; DeMera e Angert, 2004; Sgariglia e cols., 2010) e *Plebeia wittmanni* (Sgariglia e cols., 2010) e também a

atividade antioxidante do mel produzido por *Trigona carbonaria* (Oddo e cols., 2008).

No Brasil há uma regulamentação destinada à padronização do mel visando sua comercialização, a Instrução Normativa 11, de 20 de outubro/2000 (Brasil, 2000), no entanto, destina-se ao mel da espécie *Apis mellifera*. Quanto às abelhas sem ferrão, nativas do país, não há regulamentação. Anacleto e cols. (2009) argumentam que há a necessidade de uma regulamentação própria para comercialização dos méis de meliponíneos, para que desta forma seja evitada as constantes fraudes e possibilite sua comercialização no mercado formal.

1.3. Pólen manipulado “samora ou saburá”

A origem da estreita relação entre abelhas e angiospermas ainda não é bem estabelecida, mas estima-se que a diversificação de ambas ocorreu no mesmo período. As abelhas utilizam o pólen das flores para nutrir os indivíduos da colônia, pois este é uma grande fonte de proteínas. Por outro lado, as plantas que possuem flores necessitam de um agente que leve o seu pólen de uma planta à outra, ou de uma flor à outra, ou até mesmo das anteras ao pistilo de uma mesma flor. Neste caso, as abelhas auxiliam na fecundação pelo processo de polinização, sendo considerado um dos agentes polinizadores mais eficientes (Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas procuram coletar o pólen em diversas fontes, isto para obter uma dieta mais rica e equilibrada (Modro e cols., 2007), além de buscá-los de acordo com os nutrientes contidos no seu protoplasma (Marquez-Souza e cols., 2002).

Ao observar a coleta de pólen pelos meliponíneos, Nogueira-Neto (1997) relatou que a espécie *Tetragonisca angustula* primeiro remove o pólen das anteras das flores, utilizando as pernas anteriores, e em seguida o manipula com as suas mandíbulas. Durante esse processo, ele recebe secreções salivares, provavelmente provenientes das glândulas mandibulares e hipofaríngeas. Em seguida, o pólen é transferido para as corbículas, presentes nas pernas posteriores. No interior do ninho, este produto manipulado, conhecido como samora ou saburá, que deixou de ser apenas o pólen coletado nas anteras das flores, é armazenado em potes de cerume, ou na forma de pelotas ou pastosa, neste último com a adição de um pouco de néctar.

Quanto às propriedades do pólen manipulado por meliponíneos, já foram demonstrados os potenciais nutricional (Souza e cols., 2004) e antioxidante (Silva e cols., 2009) deste produto.

1.4. Geoprópolis

Nas espécies do gênero *Melipona*, há formações de barro misturado à própolis (mistura de resina coletada pelas abelhas a partir de diferentes partes das plantas e enzimas produzidas pela própria abelha), a qual se denomina geoprópolis. Contudo, em algumas espécies, o barro e a própolis estão bem misturados, como no caso de *Melipona scutellaris*, *Melipona marginata* e *Melipona rufiventris mondury*. Enquanto em outras espécies, como foi observado em ninhos de *Melipona quadrifasciata*, *Melipona subnitida* e *Melipona orbigny*, estas duas substâncias podem ser encontradas separadas

ou grosseiramente misturadas. Esta mistura característica denomina-se “para-geoprópolis” (Nogueira-Neto, 1997)

Dutra e cols. (2008) avaliaram o geoprópolis da abelha nativa *Melipona fasciculata*, o qual, através da abordagem química dos extratos hidroalcoólicos deste produto, demonstrou a presença de substâncias das classes dos compostos fenólicos, este sendo predominante na maioria das amostras, além dos triterpenos e saponinas. Estas substâncias são comumente encontradas na própolis de *Apis mellifera* e em geoprópolis de abelhas brasileiras. Para fabricar o geoprópolis, a espécie *M. fasciculata* utiliza um teor de barro que varia entre 94-98%, e adiciona poucas porções de material vegetal.

Variações qualitativas e quantitativas de flavonóides, além de outros constituintes químicos presentes no geoprópolis, são influenciadas pela flora visitada pelas abelhas, região geográfica e fatores ambientais (Dutra e cols., 2008). Quanto às propriedades farmacológicas, já foram observadas atividades antimicrobiana e imunomodulatória deste produto (Liberio e cols., 2011).

1.5. Própolis

Própolis é um produto natural, produzido pelas abelhas a partir de diferentes partes das plantas, como de exudatos de ferimentos ocasionados em galhos, brotos e flores, e substâncias secretadas pela própria abelha (Bankova e cols., 2000).

Tanto a espécie *Apis mellifera* quanto espécies de meliponíneos utilizam a própolis para depositá-la nas paredes internas do ninho, o que ajuda a evitar umidade e correntes de ar excessivos dentro da colmeia. Também é utilizada para estreitar a entrada do ninho, evitando assim a invasão por outros insetos.

Outra prática realizada é o embalsamento de predadores e parasitas encontrados no interior da colmeia, processo no qual os organismos são recobertos por esta resina para impedir difusão do seu odor e decomposição. Adicionalmente, é comum os meliponíneos misturarem própolis com cera, resultando no cerume, o qual é utilizado para compor as estruturas do interior do ninho (Patricio e cols., 2002; Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

Teixeira e cols. (2005) observaram o comportamento de coleta de material para gerar a própolis, a partir da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia*, e verificaram que as abelhas utilizam as mandíbulas para a coleta, e manipulam o produto com o primeiro par de pernas. Em seguida, move a massa resinosa para as pernas medianas e então para a corbícula oposta ou do mesmo lado. Raramente o material é transferido diretamente do primeiro par de pernas para a corbícula.

Em amostras de própolis coletadas no Brasil, foram identificados compostos como flavonóides, ácido *p*-coumárico prenilado, derivados do ácido cafeoilquínicos e acetofenonas, di e triterpenos. Estes compostos são originários de materiais vegetais, e são apontados como um dos principais responsáveis pelas atividades biológicas deste produto, tais como, antimicrobiana, hepatoprotetora, imunomodulatória, e citotóxica (Bankova e cols., 2000; Salatino e cols., 2005). Amostras de própolis de meliponíneos do gênero *Frieseomelitta*, são compostas predominantemente por monoterpenos e diterpenos, típicos de resinas vegetais (Patricio e cols., 2002).

Os compostos identificados na própolis podem variar de acordo com a origem botânica da resina, das substâncias secretadas a partir do metabolismo

das abelhas e dos materiais que são adicionados durante sua elaboração (Marcucci, 1995).

Além disso, as peculiaridades geográficas e climáticas do local também são fundamentais para a determinação das características desta resina, o que explica a diversidade da composição química da própolis obtidas nas regiões tropicais (Bankova, 2005). A coloração desta resina também reflete esta diversidade, podendo ser creme, amarela, verde, marrom claro ou escuro (Salatino e cols., 2005).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse na própolis oriunda de regiões tropicais, especialmente do Brasil, pois este abriga grande diversidade de fauna e flora. Isto tem levado à identificação de muitos compostos novos, alguns deles com importantes propriedades terapêuticas, tais como os ácidos diterpênicos e derivados do ácido di-O-cafeoil-quínico (Bankova e cols., 2000; Velikova e cols., 2000; Bankova e cols., 2002; Pereira e cols., 2002), descritos por grupos de pesquisa nacionais (Marcucci e cols., 2001; Dota e cols., 2011; Carvalho e cols., 2011) e internacionais (Xuan e cols., 2011; Piccinelli e cols., 2011; Szliszka e cols., 2011).

1.5.1. Potenciais terapêuticos da própolis

Estudos comprovam o potencial terapêutico da própolis da espécie *Apis mellifera*, sendo relatada ação antitumoral (Orsolich e cols., 2005; Szliszka e cols., 2011), antimicrobiano (Miorin e cols., 2003; Katircioglu e Mercan, 2006; Dota e cols., 2011), antioxidante (Lu e cols., 2003; Guo e cols., 2011), entre outros. Quanto às ações terapêuticas resultantes do uso da própolis, obtida a partir de abelhas sem ferrão, foram relatadas as atividades antitumoral a partir

da espécie *Trigona laeviceps* (Umthong e cols., 2011) e antibacteriana, através de amostras de própolis das espécies *Melipona quadrifasciata*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona* sp (Velikova e cols., 2000; Miorim e cols., 2003; Farnesi e cols., 2009).

Apesar disso, de acordo com a diversidade de meliponíneos encontrados no Brasil, muitos estudos ainda precisam ser realizados, a fim de caracterizar o potencial terapêutico deste produto natural. Deste modo, estudos que visam caracterizar o potencial antimicrobiano e antioxidante da própolis de abelhas sem ferrão, presentes em território brasileiro, tais como *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbigny*, podem contribuir no tratamento de várias patologias, e diversas aplicações biotecnológicas.

1.5.1.1. Potencial antimicrobiano

Diversas doenças que afligem a saúde humana são provocadas por microrganismos, que apesar de muitas vezes participarem da microbiota do corpo humano, em quantidades excessivas, podem provocar sérias patologias. Especialmente porque são caracterizados pela rápida proliferação, e prejudicam principalmente pacientes imunodeprimidos. Dentre os patógenos mais conhecidos e estudados estão o fungo *Candida albicans* e as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Al-Waili, 2004; Dota e cols, 2011)

O fungo *Candida albicans* é frequentemente isolado de infecções superficiais e invasivas, e coloniza principalmente superfícies de mucosas da cavidade oral e vaginal, além do trato digestivo. É considerado um microrganismo oportunista, sendo o principal agente da candidíase, micose

provocada por leveduras do gênero *Candida* (Molero e cols., 2008; Barbedo e Sgarbi, 2010).

A espécie bacteriana gram-positiva *Staphylococcus aureus*, promove graves injúrias à saúde humana, sendo responsáveis por infecções endovasculares, epiteliais, sistema respiratório, articulações, dentre outros. Comumente estas bactérias colonizam pacientes com diabetes tipo 1, submetidos à hemodiálise, pós-cirúrgicos e portadores de síndrome da imunodeficiência adquirida. Adicionalmente, esta bactéria destaca-se como responsável por intoxicações alimentares, por meio da ingestão de alimentos contaminados (Franklin e Lowy, 1998; Cruvinel e cols., 2011).

A espécie bacteriana gram-negativa *Escherichia coli*, é encontrada comumente na microbiota do trato intestinal humano. É comum cepas de *E. coli* habitarem o cólon dos hospedeiros, no entanto, ao colonizarem outros nichos, podem causar sérias patologias, como doenças entéricas, meningite e infecções do trato urinário (Kaper e cols., 2004).

De acordo com Guimarães e cols. (2010) as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo e, além disso, estes patógenos demonstram altos índices de resistência aos atuais medicamentos. Produtos naturais, bem como moléculas naturais, que apresentam capacidade de inibir o crescimento ou matar estes microrganismos têm sido muito valorizados, isto porque geralmente possuem estruturas químicas complexas, importantes para as interações específicas na inibição dos mesmos.

1.5.1.2. Potencial antioxidante

Diversas patologias são desencadeadas a partir do desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e o sistema antioxidante do organismo humano, estado conhecido como estresse oxidativo. Dentre as principais condições clínicas associadas a este estado, destacam-se a aterosclerose, câncer, catarata, esclerose múltipla, diabetes, pancreatite, doença de Parkinson, o acidente vascular cerebral e a doença de Alzheimer (Ferreira e Matsubara, 1997; Giada e Filho, 2006).

Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na órbita exterior, geralmente, instáveis e muito reativas (Ferreira e Matsubara, 1997). Dentre as moléculas reativas, estão as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($\cdot OH$), peroxil (RO_2^{\cdot}), alcóxil (RO^{\cdot}) e hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) são exemplos de ERO. Enquanto o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) são ERN (Fang e cols., 2002).

Além disso, os radicais livres de oxigênio e de nitrogênio podem ser convertidos em outras espécies reativas não-radical, pois não apresentam elétrons desemparelhados na última camada, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido hipobromoso ($HOBr$) e peroxidonitrito ($ONOO^{\cdot}$). Porém, apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o $\cdot OH$ (Ferreira e Matsubara, 1997; Fang e cols., 2002).

As EROs e ERNs, entre outras espécies reativas, são comumente produzidas no organismo humano, sendo geradas através do metabolismo humano e em diversas condições fisiológicas. Estes são comumente gerados

na defesa contra infecções, a partir de neutrófilos, estimulados pela presença de microrganismos a produzirem moléculas reativas, com a finalidade de destruir tais patógenos. Todavia, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (Fang e cols., 2002; Vasconcelos e cols., 2007).

É essencial o equilíbrio entre as espécies de moléculas reativas e o sistema de defesa antioxidante. Para se proteger, a célula possui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimático. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, sendo representado principalmente pela superóxido-dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e glutatona-peroxidase (GSH-Px) que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como co-fator (Júnior e cols., 2001; Vasconcelos e cols., 2007).

Quanto ao sistema não enzimático, este é constituído por muitas substâncias, as quais podem ser agrupada em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutatona (GSH), da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como vitaminas E, C, β -caroteno e outros (Vasconcelos e cols., 2007).

Como mencionado anteriormente, o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, estado conhecido como estresse oxidativo, pode resultar em oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares, danos no DNA e proteínas, injúrias teciduais e doenças (Júnior e cols., 2001).

Neste contexto de prospecção por produtos naturais para a prevenção e/ou tratamento de várias patologias, bem como para usos biotecnológicos,

incluímos a busca do potencial antimicrobiano e antioxidante da própolis das abelhas sem ferrão *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbigny*, o que indiretamente está ligado ao melhor conhecimento das espécies e a necessidade de conservação das mesmas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante da própolis das abelhas *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi*, encontradas no Mato Grosso do Sul, Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis frente à *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Identificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos contra os microrganismos estudados;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de própolis;
- Verificar o efeito protetor do extrato da própolis de *Melipona orbignyi* contra a hemólise induzida em eritrócitos.

3. Materiais e métodos

3.1. Coleta da própolis

Todas as espécies avaliadas foram identificadas por especialistas em abelhas: a espécie *Plebeia catamarcensis* pelo Prof. Dr. João M. F. Camargo, e as espécies *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* pelo Prof. Dr. Pe. Jesus Santiago Moure.

A própolis produzida pelas abelhas sem ferrão *Plebeia catamarcensis*, foi coletada manualmente em cinco ninhos, e pelas espécies *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* foram coletadas em dois ninhos, cada uma, pelo Biólogo Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri, especialista em abelhas. As colmeias estão localizadas na região centro-oeste do Brasil, no estado de Mato Grosso do Sul, nas coordenadas 22° 13' 12" S - 54° 49' 2" O. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

3.2. Preparo dos extratos etanólicos da própolis (EEP)

Os extratos etanólicos da própolis foram preparados pelo procedimento de extração segundo Alencar e cols. (2007), com pequenas modificações. As amostras das própolis foram extraídas com etanol 80%, na proporção de 1 grama da amostra da própolis para 4,5 ml de etanol 80%. Em seguida, foram mantidos em banho-maria a 70°C. Periodicamente, os tubos eram colocados em um agitador tipo "vortex", para que a solução fosse homogeneizada até a total diluição do soluto no solvente. Depois de dissolvidos, os homogenatos

foram filtrados com o auxílio de papel filtro, para obtenção dos extratos etanólicos da própolis (EEP).

3.3. Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN (Dourados, Mato Grosso do Sul), seguindo os métodos descritos:

3.3.1. Método de difusão em ágar (avaliação qualitativa)

3.3.1.1. Preparação do inóculo e do ágar

A fim de conhecer o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis estudados, foram realizadas análises frente a três microrganismos patogênicos ao homem: o fungo *Candida albicans* (ATCC10231), a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC8739) e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

Inicialmente, os microrganismos foram reativados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, posteriormente, subcultivados em placas contendo Ágar Mueller Hinton (AMH), durante 24 h, a 37 °C, em estufa microbiológica. Após o crescimento em meio sólido, para preparar a suspensão microbiana, a superfície da colônia de interesse foi tocada com uma alça de platina e os microrganismos foram transferidos para um tubo contendo 3 ml de NaCl 0,9% (solução salina) estéril. A suspensão foi homogeneizada e ajustada até atingir a concentração equivalente ao tubo 0,5 da solução padrão de McFarland $1,5 \times 10^8$ Unidade Formadora de Colônia (UFC)/ml.

O AMH, previamente esterilizado, foi adicionado em placas com 150 mm de diâmetro, atingindo profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm. Após a solidificação do meio, os microrganismos foram impregnados conforme descrição a seguir.

3.3.1.2. Inoculação dos microrganismos e aplicação dos extratos e controles

A suspensão microbiana, com turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5, foi inoculada no ágar por meio de um *Swab*. Este processo foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil), a fim de evitar a contaminação por outros microrganismos.

Em seguida, com auxílio de tubos de inox estéreis, foram confeccionados orifícios com 6 mm de diâmetro no ágar contido nas placas (Figura 3). Posteriormente, estes foram preenchidos com aproximadamente 100 µl dos extratos etanólicos de própolis das diferentes abelhas, todos na concentração de 200 mg/ml, dispostos na mesma placa. Como controles positivos, foram utilizados cetoconazol, para *Candida albicans* e, tetraciclina, para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambos com concentração de 4 mg/ml. O solvente utilizado na extração das amostras de própolis, o etanol 80%, foi utilizado como controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata.



Figura 3. Confeção dos poços com auxílio de tubo inox estéril.

3.3.1.3. Incubação e leitura dos halos de inibição

Após inoculação dos extratos e controles, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C, durante 24 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de uma régua, foram medidos os diâmetros dos halos das zonas de inibição dos microrganismos (Figura 4).



Figura 4. Halo de inibição do crescimento microbiano.

3.4. Concentração Inibitória Mínima – CIM (avaliação quantitativa)

Esta técnica é utilizada para conhecer a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo. Portanto, este ensaio foi realizado objetivando conhecer a concentração mínima de cada amostra de própolis capaz de inibir o crescimento da levedura

Candida albicans (ATCC10231), e da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), cujos crescimentos foram inibidos no método de difusão em ágar.

Os testes foram realizados em microplacas plásticas esterilizadas, contendo 96 poços organizados em oito séries identificadas de (A) a (H), cada qual com doze poços numerados de 1 a 12. O inóculo foi preparado como descrito no item 3.3.1.1.

Em todos os poços foram adicionados 100 µl de caldo Mueller Hinton. Na primeira coluna da placa, possuía apenas o meio. Na segunda coluna, inseriu-se 100 µl do controle positivo (cetoconazol, para *Candida albicans* ou tetraciclina para *Staphylococcus aureus*) e, na coluna seguinte, foram pipetados 100 µl do controle negativo etanol 80%. O mesmo procedimento foi realizado com os diferentes extratos, nas demais colunas, sendo uma para cada extrato, onde foram adicionados 100 µl dos mesmos. As referidas alíquotas, dos diferentes tratamentos, foram adicionadas apenas no primeiro poço de cada coluna, sendo diluídos seriadamente, totalizando oito concentrações (100 a 0,78 mg/ml), exceto para o extrato de *T. a. fiebrigi*, pois para este foram necessárias menores concentrações, totalizando doze concentrações (100 a 0,045 mg/ml). Por fim, em todos os poços foram adicionados 10 µl do inóculo.

Os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo. As microplacas foram incubadas a 37° C por 24 h. Após o período de incubação, estas foram colocadas em espectrofotômetro para microplacas (Termo Plate TP-reader), com comprimento de onda de 620 nm. A Concentração Inibitória

Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento de cada microrganismo.

3.5. Atividade antioxidante

As análises de atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, na Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD (Dourados, Mato Grosso do Sul).

3.5.1. Atividade de captação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Os radicais livres estão envolvidos na oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares, danos no DNA e proteínas, injúrias teciduais, o que pode resultar em diversas doenças (Júnior e cols., 2001). Um dos métodos mais utilizado para verificar a atividade de materiais biológicos é o ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o qual é uma técnica rápida, simples e independente da polaridade da amostra (Koleva e cols., 2002).

A redução do DPPH em soluções alcoólicas por um antioxidante é verificada pela diminuição da absorbância inicial durante a reação (Figura 5). Em sua forma de radical, o DPPH absorve a 515 nm (Brand-Williams e Berset, 1995; Arnao, 2000) ou 517 nm (Lu e cols., 2003; Koleva e cols., 2002; Gupta e Gupta, 2011).

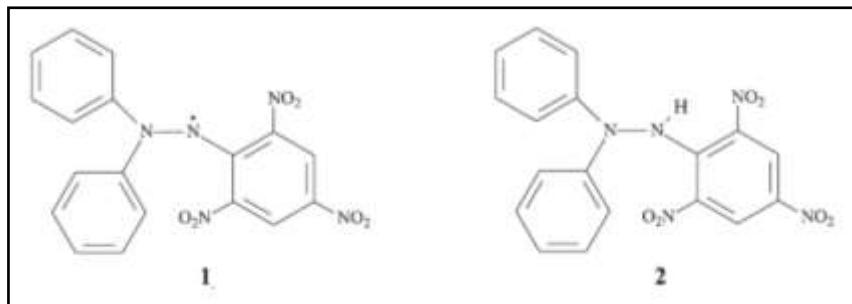


Figura 5. Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH. Fonte: Alves e cols. (2010)

Neste estudo, para avaliar a atividade antioxidante das amostras de própolis, foi verificada a capacidade destas em capturar o radical livre DPPH, de acordo com o método descrito por Gupta e Gupta (2011), com pequenas modificações. DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar uma molécula sem elétrons desemparelhados, desta forma é reduzido na presença de um antioxidante.

Para preparar a solução final de DPPH 0,10 mM, foram pesados 0,0043g de DPPH e completados 100 ml de etanol 80%. Tal solução foi preparada e mantida protegida da luz, por se tratar de uma substância fotossensível. O DPPH é um radical livre estável à temperatura ambiente, e apresenta coloração violeta.

Os extratos de própolis foram preparados em diferentes concentrações. Para análise da atividade antioxidante do controle positivo butilhidroxitolueno (BHT - um antioxidante sintético com estrutura fenólica, com característica lipossolúvel, muito utilizada na indústria alimentícia e de cosméticos) e da própolis de *Plebeia catamarcensis* e de *Tetragonisca angustula fiebrigi*, foram preparadas as seguintes concentrações: 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 e 2000 µg/ml. Já em relação ao controle positivo ácido ascórbico (Vitamina C - antioxidante hidrossolúvel, encontrado em vários alimentos) e EEP de *Melipona*

orbigny foram estudadas as concentrações 0,1; 1; 5 ; 10; 25; 50; 75; 100 e 200 µg/ml.

As cubetas foram identificadas com as diferentes concentrações dos extratos e substância padrão. Em seguida, foram adicionadas 1800 µl de solução etanólica de DPPH e 200 µl de EEP ou substância padrão na respectiva concentração. A mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. Sendo, possível visualizar a capacidade antioxidante das amostras, por uma reação colorimétrica. A coloração inicial da solução de DPPH é violeta e caso ocorra a captação dos radicais livres através do composto analisado, esta solução apresenta coloração amarela (Figura 6). No entanto, para confirmar a atividade, após o período pré-estabelecido de incubação, a absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS – PG instruments Ltda).

Foram realizados experimentos em duplicata em que o número de experimentos independentes encontra-se na tabela de resultados.

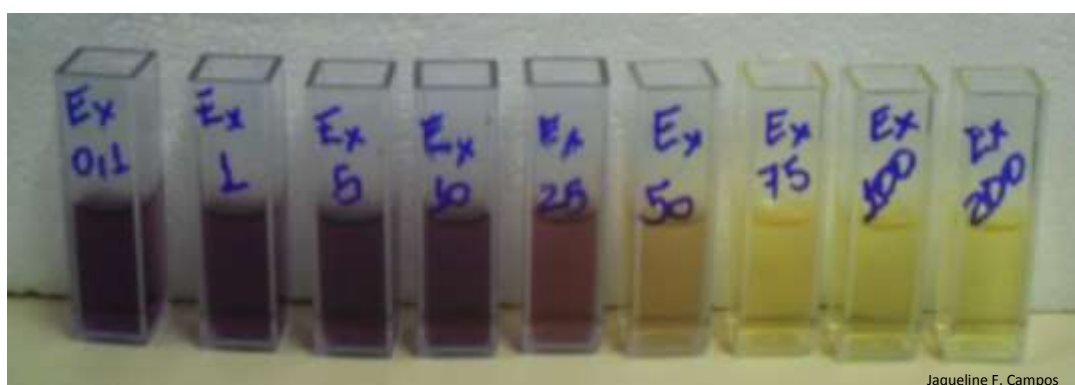


Figura 6. Descoloração do radical livre DPPH através da atividade antioxidante de amostra de própolis.

3.5.2. Proteção da hemólise de eritrócitos induzida por cloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH)

Eritrócitos têm sido usados como modelo funcional *in vitro* para investigar os danos provocados em suas membranas, pois estas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, e apresentam alta vulnerabilidade à peroxidação lipídica. Neste estudo, o extrato da espécie *Melipona orbignyi*, por apresentar melhor atividade antioxidante no método de captura do radical livre DPPH, foi escolhido para ser avaliado quanto a sua capacidade em proteger os eritrócitos dos danos provocados por radicais livres à membrana do mesmo. Para esta análise foi utilizado o indutor de hemólise cloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), que a 37°C (temperatura corporal), gera radicais livres do tipo peroxil, que podem atacar a membrana dos eritrócitos e induzir a peroxidação lipídica, levando à hemólise.

A proteção anti-hemólise do extrato foi determinada espectrofotometricamente, de acordo com um método descrito por Valente e cols. (2011), com pequenas modificações. Inicialmente, para obtenção de eritrócitos humanos, foram coletados 5 ml de sangue periférico um doador saudável por meio de punção venosa, e adicionados em tubos contendo citrato de sódio como substância anticoagulante. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o plasma sanguíneo e a camada celular superior, rica em leucócitos, foram descartados, sendo preservada apenas a camada inferior, constituída por eritrócitos.

Em seguida, os eritrócitos foram lavados três vezes, com a adição de aproximadamente 4 ml de solução salina, sendo centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. Após as lavagens, foi preparada suspensão de eritrócitos a 10%,

através do acréscimo de 1100 µl de papa de eritrócito em 9900 µl de solução salina. Esta suspensão foi preparada duas vezes mais concentrada, já que durante os experimentos foi diluída duas vezes, objetivando uma concentração final de 2,5%.

O extrato de própolis foi inicialmente solubilizado em solução salina para obter uma solução estoque de 50 mg/ml e posteriormente diluídos, para se obter as concentrações iniciais de 200, 300, 400 e 500 µg/ml do extrato, pois, da mesma forma que a suspensão de eritrócitos, era diluído duas vezes em igual volume, resultando em concentrações finais de 50, 75, 100 e 125 µg/ml.

O mesmo procedimento foi realizado com o antioxidante padrão, ácido ascórbico. Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos (eritrócitos em solução salina e eritrócitos em etanol 80% diluído em solução salina, a fim de obter a mesma concentração final deste solvente presente no extrato, ou seja, 1%), bem como controles dos extratos (suspensão de eritrócitos em solução salina diluídos em cada concentração dos extratos). Como referência de hemólise total, foi adicionada água destilada aos eritrócitos.

A substância utilizada para indução a peroxidação lipídica dos eritrócitos foi o AAPH, a qual foi preparada uma suspensão inicial de 100 mM (0,406 g de AAPH diluído em 15 ml de solução salina), já que durante a reação este se dilui em solução de igual volume, obtendo concentração final de 50 mM.

Como demonstrado na tabela 1, os tubos foram identificados de acordo com as substâncias adicionadas nos mesmos, sendo realizado em duplicata. Na primeira etapa, foram adicionadas alíquotas de 250 µl de eritrócitos 10% com 250 µl dos devidos tratamentos, e eritrócitos controle não tratados,

receberam 250 µl de solução salina, assim como o tubo que posteriormente recebeu AAPH, também como controle. Estes foram pré-incubadas a 37°C em banho maria, durante 30 minutos.

Após este período, adicionou-se 500 µl de solução de AAPH. E nos tubos que não receberam tal solução, foram pipetados 500 µl de solução salina ou água destilada, para obter o controle de hemólise total. Esta mistura de reação foi incubada a 37°C durante 4 horas.

A cada hora retiravam-se alíquotas de 200 µl de cada tubo, que eram diluídas em 1800 µl de solução salina. Estes tubos foram levados a centrifugação a 3600 rpm, por 10 minutos, para separar os eritrócitos preservados. Em seguida, o sobrenadante era removido, e depositado em cubetas para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Concomitantemente, a cada hora eram retiradas alíquotas de 40 µl dos tubos controles e a maior concentração (125 µg/ml) de todos os tratamentos, com ou sem AAPH, depositadas em lâminas e cobertas com lamínulas. Foram visualizadas as características morfológicas dos eritrócitos dos diferentes tratamentos, com o auxílio de um microscópio óptico usando aumento de 40 X (Motic BA 200) e realizado a captura foto digital (Moticam 2300) acoplada ao microscópio.

Tabela 1. Preparo dos tubos para realizar o teste de indução de hemólise por AAPH

Identificação dos tubos	1ª Etapa (37°C, 30 min)	2ª Etapa (37°C, 4 horas)
Eritrócitos 2,5%	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl solução salina	500 µl solução salina
Eritrócitos + EtOH 1%	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl EtOH 80%	500 µl solução salina
Eritrócitos + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl solução salina	500 µl AAPH
Eritrócitos + Vit. C 50 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 50 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Vit. C 75 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 75 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Vit. C 100 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 100 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Vit. C 125 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 125 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Ext. 50 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 50 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Ext. 75 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 75 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Ext. 100 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 100 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Ext. 125 µg/ml + AAPH	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 125 µg/ml	500 µl AAPH
Eritrócitos + Vit. C 50 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 50 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Vit. C 75 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 75 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Vit. C 100 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 100 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Vit. C 125 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Vit. C 125 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Ext. 50 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 50 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Ext. 75 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 75 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Ext. 100 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 100 µg/ml	500 µl solução salina
Eritrócitos + Ext. 125 µg/ml	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl Ext. 125 µg/ml	500 µl solução salina
Hemólise total	250 µl eritrócitos 10% + 250 µl água destilada	500 µl água destilada

3.6. Cálculos e Análises estatísticas

Para determinar o valor de efetividade de atividade antimicrobiana dos extratos de própolis em relação aos controles, foi realizado o seguinte cálculo: Fator de efetividade (%) = (amostra/controlado) x 100, no qual é representado pela razão entre o valor do halo de inibição promovido pelo extrato em relação ao halo do controle padrão, multiplicado por 100, para obtenção dos valores em porcentagem.

Quanto à determinação da porcentagem de atividade antioxidante foi utilizada a seguinte equação: Inibição do radical livre DPPH (%) = (1 - Abs amostra/Abs controle) x 100, no qual Abs amostra é a absorbância da solução onde a amostra de extrato foi adicionada à solução de DPPH e Abs controle é a absorbância da solução de DPPH. Os dados obtidos neste ensaio foram analisados e os valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da atividade do DPPH), foram calculados através de análise de regressão não linear após determinação da curva de atividade antioxidante. A partir dos valores obtidos, foi calculado o fator relativo, o qual é a razão entre o valor do IC₅₀ da amostra analisada e do IC₅₀ do seu controle.

A porcentagem de hemólise foi determinada através da mensuração da absorbância do sobrenadante (A) e comparada com a de hemólise total (B), utilizando a fórmula: A/B x 100. Foram realizados três experimentos em duplicata independentes.

As análises estatísticas foram realizadas no Programa GraphPad Prism versão 3.02 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os valores foram representados como as médias dos valores obtidos ± erro padrão da média (E.P.M). Para análise e comparação dos dados, foi utilizado o teste *t* de

Student, para amostras não pareadas. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Extratos obtidos

Após o preparo dos extratos etanólicos das amostras de própolis, estes apresentaram diferentes colorações, sendo que o EEP de *Plebeia catamarcensis* exibiu coloração amarelo claro, o de *Tetragonisca angustula fiebrigi* caramelo, e o extrato de *Melipona orbignyi* marrom escuro (Figura 7), sendo um indicativo de que os referidos extratos apresentam compostos distintos.

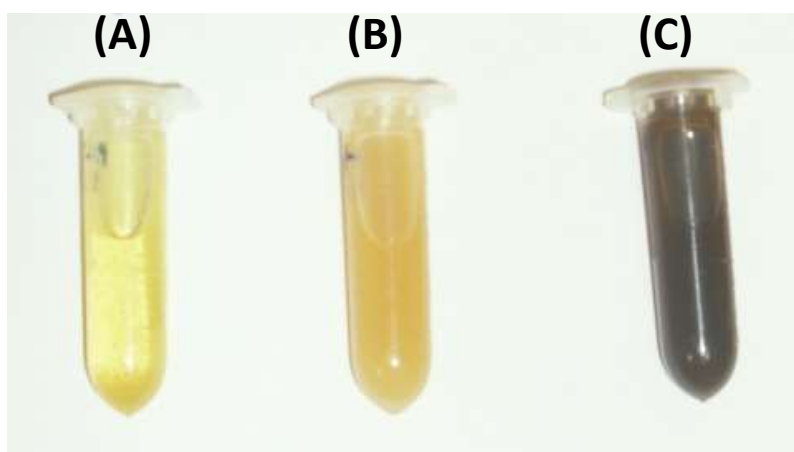


Figura 7. Coloração dos extratos de (A) *Plebeia catamarcensis*, (B) *Tetragonisca angustula fiebrigi* e (C) *Melipona orbignyi*.

4.2. Atividade antimicrobiana

4.2.1. Método de difusão em Ágar

Para avaliarmos qualitativamente a atividade antimicrobiana das amostras, o solvente etanol 80% foi utilizado como controle negativo, o qual não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados (Tabela 2 e 3). O antifúngico cetoconazol usado como controle positivo frente à

Candida albicans mostrou halo de inibição de $19 \pm 0,6$ mm (Tabela 2), e o antibacteriano tetraciclina apresentou halo de $35 \pm 2,8$ mm contra *Staphylococcus aureus* e $34 \pm 0,3$ mm frente à *Escherichia coli*(Tabela 3). Tais resultados demonstram a efetividade da técnica.

O extrato de própolis da espécie *Plebeia catamarcensis* demonstrou halo de inibição de $11 \pm 0,6$ mm frente ao fungo *C. albicans*, o qual obteve atividade antifúngica de 58% em relação ao padrão cetoconazol (Tabela 2). Em relação às bactérias testadas, apresentou halo de inibição de $18 \pm 1,6$ mm contra a cepa gram-positiva *S. aureus*, com 51% de atividade, quando comparado ao controle (Tabela 3).

O EEP de *Tetragonisca angustula fiebrigi* inibiu o crescimento do fungo *C. albicans* (Tabela 2) e da bactéria gram-positiva *S. aureus*(Tabela 3), com halos de $12 \pm 1,6$ e $21 \pm 2,4$ mm respectivamente, e obtiveram ação antimicrobiana de 63 e 60%, quando comparados aos controles.

Quanto ao extrato de própolis de *Melipona orbignyi*, este demonstrou halo de $23 \pm 1,6$ mm de inibição frente à *C. albicans* (Tabela 2), apresentando ação inibitória de 121%, a qual se mostrou mais efetiva do que o antifúngico comercial, cetoconazol, nas concentrações avaliadas. Também inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus*, com halo de $25 \pm 0,3$ mm, e 71% de ação inibitória (Tabela 3), quando comparado à tetraciclina. Nenhum dos extratos avaliados foi ativo contra a cepa bacteriana gram-negativa *E. coli* avaliada (Tabela 3).

Tabela 2. Medida do halo de inibição dos diferentes extratos da própolis (200 mg/ml) e controle cetoconazol (4 mg/ml) frente à levedura *Candida albicans*.

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>F_{.efetividade}</i> (%)
Cetoconazol	19 ± 0,6	100
Etanol 80 %	0	0
EEP <i>P. catamarcensis</i>	11 ± 0,6	58
EEP <i>T. a. fiebrigi</i>	12 ± 1,6	63
EEP <i>M. orbignyi</i>	23 ± 1,6	121

F_{efetividade} em % é a razão entre os valores de inibição de cada amostra analisada em relação ao cetoconazol, multiplicado por 100.

Tabela 3. Medida do halo de inibição dos diferentes extratos da própolis (200 mg/ml) e controle tetraciclina (4 mg/ml) frente às bactérias gram-positiva *Staphylococcus aureus* e gram-negativa *Escherichia coli*.

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>F_{.efetividade}</i> (%)	<i>E. coli</i>	<i>F_{.efetividade}</i> (%)
Tetraciclina	35 ± 2,8	100	34 ± 0,3	100
Etanol 80 %	0	0	0	0
EEP <i>P. catamarcensis</i>	18 ± 1,6	51	0	0
EEP <i>T. a. fiebrigi</i>	21 ± 2,4	60	0	0
EEP <i>M. orbignyi</i>	25 ± 0,3	71	0	0

F_{efetividade} em % é a razão entre os valores de inibição de cada amostra analisada em relação à tetraciclina, multiplicado por 100.

4.2.2. Concentração Inibitória Mínima – CIM

Nesta técnica, o EEP da abelha *Plebeia catamarcensis* é capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* na concentração mínima de $\geq 6,25$ mg/ml, e inibir o crescimento de *S. aureus* com $\geq 3,125$ mg/ml de extrato (Tabelas 4 e 7).

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEP de *Plebeia catamarcensis*, frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentrações testadas (mg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,25	-	-
3,125	+	-
1,56	+	+
0,78	+	+

O sinal (+) indica o crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente;
O sinal(-) indica a inibição do crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente.

Já o EEP de *Tetragonisca angustula fiebrigi* inibiu o crescimento tanto de *C. albicans* quanto de *S. aureus* na concentração mínima de $\geq 0,78$ mg/ml (Tabelas 5 e 7).

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEP de *Tetragonisca angustula fiebrigi*, frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentrações testadas (mg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,25	-	-
3,125	-	-
1,56	-	-
0,78	-	-
0,39	+	+
0,195	+	+
0,09	+	+
0,045	+	+

O sinal (+) indica o crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente;
O sinal(-) indica a inibição do crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente.

Em relação à própolis de *Melipona orbignyi*, a menor concentração capaz de inibir o crescimento de ambos os microrganismos foi $\geq 3,125$ mg/ml (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6.Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEP de *Melipona orbignyi*, frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentrações testadas (mg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,25	-	-
3,125	-	-
1,56	+	+
0,78	+	+

O sinal (+) indica o crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente;
O sinal (-) indica a inibição do crescimento dos microrganismos testados na concentração correspondente.

Tabela7.Quadro resumo das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da própolis de *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

EEP	CIM (mg/ml)	
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. catamarcensis</i>	≥ 6,25	≥ 3,125
<i>T. a. fiebrigi</i>	≥ 0,78	≥ 0,78
<i>M. orbignyi</i>	≥ 3,125	≥ 3,125

4.3. Atividade Antioxidante

4.3.1 Atividade de captação do radical livre DPPH – Própolis

Um dos métodos para avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos da própolis, das três espécies de abelha estudadas, foi a partir da capacidade destes em capturar o radical livre DPPH, presente em solução etanólica.

Inicialmente, foram realizadas avaliações preliminares com diversas concentrações de todos os extratos estudados, comparados aos antioxidantes BHT e Vitamina C. A partir destas, o perfil dos extratos de *P. catamarcensis* e *T. a. fiebrigi* nos levou a utilizar o controle BHT, enquanto que o extrato de *M. orbignyi* a Vitamina C (dados não apresentados).

O antioxidante padrão BHT, apresentou IC₅₀ de 26,3 ± 11,4 µg/ml (Figuras 8A e 9 A e Tabela 8), com inibição máxima de 91,6 ± 3,0 %, na concentração de 200 µg/ml (Figuras 8 B e 9 B e Tabela 8). O EEP de *P. catamarcensis* apresentou IC₅₀ de 1273 ± 684 µg/ml, sendo uma concentração 48,4 vezes maior comparada ao IC₅₀ do BHT (Figura 8 A e Tabela 8). Apresentou inibição máxima de 36,3 ± 5,4 % do radical livre DPPH na concentração de 2000 µg/ml (Figura 8B e Tabela 8).

O EEP de *T. a. fiebrigi* apresentou IC₅₀ de 1482 ± 330 µg/ml, sendo uma concentração 56,3 vezes maior comparada ao IC₅₀ do antioxidante padrão BHT (Figura 9 A e Tabela 8). Tal extrato obteve inibição máxima de 62,6 ± 3,2 % do radical livre DPPH na concentração de 2000 µg/ml (Figura 9 B e Tabela 8).

O antioxidante padrão vitamina C apresentou IC₅₀ de 2,7 ± 0,4 µg/ml (Figura 10 A e Tabela 8), com inibição máxima de 97,7 ± 0,4 % do radical livre

DPPH, na concentração de 10 µg/ml (Figura 10 B e Tabela 8). O EEP de *M. orbigny*, demonstrou IC₅₀ de 40,0 ± 4,8 µg/ml, sendo uma concentração 14,8 vezes maior comparada ao IC₅₀ do antioxidante padrão utilizado (Figura 10 A e Tabela 8). O referido extrato apresentou inibição máxima de 96,4 ± 0,6 % do radical livre DPPH na concentração de 100 µg/ml (Figura 10 B e Tabela 8).

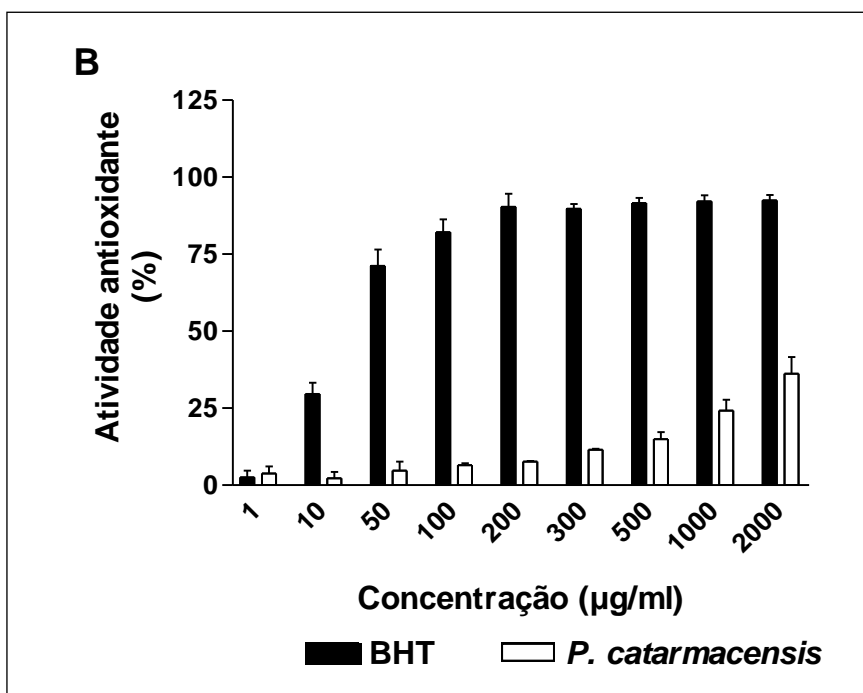
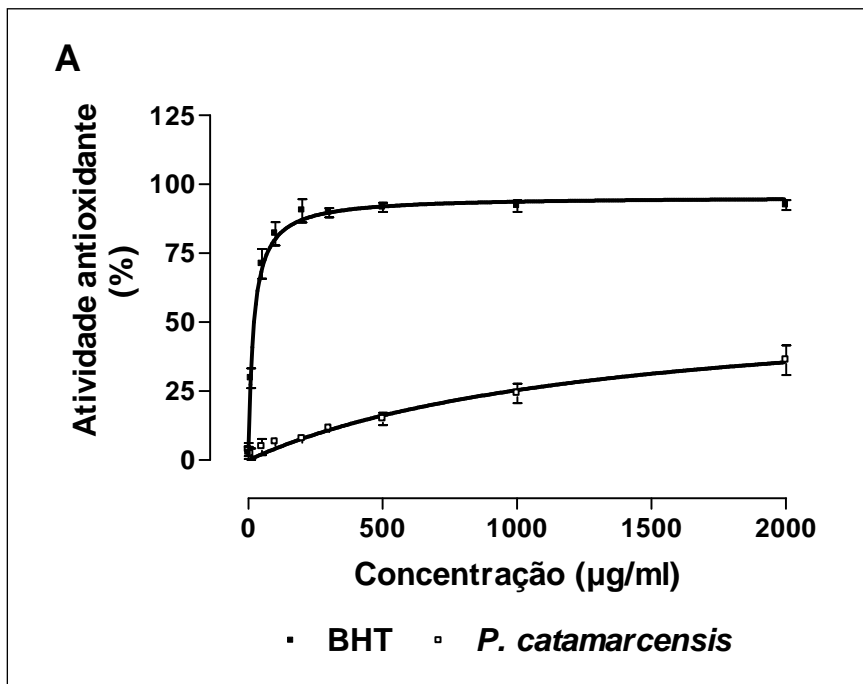


Figura 8. Atividade de captação de DPPH. Efeito de diferentes concentrações do extrato da própolis de *P. catamarcensis* e do antioxidante padrão BHT na captação do radical livre DPPH. (A) Curva de atividade antioxidante para análise do IC₅₀, (B) Curva de porcentagem de atividade antioxidante. Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média), n = 2 - 5.

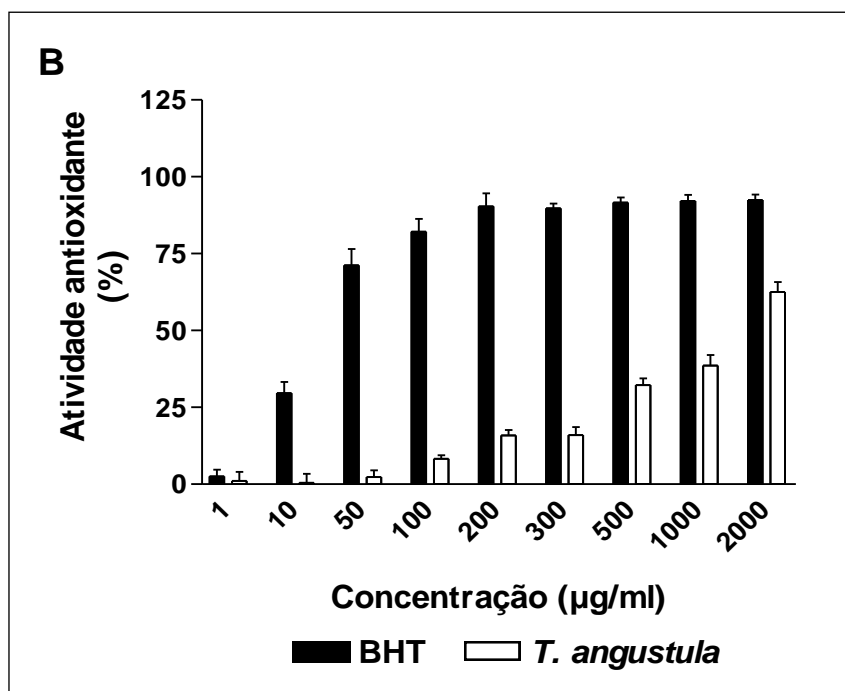
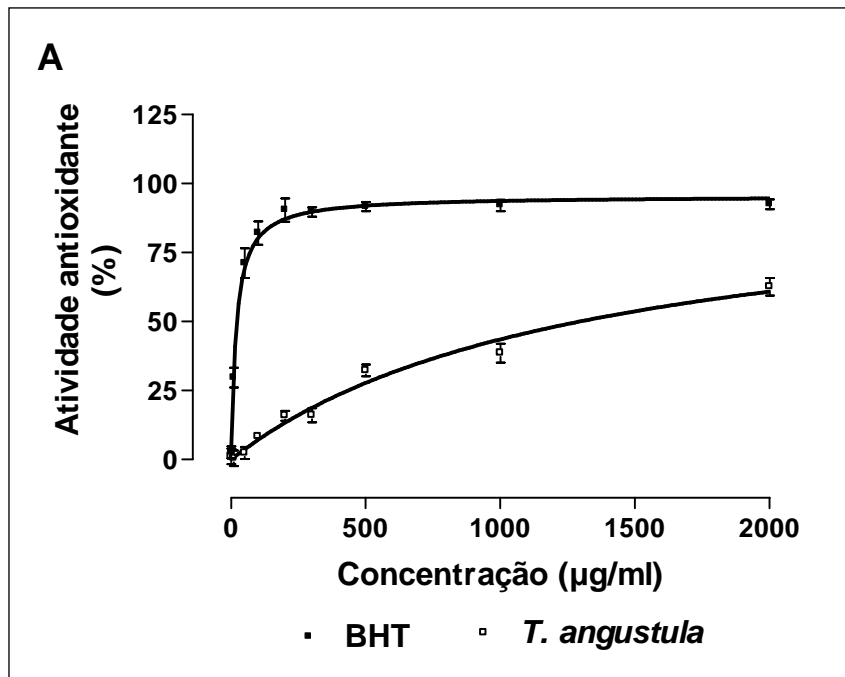


Figura 9. Atividade de captação de DPPH. Efeito de diferentes concentrações do extrato da própolis de *T. a. fiebrigi* e do antioxidante padrão BHT na captação do radical livre DPPH. (A) Curva de atividade antioxidante para análise do IC₅₀, (B) Curva de porcentagem de atividade antioxidante. Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média), n = 3-5.

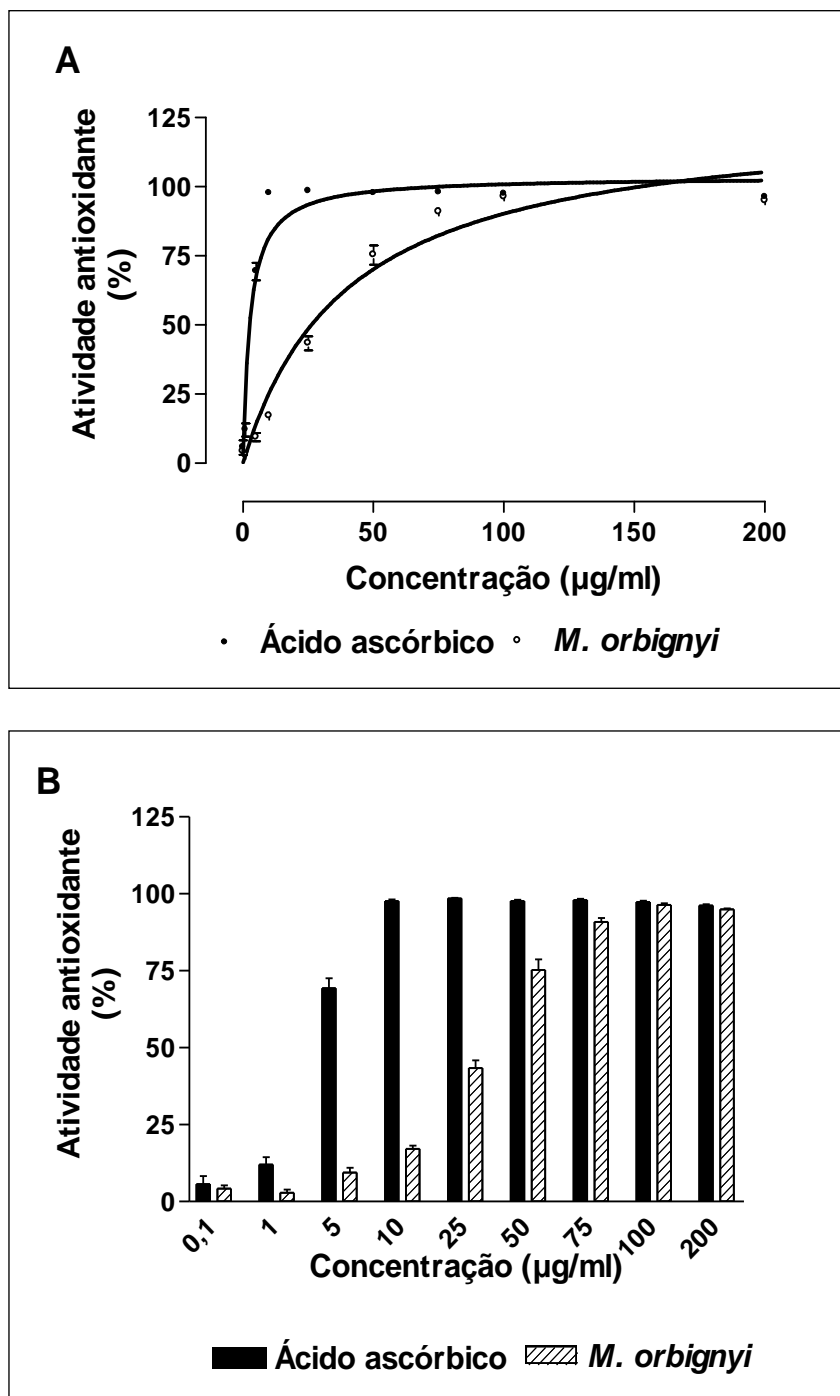


Figura 10. Atividade de captação de DPPH. Efeito de diferentes concentrações do extrato da própolis de *M. orbigny* e do antioxidante padrão ácido ascórbico na captação do radical livre DPPH. (A) Curva de atividade antioxidante para análise do IC₅₀, (B) Curva de porcentagem de atividade antioxidante. Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média), n = 3-4.

Tabela 8. IC₅₀ dos extratos etanólicos da própolis, comparados aos antioxidantes padrões, BHT e ácido ascórbico, juntamente com o percentual de atividade máxima de captação do radical livre DPPH, na sua respectiva concentração.

Tratamentos	IC ₅₀ (µg / ml)	F. relativo	n	Atividade máxima	
				%	µg / ml
BHT	26,3 ± 11,4	-----	5	91,6 ± 3,0	200
<i>P. catamarcensis</i>	1273 ± 684	48,4	2	36,3 ± 5,4	2000
<i>T. a. fiebrigi</i>	1482 ± 330	56,3	3	62,6 ± 3,2	2000
Ácido ascórbico	2,7 ± 0,4	-----	4	97,7 ± 0,4	10
<i>M. orbignyi</i>	40,0 ± 4,8	14,8	3	96,4 ± 0,6	100

Fator relativo é a razão entre o valor do IC₅₀ da amostra analisada e do IC₅₀ do seu controle

4.4. Proteção contra hemólise de eritrócitos induzida por AAPH

Para esta análise foi escolhida a própolis da espécie *Melipona orbignyi* por apresentar melhor atividade antioxidante na avaliação da captação do radical livre DPPH. Nesta técnica, os eritrócitos foram incubados com o agente oxidante AAPH, e a capacidade protetora do extrato contra hemólise foi avaliada tanto dose quanto tempo dependente. A atividade anti-hemolítica foi avaliada a cada 60 minutos, durante um período de 240 minutos nas concentrações de 50, 75, 100 e 125 µg/ml.

Na Figura 11 no tempo de 60 (A), 120 (B), 180 (C) e 240 minutos (D) pode ser observado que o extrato não promoveu hemólise significativa quando comparada a seus respectivos controles em nenhum tempo ou concentração avaliada. O que também pode ser observado nas Figuras 13 E e F - 16 E e F que demonstram a integridade celular, além de grande quantidade de eritrócitos.

Aos 60 minutos de incubação com o agente oxidante AAPH, o ácido ascórbico apresentou atividade anti-hemolítica em todas as concentrações avaliadas (Figura 12 A), que também pode ser um indicativo quanto à preservação da integridade dos eritrócitos na concentração de 125 µg/ml (Figura 13 G). Para o extrato, foi possível observar atividade anti-hemolítica apenas na concentração de 125 µg/ml (Figuras 12 A e 13 H), quando comparada aos eritrócitos incubados com o AAPH (Figuras 12 A e 13 D).

Após 120 minutos de incubação com o agente oxidante AAPH, o ácido ascórbico apresentou atividade anti-hemolítica em todas as concentrações avaliadas (Figura 12 B), também foi possível observar um indicativo da integridade dos eritrócitos na concentração de 125 µg/ml (Figura 14 G). Nestas condições, o extrato apresentou atividade protetora em todas as concentrações avaliadas (Figura 12 B), também representado pelo efeito protetor na concentração de 125 µg/ml (Figura 14 H), quando comparada aos eritrócitos incubados com o AAPH (Figuras 12 B e 14 D).

Aos 180 (Figura 12 C) e 240 (Figura 12 D) minutos, foi possível observar que apenas o ácido ascórbico apresentou atividade anti-hemolítica com perfil dose dependente. Atividade que também foi observada pela aparente integridade dos eritrócitos na concentração de 125 µg/ml do referido controle (Figuras 15 E e 16 E). Entretanto, o extrato nestas condições não foi capaz de proteger os eritrócitos contra a hemólise provocada pelo AAPH aos 180 (Figura 12 C) e 240 (Figura 12 D) minutos de incubação, também representado pelo número reduzido de eritrócitos na concentração de 125 µg/ml (Figuras 15 H e 16 H) de extrato.

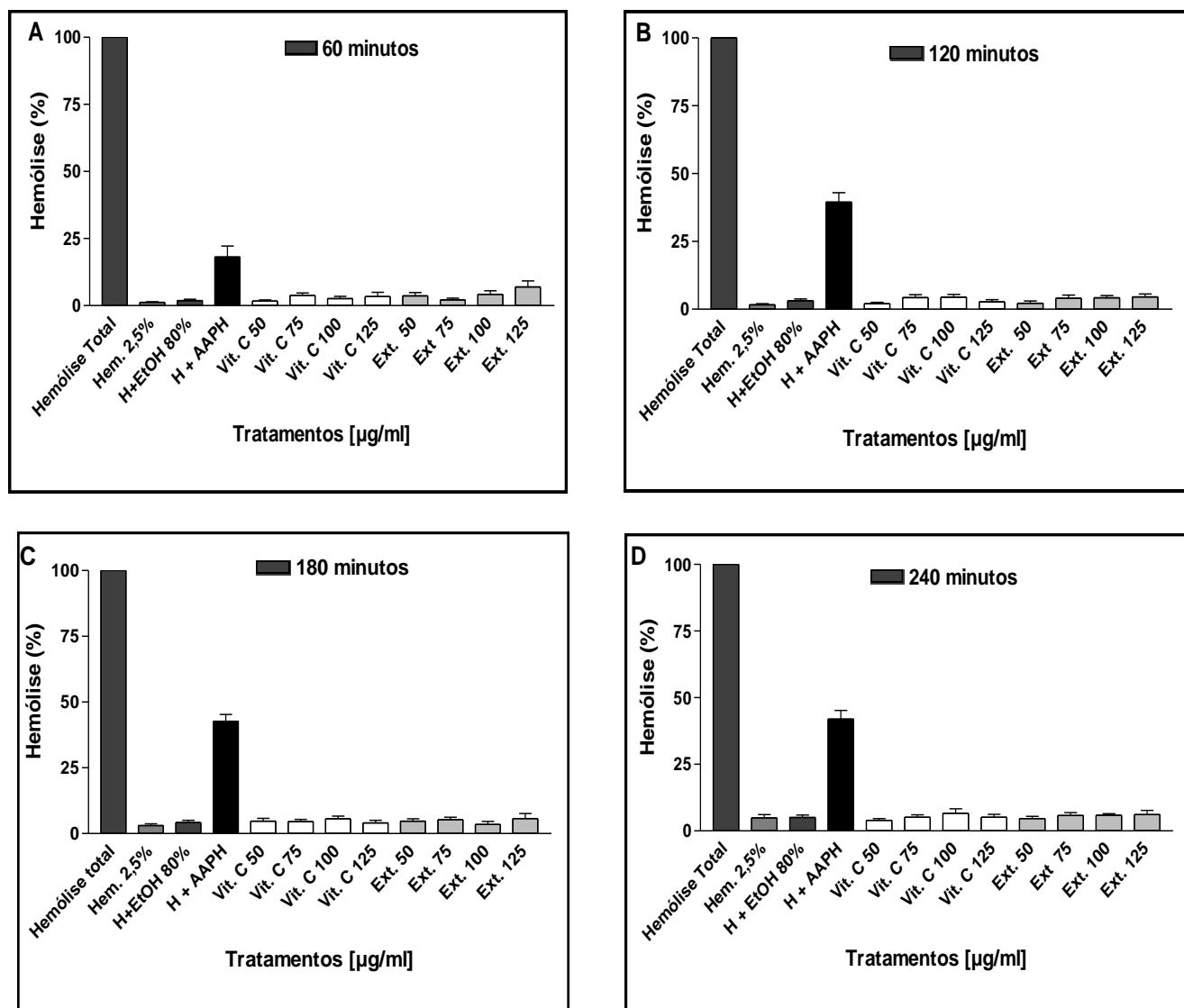


Figura 11. Efeito das diferentes concentrações do extrato de própolis de *M. orbignyi*, comparado ao antioxidante padrão, ácido ascórbico (vitamina C), sobre eritrócitos sem adição de AAPH. (A) Eritrócitos incubados por 60 min, (B) 120 min, (C) 180 min e (D) 240 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), $n = 4$.

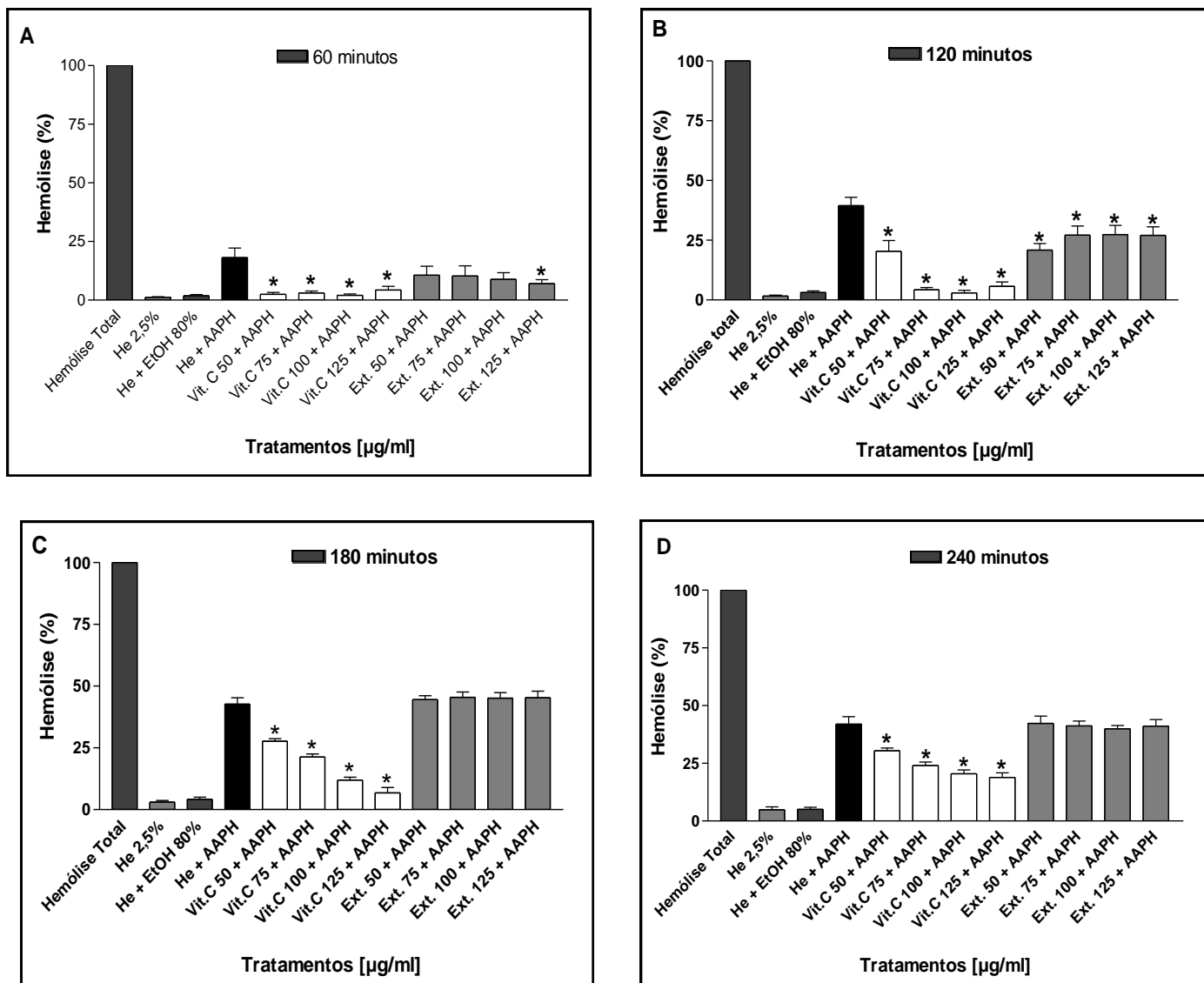


Figura 12. Efeito protetor de diferentes concentrações do extrato de própolis de *M. orbigny*, comparado ao antioxidante padrão, ácido ascórbico (vitamina C), sobre eritrócitos estimulados com AAPH. (A) Eritrócitos incubados por 60 min, (B) 120 min, (C) 180 min e (D) 240 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), n = 4.

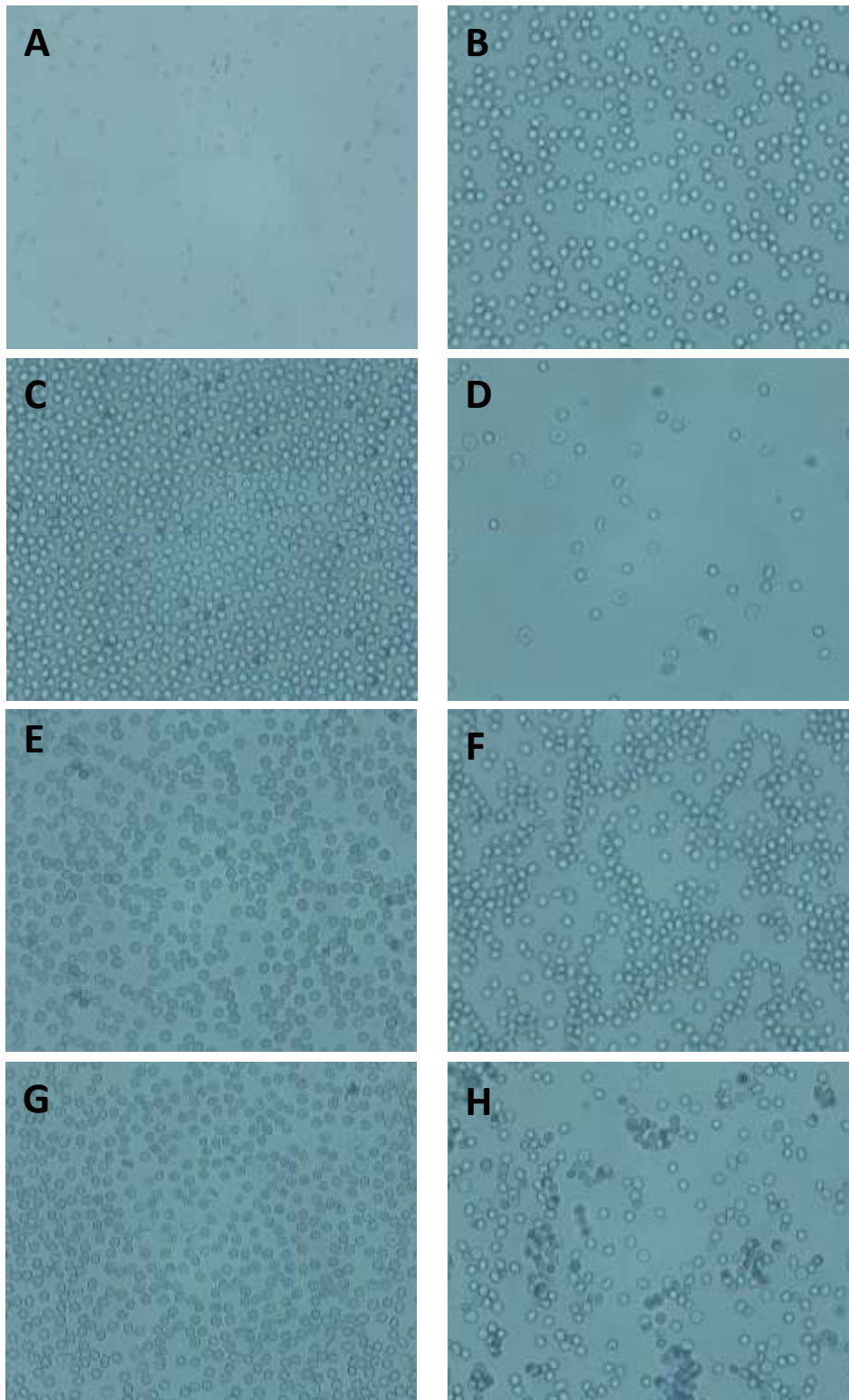


Figura 13. Representação dos eritrócitos após 60 minutos de incubação. (A) Hemólise total; (B) Eritrócitos sem tratamento; (C) Veículo - EtOH; (D) Eritrócitos com o indutor de hemólise - AAPH (50mM); (E) Eritrócitos tratadas com ácido ascórbico 125 µg/ml; (F) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml; (G) Eritrócitos tratados com ácido ascórbico 125 µg/ml acrescido de AAPH; (H) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml acrescida de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

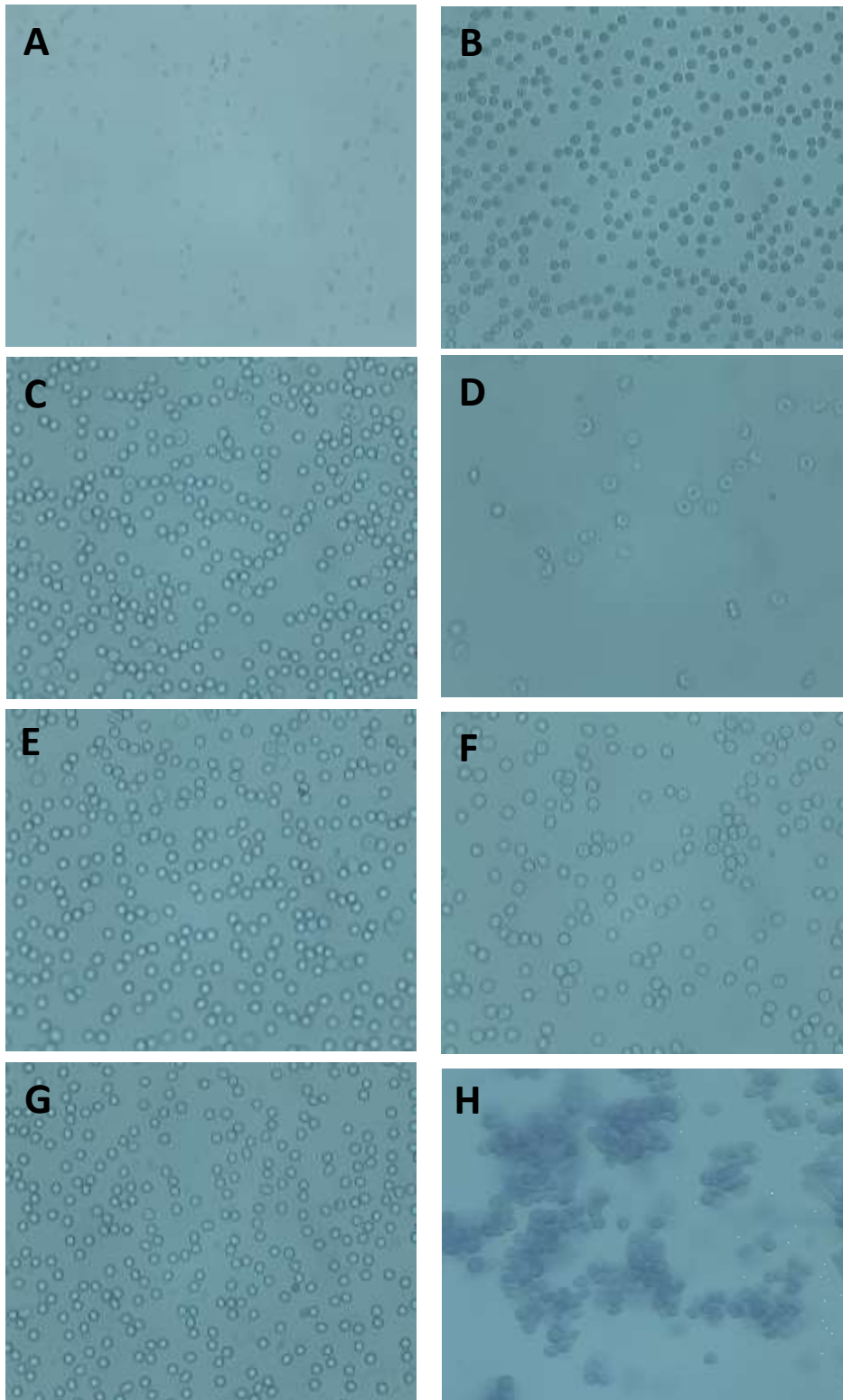


Figura 14.Representação dos eritrócitos após 120 minutos de incubação. (A) Hemólise total; (B) Eritrócitos sem tratamento; (C) Veículo - EtOH; (D) Eritrócitos com o indutor de hemólise – AAPH (50mM); (E) Eritrócitos tratadas com ácido ascórbico 125 µg/ml; (F) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml; (G) Eritrócitos tratados com ácido ascórbico 125 µg/ml acrescido de AAPH; (H) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml acrescida de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

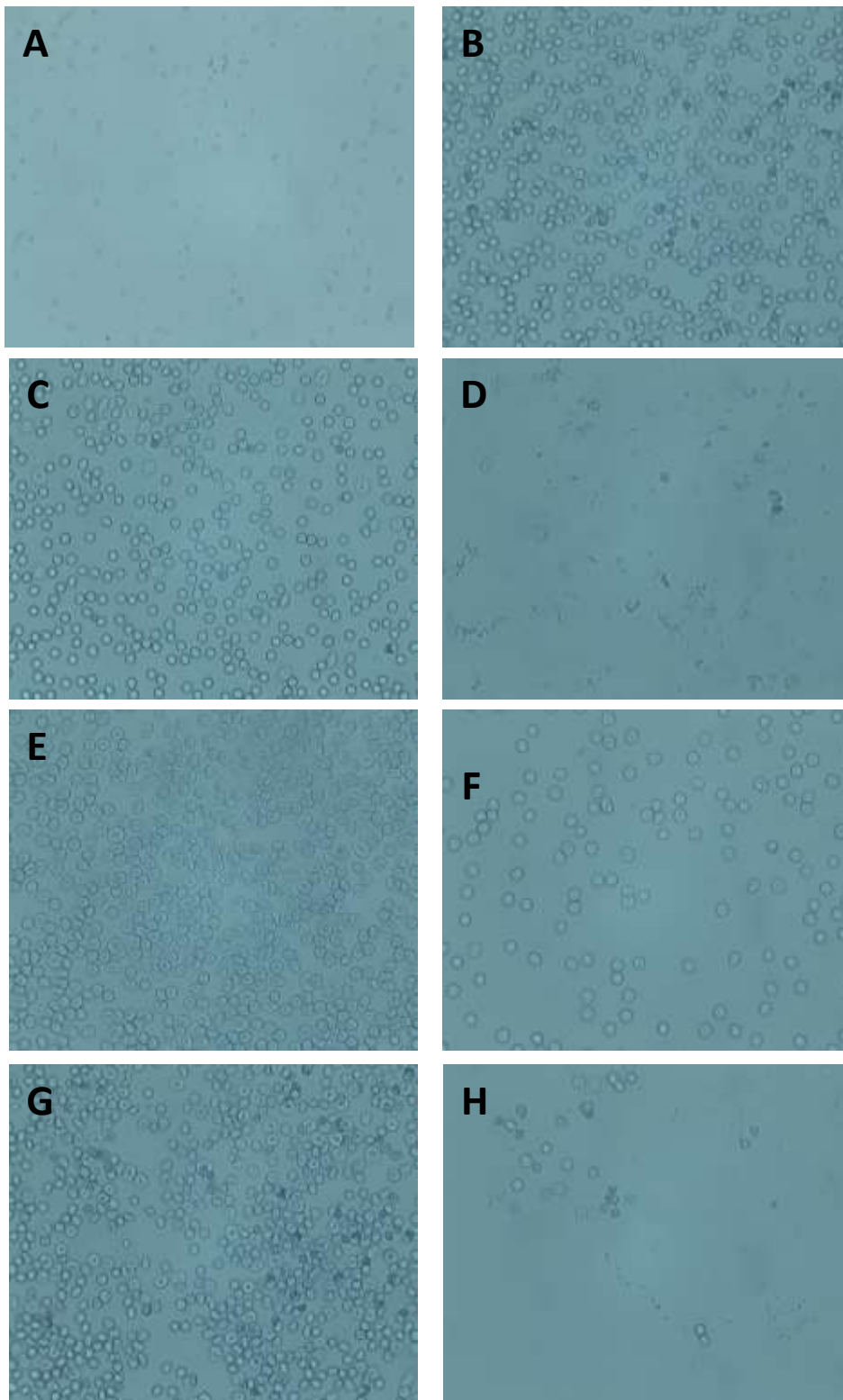


Figura 15. Representação dos eritrócitos após 180 minutos de incubação. (A) Hemólise total; (B) Eritrócitos sem tratamento; (C) Veículo - EtOH; (D) Eritrócitos com o indutor de hemólise – AAPH (50mM); (E) Eritrócitos tratadas com ácido ascórbico 125 µg/ml; (F) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml; (G) Eritrócitos tratados com ácido ascórbico 125 µg/ml acrescido de AAPH; (H) Eritrócitos tratados com EEP 125 µg/ml acrescida de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

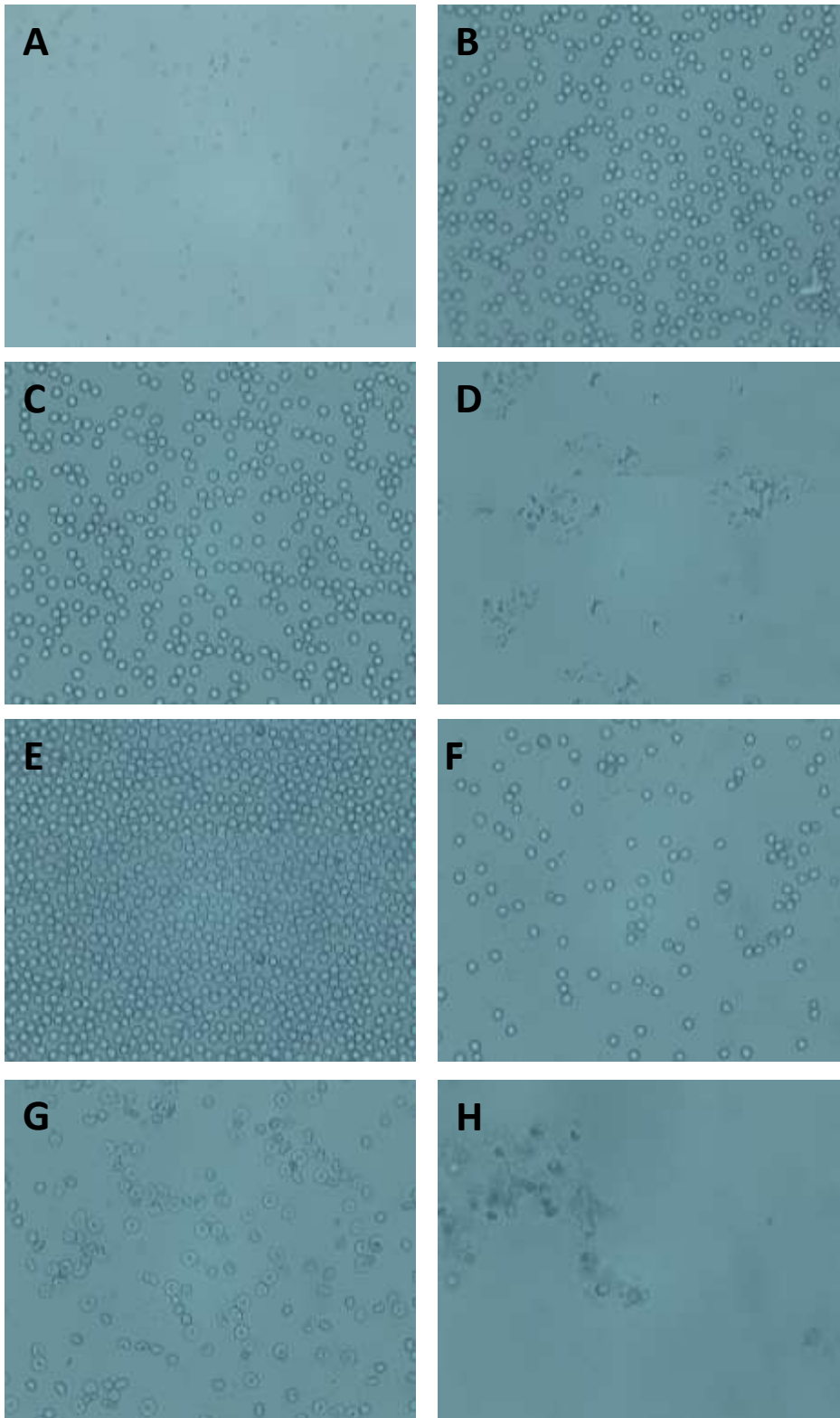


Figura 16. Representação dos eritrócitos após 240 minutos de incubação. (A) Hemólise total; (B) Eritrócitos sem tratamento; (C) Veículo - EtOH; (D) Eritrócitos com o indutor de hemólise – AAPH (50mM); (E) Eritrócitos tratadas com ácido ascórbico 125 $\mu\text{g/ml}$; (F) Eritrócitos tratados com EEP 125 $\mu\text{g/ml}$; (G) Eritrócitos tratados com ácido ascórbico 125 $\mu\text{g/ml}$ acrescido de AAPH; (H) Eritrócitos tratados com EEP 125 $\mu\text{g/ml}$ acrescida de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

5. Discussão

Nas últimas décadas houve um crescente interesse científico pela descoberta de produtos naturais que possam ser utilizados em prol da saúde humana. Vários produtos naturais vêm se destacando de forma promissora para o desenvolvimento de novas drogas com propriedades terapêuticas e biotecnológicas. Dentre estes, destacamos a própolis, produzida por diferentes espécies de abelhas e que vem demonstrando propriedades biológicas e farmacológicas tais como: imunomodulatória, antitumoral, antiinflamatório, antiviral, antiparasitário, antibacteriano, antifúngico e antioxidante (Sforcin e cols., 2000; Sforcin e cols., 2001; Gekker e cols., 2005; Orsi e cols., 2005; Orsi e cols., 2006a; Orsi e cols., 2006b; Freitas e cols., 2006; Búfalo e cols., 2009a; Búfalo e cols., 2009b).

Nas avaliações antimicrobianas da própolis das abelhas sem ferrão *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi*, encontradas no estado do Mato Grosso do Sul, foi possível observar que todas as espécies estudadas demonstram atividade antimicrobiana promovendo a inibição do fungo *Candida albicans* e da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Entretanto, a própolis de nenhuma das espécies avaliadas foi capaz de inibir o crescimento da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram observados para extratos da própolis de *Apis mellifera* e espécies de meliponíneos, tais como *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragonisca angustula* (Kujumgiev e cols., 1999; Lu e cols., 2003; Miorim e cols., 2003; Rahman e cols., 2010).

Os flavonóides e os ésteres fenólicos, principalmente os éster fenetil do ácido caféico e ferulatos, são descritos como responsáveis pelas atividades antibacterianas e antifúngicas da própolis (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Metzner e cols., 1979; Serkedjieva e cols., 1992; Kujumgiev e cols., 1993).

Marcucci (1996) relata que a propriedade antibacteriana da própolis ocorre a partir do sinergismo entre seus compostos, uma vez que estudos mostram que muitos compostos isolados não exibem tal atividade. Contudo, a resistência das bactérias gram-negativas à ação de antibióticos pode ser atribuída à complexidade da parede celular, a qual impede os agentes antibacterianos de atravessarem efetivamente a barreira lipídica presente na parede deste tipo de bactéria (Guimarães e cols., 2010). Os antibióticos eficientes na inibição destas bactérias são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas, e que conseguem atravessar a parede celular através de canais protéicos de porina, envoltos pela estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas (Guimarães e cols., 2010).

A melhor atividade antioxidante das própolis avaliadas foi a da espécie *Melipona orbignyi*, semelhante aos resultados obtidos a partir de amostras da própolis de *Apis mellifera* (Lu e cols., 2003; Mercan e cols., 2006) e de alguns extratos vegetais (Weiler e cols., 2010; Jana e cols., 2011). Duthie e cols. (2003) atribuem esta capacidade antioxidante da própolis principalmente aos seus polifenóis, cuja ação refere-se à doação de átomos de hidrogênio a partir de um grupo hidroxila aromático, o qual é doado ao radical livre e, sua habilidade de estrutura aromática para suportar um elétron não pareado.

A maioria dos compostos fenólicos são flavonóides e derivados fenólicos simples tais como o próprio fenol, além de cresol, timol, resorcinol e orcinol, bem como seus derivados: coumarinas, ácidos hidroxinâmicos, ácidos fenólicos, dentre outros (Bravo, 1998). Os flavonóides representam o grupo mais comum e amplamente distribuído dos compostos fenólicos das plantas, que são a principal fonte para o preparo da própolis pelas abelhas. Estimativas apontam que há na natureza cerca de 10.000 flavonóides conhecidos, dentre eles destacam-se as antocianinas, flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides (Bravo, 1998;Tavares e cols., 2010; Vauzour e cols., 2010).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse pelas atividades biológicas resultantes dos compostos fenólicos, dentre eles destacam-se seu papel como antioxidante e antimutagênicos, além da sua implicação na prevenção de patologias como os diversos cânceres, doenças cardiovasculares e diabetes (Bravo, 1998; Zhu e cols., 2011, Elostá e cols., 2012). Embora a atividade antioxidante correlacione-se com o conteúdo de flavonóides presentes na própolis, é possível que outras substâncias possam estar envolvidas nesta ação(Moreno e cols., 2000).

As diversas espécies de abelhas demonstram preferências intrínsecas por espécies de plantas, destas, os meliponíneos dos gêneros *Scaptotrigona*, *Partamona* e *Melipona* são os mais seletivos. Estas preferências ocorrem principalmente em regiões tropicais, onde há uma grande diversidade de abelhas sem ferrão, e desta forma, alguns deles procuram por plantas particulares (Imperatriz-Fonseca e cols., 2004; Michener, 2007).

Portanto, os diferentes perfis de atividades antimicrobianas e antioxidantes observados a partir dos extratos da própolis das abelhas

estudadas, possivelmente estão ligados ao tropismo destas abelhas por determinadas espécies vegetais, o que pode influenciar diretamente a composição da própolis e suas propriedades biológicas.

Desta forma, futuras análises serão realizadas a partir das amostras de própolis estudadas, para identificar e isolar as substâncias responsáveis pelos efeitos observados, bem como para investigar outras propriedades biológicas das própolis produzidas por estas espécies de abelhas.

6. Conclusões

1. Os extratos de própolis das abelhas sem ferrão *Plebeia catamarcensis*, *Tetragonisca angustula fiebrigi* e *Melipona orbignyi* apresentaram atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans* e a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Não foi observado efeito antimicrobiano contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*.

2. Todas as própolis avaliadas exibiram atividade antioxidante, entretanto, apenas a da abelha *Melipona orbignyi* apresentou atividade antioxidante relevante comparada ao controle utilizado.

3. A própolis de *Melipona orbignyi* não promove indícios de alterações morfológicas, quando incubada com eritrócitos sem o reagente indutor de hemólise e protege os eritrócitos contra hemólise oxidativa nos períodos de 60 e 120 minutos, após incubação com AAPH.

7. Referências

Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.C.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.R.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegakid, M. (2007) Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113 278–283.

Al-Mamary, M.; Al-Meerri, A.; Al-Habori, M. (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041–1047.

Alvarez-Suarez, J.M.; Tulipani, S.; Romandini, S.; Bertoli, E.; Battino, M. (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 3: 15–23.

Alves, C. Q.; David, J.M.; David, J.P.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. (2010) Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*. 33 (10): 2202-2210.

Al-Waili, N.S. (2004) Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *Journal of Medicinal Food*. 7 (2): 210–222.

Anacleto, D.A.; Souza, B.A.; Marchini, L.C.; Moreti, A.C.C. (2009) Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29 (3): 535-541.

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

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

Bankova, V. S. (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 114–117.

Barbedo, L.S.; Sgarbi, D.B.G. (2010) Candidíase.DST - *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 22(1): 22-38.

Brasil. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa 11. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. *Diário Oficial*, 20 de outubro de 2000.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30.

Bravo, L. (1988) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56 (11): 317-333.

Boukraâ, L.; Benbarek, H.; Aissat, S. (2008) Synergistic action of starch and honey against *Pseudomonas aeruginosa* in correlation with diastase number. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 14 (2): 181–184.

Boukraâ, L.; Amara, K. (2008) Synergistic effect of starch on the antibacterial activity of honey. *Journal of Medicinal Food*. 11 (1): 195–198.

Búfalo, M.C.; Barreiro, D.P.; Sartori, D.R.S.; Sforcin, J.M. (2009) Absence of propolis effect on plasma glycaemic control and lipid metabolism in a diabetic rat model. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1: 51–55.

Búfalo, M.C.; Candeias, J.M.G.; Sforcin, J.M. (2009) In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermóide carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 6: 483–487.

Burdock, G. A. (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363.

Camargo, J.M.F.; Pedro, S.R.M. (2008) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region – versão <http://www.moure.cria.org/catalogue>. Acesso em 17/10/2011.

Carvalho, A.A.; Finger, D.; Machado, C.S.; Schmidt, E.M.; Costa, P.M.; Alves, A.P.N.N.; Morais, T.M.F.; Queiroz, M.G.R.; Quinária, S.P.; Rosa, M.R.; Santos, J.M.T.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufu, L.V.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N.; Torres, Y.R. (2011) *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*. 126: 1239–1245.

Castaldo, S.; Capasso, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 1, S1–S6.

Cruvinel, A.R.; Silveira, A.R.; Soares, J.S.; (2011) Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. *Cenarium Farmacêutico*. 4: 4.

Danforth, B.N.; Poinar, Jr. G.O. (2011) Morphology, classification, and antiquity of *Melittosphex burmensis* (Apoidea: Melittosphecidae) and implications for early bee evolution. *Journal of Paleontology*, 85(5): 882–891.

Demera, J.H.; Angert, E.R. (2004) Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie*. 35: 411–417.

Dota, K.F.D.; Consolaro, M.E.L.; Svidzinski, T.I.E.; Bruschi, M.L. (2011) Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 1-8.

Duthie, G.G.; Gardner, P.T.; Kyle, J.A.M. (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*. 62, 599–603.

Dutra, R.P.; Nogueira, A.M.C.; Marques, R.R.O.; Costa, M.C.P.; Ribeiro, M.N.S. (2008) Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(4): 557-562.

Engel, M.S. (2000) A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). *American Museum of Natural History*. 3296, 11.

Elosta, A.; Ghous, T.; Ahmed, N. (2012) Natural Products as Anti-glycation Agents: Possible Therapeutic Potential for Diabetic Complications. *Current Diabetes Reviews*. 17: 8.

Fang, Y.; Yang, S.; Wu, G. (2002) Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872– 879.

Farnesi, A.P.; Aquino-Ferreira, R.; De Jong, D.; Bastos, J.K.; Soares, A.E.E. (2009) Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*. 8 (2): 635-640.

Feás, X.; Estevinho, M.L. (2011) A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* Sp.) Organic Honey. *Journal of Medicinal Food*. 14 (0): 1–5.

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43(1): 61-8.

Franklin, D.; Lowy, M.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*. 339 (8): 520-532.

Freitas, S.F.; Shinohara, L.; Sforcin, J.M.; Guimarães, S. (2006) *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*. 13: 170–175.

Gekker, G.; Hu, S.; Spivak, M.; Lokensgard, J.R.; Peterson, P.K. (2005) Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 158–163.

Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: A review bee world. 60: 59–84.

Giada, M.L.R.; Filho, J.M. (2006) Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Ciências Biológicas e da Saúde*. 12 (4): 7-15.

Grimaldi, D.; Engel, MS. (2005) *Evolution of the insects*. Cambridge University Press. 772 pp.

Grüter, C.; Kärcher, M.H.; Ratnieks, FLW. (2011) The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance. *Neotropical Entomology*. 40 (1): 55-61.

Grüter, C.; Menezes, C.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Ratnieks, F.L.W. (2012) A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. *PNAS*. 109 (4): 1182–1186.

Gupta, D., Gupta, R.K. (2011) Bioprotective properties of Dragon's blood resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11:13.

Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. (2010) Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*. 33 (3): 667-679.

Guo, X.; Chen, B.; Luo, L.; Zhang, X.; Dai, X.; Gong, S. (2011) Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Water Extracts of Chinese Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 12610–12616.

IB-USP – Projeto VINCES/FAPESP - <http://ordenhymenoptera.blogspot.com/2009/12/melipona-bicolor-guaraipo.html>. Acesso em 27-01-2012.

Imperatriz-Fonseca, V.L.; Contrera, F.A.L.; Kleinert, A.M.P. (2004) A meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores. XV Congresso Brasileiro de Apicultura 1º Congresso Brasileiro de Meliponicultura.

Jana, K.; Chatterjee, K.; Ali, K.M.; Ghosh, A.; Bera, T.K.; Ghosh, D. (2011) Antioxidant potential of hydro-methanolic extract of seed of *Caesalpinia bonduc*: An in vitro study. J Adv Pharm Technol Res.2 (4): 260-5.

Júnior, L.R.; Höehr, N.F.; Vellasco, A.P. (2001) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. Química Nova. 24 (1): 112-119.

Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. (2004) Pathogenic *escherichia coli*. Nature Reviews - Microbiology. 2: 123 – 140.

Katircioglu, H.; Mercan, N. (2006) Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. African Journal of Biotechnology. 5 (11): 1151-1153.

Kujumgiev, A; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 64: 235–240.

Koleva, I.I.; A. van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; Groot, A.; Evstatieva, L.N. (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. Phytochemical Analysis. 13: 8-17.

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.S.; Nascimento, F.R.F.; Guerra, R.N.M.; Monteiro-Neto, V. (2011) 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. 11: 108.

Lu, L.; Chen, Y.; Chou, C. (2003) Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis. 11 (4): 277-282.

Manrique, A.J.; Santana, W.C. (2008) Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. Zootecnia Tropical. 26 (2): 157-166.

Marcucci, M.C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 26: 83-99.

Marcucci, M.C. (1996) Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Química Nova. 19, 5.

Marquez-Souza, A.C.; Miranda, I.P.A.; Moura, C.O.; Rabelo, A.; Barbosa, E.M. (2002) Características morfológicas e bioquímicas do pólen coletado por cinco espécies de meliponíneos da Amazônia Central. Acta Amazonica. 32 (2): 217-229.

Mercan, M.; Kivrak, B.; Duru, M.E.; Katircioglu, H.; Gulcan, S.; Malci, S.; Acar, G.; Salih, B. (2006) Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. Annals of Microbiology, 56 (4) 373-378.

Metzner, J., Bekemeier, H., Paintz, M., Schneidewind, E., 1979. Zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Propolis und Propolis inhaltsstoff. Pharmazie 34, 97–102.

Michener, C.D.; Grimaldi, D.A. (1998) The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 6424-6426.

Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 953 p.

Miorin, P.L.; Levy Junior, N.C.; Custodio, A.R.; Bretz, W.A.; Marcucci, M.C. (2003) Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 913–920.

Modro, A.F.H.; Message, D.; da Luz, C.F.P.; Neto, J.A.A.M. (2007) Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesq. agropec. bras.*, 42 (8): 1057-1065.

Molero, G.; Díez-Orejas, R.; Navarro-García, F. Monteoliva, L.; Pla, J.; Gil, C.; Sánchez-Pérez, M.; Nombela, C. (1998) *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiology*. 1:95–106.

Moreno, M.I.N.; Isla, M.I.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M.A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 109–114.

Nates-Parra, G. (2001) Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana*. 2 (3): 233 – 248.

Nogueira-Neto, P. (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis. 445 p.

Oddo, L.P.; Heard, T.A.; Rodriguez-Malaver, A.; Perez, R.A.; Fernandez-Muino, M.; Sancho, M.T.; Sesta, G.; Lusco, L.; Vit. P. (2008) Composition and Antioxidant Activity of *Trigona carbonaria* Honey from Australia. *Journal Of Medicinal Food*. 11 (4): 789–794.

Oliveira, R.C.; Nunes, F.M.F.; Campos, A.P.S.; Vasconcelos, S.M.; Roubik, D.; Goulart, L.R.; Kerr, W.E. (2004) Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. *Genetics and Molecular Biology*. 27 (2): 181-186.

Orsolic, N.; Terzic, S.; Mihaljevic, Z.; Sver, L.; Bassic, I. (2005) Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28 (10): 1928-1933.

Orsi, R.O.; Sforcin, J.M.; Rall, V.L.M.; Funari, S.R.C.; Barbosa, L.; Fernandes Jr., A. (2005) Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins*, 11, pp. 109–116.

Orsi, R.O.; Funari, S.R.C.; Barbattini, R.; Giovani, C.; Frilli, F.; Sforcin, J.M.; Bankova, V. (2006) Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 76: 637–640.

Orsi, R.O.; Sforcin, J.M.; Funari, S.R.C.; Fernandes Jr., A.; Bankova, V. (2006) Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella* Typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 108–112.

Patricio, E.F.L.R.A.; Cruz-López, L.; Maile, R.; Tentschert, J.; Jones, G.R.; Morgan, E.D. (2002) The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. *Journal of Insect Physiology*. 48: 249–254.

Pérez, E.; Rodriguez-Malaver, A.J.; Vit, P. (2006) Antioxidant capacity of Venezuelan honey in wistar rat homogenates. *Journal of Medicinal Food*. 9 (4): 510–516.

Piccinelli, A.L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-Rubio, O.; Fernandez, M.C.; Rastrelli, L. (2011) Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode

array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (12): 6484-91.

Pinho, O. C.; Manente-Balestieri, F. C. De L.; Balestieri, J. B. P. (2010) Respostas de colônias de *Plebeia catamarcensis* Holmberg (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) à orfandade. *Revista Brasileira de Biociências*. 8 (2): 201-207.

Rahman, M.M.; Richardson, A; Sofian-Azirun, M. (2010) Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (16): 1872-1878.

Salatino, A.; Teixeira, E.W.; Negri, G.; Message, D. (2005) Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2(1): 33–38.

Salles, S. <http://meliponariodaserra.blogspot.com/>. Acesso em 27-01-2012.

Serkedjieva, J.; Manolova, N.; Bankova, V. (1992) Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*. 55, 294–297.

Sforcin, J.M.; Fernandes Jr., A.; Lopes, C.A.M.; Bankova, V.; Funari, S.R.C. (2000) Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 73: 243–249.

Sforcin, J.M.; Fernandes Jr., A.; Lopes, C.A.M.; Funari, S.R.C.; Bankova, V. (2001) Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 7: 139–144.

Sgariglia, M.A.; Vattuone¹, M.A., Vattuone, M.M.S.; Soberón, J.R., Sampietro, D.A. (2010) Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. *Apidologie*. 41: 667–675.

Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; Lins, A.C.S.; Agra, M.F.; Silva, E.M.S.; Reis, G.T.; Freitas, B.M. (2009) Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 81(2): 173-178.

Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B. (2002) *Abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte. 253 p.

Simone-Finstrom, M.; Spivak, M. (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 41: 295–311.

Souza, R.C.S.; Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.; Oliveira, F.P.M. (2004) Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta amazonica*. 34 (2): 333 – 336.

Szliszka, E.; Zydowicz, G.; Janoszka, B.; Dobosz, Kowalczyk-Ziomek, G.; Krol, W. (2011) Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*. 38: 941-953.

Tahara, S. (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 71 (6), 1387-1404.

Tavares, L.; Fortalezas, S.; Carrilho, C.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; Ferreira, R.B.; Santos, C.N. (2010) Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research*. 1:3–12.

Teixeira, É.W.; Negri, G.; Meira, R.M.S.A.; Message, D; Salatino, A. (2005) Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2(1): 85–92.

Triplehorn, C.A.; Jonnson, N.F. (2011) Estudo dos insetos, tradução da 7ª edição de Borror and Delong's introduction to the study of insects. São Paulo: Cengage Learning.

Umthong, S.; Phuwapraisirisan, P., Puthong, S.; Chanchao, C. (2011) In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *Complementary and Alternative Medicine*, 11:37.

Valente, M.J.; Baltazar, A.F.; Henrique, R.; Estevinho, L.; Carvalho, M. (2011) 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*. 49: 86–92.

Vauzour, D.; Vafeiadou, K.; Rendeiro, C.; Corona, G.; Spencer, J.P.E. (2010) The inhibitory effects of berry-derived flavonoids against neurodegenerative processes. *J Berry Res*. 1:45–52.

Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 30 (5): 1323-1338.

Velikova, M.; V. Bankova, Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M.C. (2000) Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*. 71: 693-696.

Xuan, H.; Zhao, J.; Miao, J.; Li, Y.; Chu, Y.; Hu, F. (2011) Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 78–85

Zhu, W.; Chen, M.; Shou, Q.; Li, Y.; Hu, F. (2011) Biological Activities of Chinese Propolis and Brazilian Propolis on Streptozotocin-Induced Type 1

Diabetes *Mellitus* in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011: 1-8.

Weiler, C.B.; Frohlich, J.K.; Boligon, A.A.; Janovik, V.; Athayde, M.L. (2010) Potencial antioxidante *in vitro* das folhas de *Ipomoea cairica* L. sweet. Saúde (Santa Maria). 36 (2): 55-62.