



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR DIFERENTES ESPÉCIES  
DE ABELHAS: ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS**

**Marcus Vinicius Dias de Lima**

**BELÉM - PA  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR DIFERENTES ESPÉCIES  
DE ABELHAS: ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS**

Autor: Marcus Vinicius Dias de Lima

Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BELÉM - PA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Lima, Marcus Vinicius Dias de, 1986-

Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos / Marcus Vinicius Dias de Lima. - 2015.

Orientador: Marta Chagas Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2015.

1. Geoprópolis. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Própolis. 4. Antioxidantes. 5. Compostos fenólicos. I. Título.

CDD 22. ed. 615.36

# **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Marcus Vinicius Dias de Lima**

**GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR DIFERENTES ESPÉCIES DE ABELHAS:  
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO  
TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro (Orientadora)  
Instituição: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

---

Prof. Dra. Carolina Heitmann Mares de Azevedo  
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

---

Prof. Dra. Mioni Thieli Figueiredo Magalhães de Brito  
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

**BELÉM - PA**

**2015**

## DEDICATÓRIA

À minha família, por todo o amor.

Aos amados amigos, que sempre vibram comigo nas minhas conquistas  
e momentos de felicidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro, por ter  
acreditado em mim.

Ao Aderaldo de Paiva Lola Filho, pela companhia e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Universo, que aqui chamo de Deus, pelas oportunidades de aprendizado e pelas conquistas profissionais e na melhoria como ser humano;

Aos meus pais, pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as minhas decisões;

Às minhas irmãs, pela amizade e companheirismo;

À minha sobrinha Sophia, simplesmente por sua existência em nossas vidas;

Ao Aderaldo de Paiva L. Filho, pelo companheirismo e incentivo;

À profa. Dra. Marta Chagas Monteiro, pela oportunidade ímpar e por acreditar no meu potencial;

Aos amigos queridos Ana Carla Godinho, Thiago Portal, João Paulo Bastos e Fábio Oliveira pelo importante apoio e pela participação na finalização deste trabalho;

Aos professores do PPGCF/UFPA Marcieni Andrade, José Luiz Vieira e Marcos Valério Silva pela compreensão e apoio quando precisei;

Aos demais professores, pela valiosa contribuição no aprendizado;

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas/ICB/UFPA, especialmente à Fernanda Alcântara, André Pinto, Luiza Graim, Ismaisa Carvalho e às chefias Dr. Ricardo Vieira e Tereza Cristina Alvarez, pela amizade e por todo o apoio recebido para a conclusão desta etapa;

Aos queridos amigos do Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas/UFPA: Milena Cristina, João Vitor, Juliana Silvestre, Érica Vanessa, Alexandre Rosa, Amanda Dias, Diele Magno, Ana Tereza, Rosana Cristina, Camila Santos, Rosana Volpato, Ricardo Paraense e Natasha Galúcio;

À equipe do Laboratório de Ensaios *In Vitro* e Microbiologia/UFPA, especialmente a Roseane Ferreira, Magda Cardoso, Rafaella Matos, Glauber Vilhena, Rafael Quadros e Kelly Navegantes pela contribuição na realização de experimentos;

À equipe do Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais, do Departamento de Química da UNICENTRO;

A todos os colegas da turma de mestrado, especialmente à Kelly Freitas e Denise Contente, pela ótima convivência;

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade de crescimento profissional e por ser meu local de trabalho;

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, e do PPGCF/UFGA especialmente à Cléciane e à Dona Brasília;

Ao CNPQ pelo suporte financeiro durante o período em que fui bolsista;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui.

“Às vezes nossa própria luz se apaga e é reacendida pela fagulha de outras pessoas. Todos temos motivos para pensar com uma profunda gratidão naqueles que acenderam a chama dentro de nós.”

Albert Scheitzer



## RESUMO

LIMA. M. V. D. de. Geoprópolis produzida por diversas espécies de abelhas: Atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

Dentre os meliponíneos ou “abelhas sem ferrão” (*Stingless bee*) destacam-se a *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), *Melipona marginata* (Manduri) e a *Tetragonisca angustula* (Jataí). Um dos produtos produzidos por estas abelhas e que apresenta grande aceitabilidade no mercado é a geoprópolis, uma substância resinosa e balsâmica de composição química complexa, coletado pelas abelhas de brotos, exsudações e de outras partes do tecido vegetal, que é transformada por processos enzimáticos por adição de secreções, sendo adicionados terra e/ou barro. Dentre os componentes químicos, destacam-se a presença de compostos fenólicos, diterpenos, triterpenos, óleos essenciais e muitos outros. As atividades mais estudadas da própolis são a antibacteriana e antifúngica, além da atividade antiviral, imunomoduladora, antitumoral, antiinflamatória e antioxidante. Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), e atividade antirradicalar pelo método de capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), além da determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonóides (Método de *Folin-Cioucalteu* e complexação com cloreto de alumínio, respectivamente) de amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula*). Todas as amostras de geoprópolis apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactéria gram-positivas, sendo que a abelha Manduri apresentou menor valor de CIM e CBM; somente a espécie Mandaçaia apresentou atividade moderada contra bactérias gram-negativas. A geoprópolis da abelha Manduri foi a que apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonóides, seguido da geoprópolis da abelha mandaçaia, e ambas estavam em conformidade com os parâmetros preconizados pela legislação vigente, sendo que a geoprópolis da espécie Manduri também apresentou elevados níveis de antioxidante total em relação as demais abelhas. Observou-se que a atividade antimicrobiana dos extratos de geoprópolis não está diretamente associada aos elevados níveis de compostos fenólicos, incluindo flavonóides.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos; Geoprópolis; Própolis.

## ABSTRACT

LIMA. M. V. D. Geopropolis produced by several species of bees: antimicrobial and antioxidant activities and determination of phenolic compounds. Dissertation (Master) Pos-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belem, 2015.

Among meliponineos or stingless bees the most important are *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), *Melipona marginata* (Manduri) and *Tetragonisca angustula* (Jataí). One of their product is geopropolis, a balsamic and resinous substance with complex chemical composition, collected from shoots, seepage and other parts of the plant tissue by these bees, which transformed it through enzymatic process by adding secretions and earth or clay, alone or in combination. Among the chemicals components, highlights the presence of phenolic compounds, diterpenes, triterpenes, essential oils and many other. The most studied propolis activity are antibacterial and antifungal, in addition to antiviral, immunomodulatory, anti-tumor, anti-inflammatory and antioxidant. Therefore this work aim to evaluate the antimicrobial activity, through determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), beyond the determination of the levels of flavonoids and phenolics compounds (*Folin-Ciocalteu* method and complexation with aluminum chloride, respectively) using geopropolis samples from different bees species (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* and *Tetragonisca angustula*). All the geopropolis samples exhibit antimicrobial activity against gram-positive bacteria, wherein the Manduri Bee showed the lowest MIC and MBC; only Mandaçaia species showed moderate activity against gram-negative bacteria. The Manduri's geopropolis showed higher content of phenolics compounds and flavonoids, followed by Mandaçaia's geopropolis and both were in accordance with the parameters established by current legislation, wherein the Manduri's geopropolis also present high total antioxidant levels compared with other bees. It was noted that the antimicrobial activity of geopropolis extracts were not directly associated with high levels of phenolic compounds, including flavonoids.

**Keywords:** Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Geopropolis; Propolis; Phenolic compound.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Principais espécies produtoras da Tribo Meliponini criadas nas diferentes regiões do Brasil	18
<b>Figura 02</b>	Abelhas sem ferrão encontradas no território brasileiro e sua terminologia popular	19
<b>Figura 03</b>	Alguns compostos fenólicos presentes na própolis	21
<b>Figura 04</b>	Reação de desprotonação de compostos fenólicos em meio básico, gerando o ânion fenolato e o molibdênio sofre redução pelo ânion fenolato	25
<b>Figura 05</b>	Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio	26
<b>Figura 06</b>	Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	26
<b>Figura 07</b>	Mapa do estado do Paraná	28
<b>Figura 08</b>	Exemplificação do experimento (Atividade antimicrobiana)	32
<b>Figura 09</b>	Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis	33
<b>Figura 10</b>	Esquematização da metodologia usada para a determinação da CIM	34
<b>Figura 11</b>	Valores da CIM e CBM para <i>E. faecalis</i>	39
<b>Figura 12</b>	Valores da CIM e CBM para <i>S. aureus</i> MRSA	40
<b>Figura 13</b>	Valores da CIM e CBM para <i>S. aureus</i> ATCC	41
<b>Figura 14</b>	Valores da CIM e CBM para <i>E. coli</i>	42
<b>Figura 15</b>	Valores da CIM e CBM para <i>P. aeruginosa</i>	43
<b>Figura 16</b>	Determinação do teor de compostos fenólicos totais (%) dos extratos etanólicos de geoprópolis.	45
<b>Figura 17</b>	Determinação do teor de flavonóides totais (%) dos extratos etanólicos de geoprópolis	46
<b>Figura 18</b>	Correlação da atividade antioxidante total com diferentes concentrações dos extratos etanólicos de geoprópolis a 50% e 90% (mmol/L)	47

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b>	Classificação atual das abelhas sem ferrão	17
<b>Quadro 02</b>	Amostras enviadas pelo CRONAT da UNICENTRO, de três apiários localizados na cidade de Prudentópolis/PR	29
<b>Quadro 3</b>	Rendimento dos extratos de geoprópolis, teor de compostos fenólicos e flavonóides, e atividade antioxidante total (TEAC)	48

## LISTA DE TABELAS

- |                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabela 01</b> | Levantamento da atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis frente a cepas ATCC e cepas selvagens de micro-organismos gram-positivos, gram-negativos e leveduras | 23 |
| <b>Tabela 02</b> | Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de geoprópolis.  | 44 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
DEQ	Departamento de Química
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
EEGP	Extrato Etanólico de Geoprópolis
DMSO	Dimetilsufóxido
ATCC	American Type Culture Collection
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
UFPA	Universidade Federal do Pará
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCCLS	National Commitee for Laboratory Standards
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Persulfato de potássio
AMH	Ágar Muller-Hinton
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
µg	Micrograma
m/V	Massa/Volume
mmol/L	Micromol/Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
µL	Microlitro
nm	Nanômetro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1	<b>Apicultura no brasil</b>	15
2.2	<b>Abelhas</b>	16
2.3	<b>Própolis e geoprópolis</b>	20
2.4	<b>A própolis como potencial alternativa antimicrobiana</b>	22
2.5	<b>Quantificação de flavonóides e fenóis totais da geoprópolis por espectrofotometria</b>	24
2.6	<b>Dosagem da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)</b>	26
3	<b>OBJETIVOS</b>	27
3.1	<b>Objetivo geral</b>	27
3.2	<b>Objetivos específicos</b>	27
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
4.1	<b>Obtenção e preparo da geoprópolis</b>	28
4.2	<b>Diluição dos extratos para pesquisa do potencial antimicrobiano da geoprópolis</b>	29
4.3	<b>Avaliação do potencial antimicrobiano da geoprópolis</b>	30
4.3.1	<b>OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS</b>	30
4.3.2	<b>PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA</b>	30
4.3.3	<b>PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS</b>	31
4.3.4	<b>TESTE DE MICRODILUIÇÃO</b>	31
4.3.4.1	<b>Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b>	32
4.3.4.2	<b>Obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b>	34
4.4	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos</b>	35
4.4.1	<b>CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO</b>	35
4.4.2	<b>QUANTIFICAÇÃO DE FENOIS NA AMOSTRA</b>	35
4.5	<b>Determinação do teor de flavonóides totais</b>	36
4.5.1	<b>CURVA PADRÃO DE QUERCETINA COM CLORETO DE ALUMÍNIO</b>	36
4.5.2	<b>QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NA AMOSTRA</b>	37
4.6	<b>Determinação da atividade antioxidante</b>	37
5	<b>RESULTADOS</b>	39
5.1	<b>Atividade antimicrobiana</b>	39
5.1.2	<b>BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS</b>	39
5.1.3	<b>BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS</b>	42
5.2	<b>Quantificação de compostos fenólicos totais</b>	44
5.3	<b>Quantificação de flavonóides</b>	45
5.4	<b>Atividade antioxidante total</b>	46
6	<b>DISCUSSÃO</b>	49
7	<b>CONCLUSÃO</b>	54
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	55

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pelo homem tem subsidiado fonte de compostos químicos bioativos, à partir dos quais muitos medicamentos foram produzidos até os dias atuais. No entanto, somente à partir do século XIX é que os pesquisadores começaram a isolar os princípios ativos das plantas medicinais (PHILLIPSON, 2001, NEWMAN & CRAGG, 2007, MILLER, 2011). Além disso, nos últimos anos, há também um crescente interesse nas atividades biológicas dos produtos naturais produzidos por determinados insetos, tais como a ação antimicrobiana do mel e da própolis (ADELMANN, 2005; RAMANAUSKIENĖ et al. 2009). O Brasil exportou 25 milhões de kg de mel em 2014, totalizando US\$ 98,576 milhões, segundo a Associação Brasileira dos Exportadores de Mel (Abemel) (PORTAL BRASIL, 2015) e apresenta excelente potencial apícola, que visa a produção e utilização de produtos como pólen apícola, geléia real, rainhas, polinização, apitoxina e própolis (EMBRAPA, 2003).

As abelhas pertencem a Ordem Hymenoptera e possuem um importante papel na polinização de vegetação nativas e na manutenção da diversidade de plantas, tornando-as essenciais na conservação de diversos ecossistemas (KERR et al. 1996). Há cerca de 20.000 espécies de abelhas já descritas, e estima-se que pelo menos 3.000 delas ocorram no Brasil (SILVEIRA et al. 2002; MICHENER, 2007). Dentre as espécies de abelhas mais frequentes no Brasil, destacam-se: *Melipona marginata* (Manduri), a *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) e a *Tetragonisca angustula* (Jataí), estas espécies produzem o mel e a geoprópolis, que é formada da mesma maneira que a própolis produzida por outras espécies de abelhas, porém com adição de terra e/ou barro (DA SILVA, ZUCCHI & KERR, 1972; BARTH, 1998; BARTH et al. 1999; LOPES et al. 2005; NUNES et al. 2013).

A própolis é constituída por 30% de cera, 50% de resinas e bálsamos, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 5% de pólen e outras substâncias (BURDOCK, 1998). Com isso, o uso de própolis pelo homem é registrado desde tempos remotos (GHISALBERTI, 1979) e suas atividades biológicas são estudadas extensivamente (PEREIRA, 2002), tais como antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral (GRANGE & DAVEY, 1990; DOBROWOLSKI et al. 1991; AMOROS et al. 1992; SERKEDJIEVA et al. 1992; HIGASHI & DE CASTRO, 1994; BANKOVA et al. 1995; STEINBERG et al. 1996; KUJUMGIEV et al. 1999; SFORCIN et al. 2000; ITO et al.



2001; ORSI et al. 2005; FREITAS et al. 2006). Assim como outras atividades como anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, hepatoprotetora, antioxidante e imunomoduladora (BANSKOTA et al. 2000; AHN et al. 2004; ORSOLIC & BASIC, 2005; SFORCIN, 2007).

Estas atividades estão ligadas diretamente a composição química da própolis, que apresenta grau de variação de acordo com a espécie de abelha, biodiversidade da vegetação de cada região visitada (KOO et al. 1999; KUJUMGIEV et al. 1999; SFORCIN et al. 2000; VELIKOVA et al. 2000; MELLIYOU & CHINO, 2004; BANKOVA, 2005; SALATINO et al. 2005; MOHAMMADZADEHET al., 2007). Bankova (2005) relata que os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres) são os principais metabólitos secundários relacionados as propriedades biológicas.

Uma das atividades mais avaliadas da própolis é sua ação antimicrobiana frente a bactérias, fungos e vírus, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado (SANTOS et al. 2003; KILIC et al. 2005; FARNESI et al. 2009). Porém, há uma escassez de estudos dessas atividades relacionando a geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão. Com isso, este estudo visa avaliar a atividade antimicrobiana, o teor de flavonóides totais e de compostos fenólicos, e também a atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis produzidas por três diferentes espécies de abelhas (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula*).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Apicultura no Brasil

Segundo Rocha (2008), a apicultura é a arte ou ciência de criar abelhas de forma racional, sendo uma atividade conhecida por produzir, em menor tempo, os melhores produtos, com o menor custo, visando obter o maior lucro. É uma atividade milenar com representatividade alimentar e terapêutica, além de contribuir para a manutenção da biodiversidade, sendo que essa atividade exige investimento inicial relativamente baixo e elevada rentabilidade. Entretanto, devido o surgimento de doenças e pragas na década de 1950, a apicultura no Brasil sofreu muitas perdas, estimando-se que 80% das colônias de abelhas foram dizimadas e por isso surgiu a necessidade de aumentar a resistência das abelhas às doenças. Então, em 1956, o Ministério da Agricultura apoiou a pesquisa do professor Warwick Estevam Kerr em selecionar colônias de abelhas africanas *A. mellifera scutellata* produtivas e resistentes a pragas. Essas abelhas encontraram no Brasil condições climáticas e de vegetação excelentes para se propagarem e cruzarem com as abelhas europeias, que haviam sido introduzidas anteriormente, gerando um novo híbrido, as abelhas africanizadas. A partir disso, características como a agressividade na competição por alimento, a grande capacidade de enxameação e a facilidade de adaptação a diversos climas e ambientes, possibilitaram a expansão das abelhas africanizadas por todo o Brasil e outros países próximos (SANFORD, 2005; CARVALHO, 2006; GONÇALVES, 2006).

Da década de 1990 a meados dos anos 2000, o Brasil superou a posição de 16º lugar no ranking dos países exportadores de mel para o 4º lugar registrando lucro de US\$ 23,1 milhões em 2002. Dados da Confederação Brasileira de Apicultura revelam que a produção de mel no Brasil alcança 36 mil toneladas (APL – APICULTURA DO SERTÃO, 2007). A partir da década de 1990 que o Brasil começou a receber diversos incentivos econômicos para agregar rentabilidade ao setor agropecuário. Em 2002, o setor apícola brasileiro aumentou consideravelmente sua produção e comercialização, pois a União Europeia embargou a comercialização do mel proveniente da China devido a resíduos de contaminação por antibióticos e os Estados Unidos acusaram o comércio de mel argentino de concorrência desleal. Em 2009, a produção do mel cresceu 2,57% nas regiões brasileiras, principalmente nas

regiões Nordeste e Sul (NETO & NETO, 2005). Já em 2014, a exportação do mel alcançou a quantidade de 25 milhões de kg, representando US\$ 98,576 milhões (PORTAL BRASIL, 2015).

O município de Prudentópolis (Paraná), local de origem das amostras de geoprópolis utilizadas neste estudo, apresenta características propícias à atividade apícola, que é caracterizada pela presença de pequenos produtores que extraem e comercializam seus produtos derivados, utilizam mão-de-obra familiar e mantêm atividades paralelas, seja como principal ou como complementar. No município há 52 apicultores produtores de própolis cadastrados na associação dos apicultores de Prudentópolis (FINGER, 2009; TERNOSKI et al. 2009).

## 2.2 Abelhas

A ordem Hymenoptera é constituída pelas formigas, vespas e as abelhas, sendo que dentre estes, as abelhas são importantes agentes polinizadores, responsáveis por manter o fluxo gênico em diversas espécies de plantas nativas e cultivadas nos diversos ecossistemas ao redor do mundo (IDSM, 2013). As abelhas descendem das vespas que modificaram sua forma de se alimentar, passando a consumir o pólen das flores ao invés de pequenos insetos e aranhas, num processo evolutivo com mais de 135 milhões de anos. Com isso, várias espécies de abelhas surgiram e atualmente são conhecidas cerca de 20 mil espécies (SILVEIRA et al. 2002) e estima-se que 3% dessas ocorram no Brasil (MICHENER, 2007). Deste total, apenas 2% são sociais e produtoras de mel, sendo que o gênero *Apis* é a mais conhecida e difundida, cujo seu fóssil mais antigo é a espécie já extinta *Apis ambrustere* datada de 12 milhões de anos. Provavelmente esse gênero de abelha tenha surgido na África após a separação do continente americano, tendo posteriormente migrado para a Europa e Ásia, originando as espécies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis korchevniskov*, *Apis andreniformis*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis* e *Apis nigrocincta* (EMBRAPA, 2003).

Dentre as espécies de abelhas, os meliponíneos ou “abelhas sem ferrão” (*Stingless bee*) são conhecidos por apresentarem a atrofiação do ferrão, perdendo assim a capacidade de ferrar. A tribo Meliponini é composta por 59 grupos de abelhas

e são classificadas por gênero e subgênero (SCHWARZ, 1932; MOURE, 1946; SCHWARZ, 1932 MOURE, 1948; MOURE, 1961; MICHENER, 1990; CAMARGO & PEDRO, 1992; WILLIE, 1979; MICHENER, 2000; CAMARGO & ROUBIK, 2005; CAMARGO & PEDRO, 2007; MICHENER, 2007), com mais de 400 espécies nominais válidas para a região neotropical, sendo que esses grupos se encontram distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989). No entanto, de acordo com Michener (2007), essas abelhas têm sido tratadas como pertencentes à família *Apidae*, subfamília *Apinae* e tribo *Meliponini* (Quadro 1). Através da consulta ao Catálogo Moure das espécies de abelhas neotropicais é possível chegar a classificação da família *Apidae*.

<b>Classificação atual</b>	
<b>Classe</b>	<i>Insecta</i>
<b>Ordem</b>	<i>Hymenoptera</i>
<b>Superfamília</b>	<i>Apoidea</i>
<b>Família</b>	<i>Apidae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Apinae</i>
<b>Tribo</b>	<i>Meliponini</i>

Quadro 1 - Classificação atual das abelhas sem ferrão (Adaptado de ISPN, 2012).

Dentre as abelhas da tribo *Meliponini* que são características da Região Sul do Brasil, destacam-se a *Melipona marginata* (Manduri), a *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) e a *Tetragonisca angustula* (Jataí), conforme figura 1 (ISPN, 2012).

Região	Nome Científico	Nome(s) Popular(es)	Estados
Norte	<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaíra, Jandaíra-Preta	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-Cinzenta,	PA, TO
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra-Amarela	AM, PA
	<i>Scaptotrigona</i> sp. <sup>1,2</sup>	Canudo <sup>1</sup>	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
Nordeste	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI
	<i>Melipona mandaçaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AL, BA, PB, PE, SE
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu-Verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu	AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE
Centro-Oeste	<i>Melipona compressipes</i>	Uruçu, Jandaíra	GO, MS, MT
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	GO, MS, MT
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu	MT
	<i>Scaptotrigona</i> sp. <sup>1,2</sup>	Canudo <sup>1</sup>	GO, MS, MT
	<i>Tetragonisca angustula</i> <sup>2</sup>	Jataí	GO, MS, MT
Sudeste	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	MG, SP
	<i>Tetragonisca angustula</i> <sup>2</sup>	Jataí	ES, MG, RJ, SP
Sul	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	PR, RS, SC
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	PR, RS, SC
	<i>Melipona monduri</i>	Monduri	PR, RS, SC
	<i>Tetragonisca angustula</i> <sup>2</sup>	Jataí	PR, RS, SC

Figura 1 – Principais espécies produtoras da Tribo Meliponini criadas nas diferentes regiões do Brasil (Adaptado de ISPN, 2012).

A espécie *Melipona quadrifasciata*, conhecida popularmente como “Mandaçaia”, tem sua distribuição geográfica associada a regiões que estejam 500 metros acima do nível do mar. Entretanto, alguns Estados da região Nordeste já estão apresentando a produção de tais abelhas (BATALHA-FILHO et al. 2009). O mel produzido por esta espécie é um produto de fácil comercialização por ser bastante apreciado e sua produção é de cerca de 3 litros de mel/colmeia/ano (KLEINERT et al. 2009).

Já a espécie *Melipona marginata* (“Manduri”) consta como espécie vulnerável e está relacionada com a obtenção de néctar e pólen de 59 espécies de plantas, no Rio Grande do Sul, o que lhe confere uma característica de generalista (KLEINERT-GIOVANNINI & IMPERATRIZ-FONSECA, 1987; MARQUES et al. 2004). Ocorre nas

idades de Canela, Cambará do Sul, Caxias do Sul, Osório, Planalto, São Francisco de Paula e Tenente Portela (WITTMANN & HOFFMANN, 1991; MARQUES et al. 2004).

As abelhas da espécie *Tetragonisca angustula* (Jataí) são adaptáveis e mansas. O mel produzido por elas é composto de levulose que é mais doce que a sacarose, apresentando assim um sabor diferenciado e peculiar (LOPES et al. 2005), além de ser menos viscoso do que o mel produzido pelas abelhas do gênero *Apis*, apresentando diversos efeitos terapêuticos (BREYER, 1983; COOPERNATURAL, 2007).

Os meliponíneos (Figura 2) apresentam uma gama de produtos e subprodutos valorizados economicamente como o mel, pólen e a geoprópolis, além da importância ambiental da polinização (PALAZUELOS-BALLIVIÁN, 2008).



Figura 2 - Abelhas sem ferrão encontradas no território brasileiro e sua terminologia popular (adaptado de Manara, 2013; Züge, 2013).

### 2.3 Própolis e Geoprópolis

O termo geoprópolis é utilizado para diferenciar a própolis produzida pelas abelhas sem ferrão daquela produzida por outras espécies (BANKOVA et al. 2000; PEREIRA et al. 2003; PINTO et al. 2011; BARTH et al. 2013). Outra característica utilizada para identificar a própolis é a presença de epiderme com seus anexos como estômatos, pêlos vegetais (tricomas) e glândulas (WARAKOMSKA & MACIEJEWICZ, 1992; BARTH, 1998; MONTENEGRO et al. 2000; BASTOS et al. 2001; MONTENEGRO et al. 2001) diferentemente da geoprópolis (NOGUEIRA NETO, 1997;

BARTH & LUZ, 2003; BARTH, 2006) que não possui tricomas, e sim a presença de sedimento de terra ou barro usado na sua elaboração (BARTH, 1998; BARTH et al. 1999). No Brasil, índios usavam a geoprópolis na fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamentos (BARTH et al. 2009).

A própolis é utilizada, há pelo menos, 300 anos a.C. e tem sido empregada na medicina popular em todo o mundo. Há relatos de seu uso no Egito, Grécia e Roma para tratar doenças de pele e para aumentar a imunidade, assim como, os antigos egípcios a utilizavam para embalsamar seus mortos (GHISALBERTI, 1979). Própolis deriva do grego e significa “em defesa da cidade” (pro = em defesa e pólis = cidade / colméia). É uma substância resinosa e balsâmico de composição química complexa, coletado pelas abelhas de brotos, exsudações e de outras partes do tecido vegetal, que é transformada por processos enzimáticos por adição de secreções salivares. Nesse sentido, em regiões de zonas temperadas, como é o caso de países da Europa, América do Norte e Nova Zelândia, a maior fonte de própolis são os exsudatos dos brotos de espécies *Populus* (NAGY et al. 1986; GREENAWAY et al. 1987; GARCIA-VIGUERA et al. 1993; BANKOVA et al. 1996; MARKHAM et al. 1996). Na Venezuela a espécie *Clusia* (Guttiferae) é a fonte principal de própolis (TOMAS-BARBERAN et al. 1993) e no Sul do Brasil a *Araucaria* spp. e a *Baccharis* spp. são as fontes primárias (BANKOVA et al. 1996; MARCUCCI et al. 1998).

A própolis é utilizada pelas abelhas para proteção, reparo de frestas, danos na colméia, na construção de locais assépticos para postura da abelha rainha e ainda na mumificação dos insetos invasores (MARCUCCI, 1995; FRANCO et al. 2000; PEREIRA et al. 2002). Quanto ao seu uso medicinal, a própolis é empregada na indústria biocósmética e alimentícia (GHISALBERTI, 1979). Segundo Lustosa et al. (2008), o Brasil ocupa o segundo lugar na produção de própolis, ficando atrás apenas da China.

A própolis possui grande variação de cor, passando pelo verde, vermelho até o marrom, sendo composta principalmente de 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 5% de pólen e outras substâncias (BURDOCK, 1998). No entanto, seus constituintes químicos podem ser classificados em primário ou secundário. Os constituintes primários são encontrados na maioria das própolis e as caracterizam quimicamente, variando em teores de resina (50 a 60%), de cera (30 a 40%), de óleos voláteis (5 a 10%), de pólen (5%), assim como microelementos como alumínio e cálcio (MORENO et al. 1999; PARK et al. 2002;

FUNARI & FERRO, 2006). Já a composição secundária varia de região para região onde a própolis é produzida, a qual depende da flora do local e, portanto, das características geográficas e climáticas da região (BANKOVA, 2005).

Desta forma, a composição química da própolis é bastante complexa, e já foram identificados mais de 300 componentes, cuja expressão é dependente da sazonalidade da flora local, tal fato que representa um desafio para a padronização de seu extrato (MARCUCCI, 1995; DE CASTRO, 2001). Dentre os componentes, destacam-se a presença de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos e benzopiranos), diterpenos, triterpenos, óleos essenciais e muitos outros (Figura 3). Essa diferença na composição química da própolis de diferentes origens leva à expectativa de que possa haver diferenças na ação biológica de cada uma.

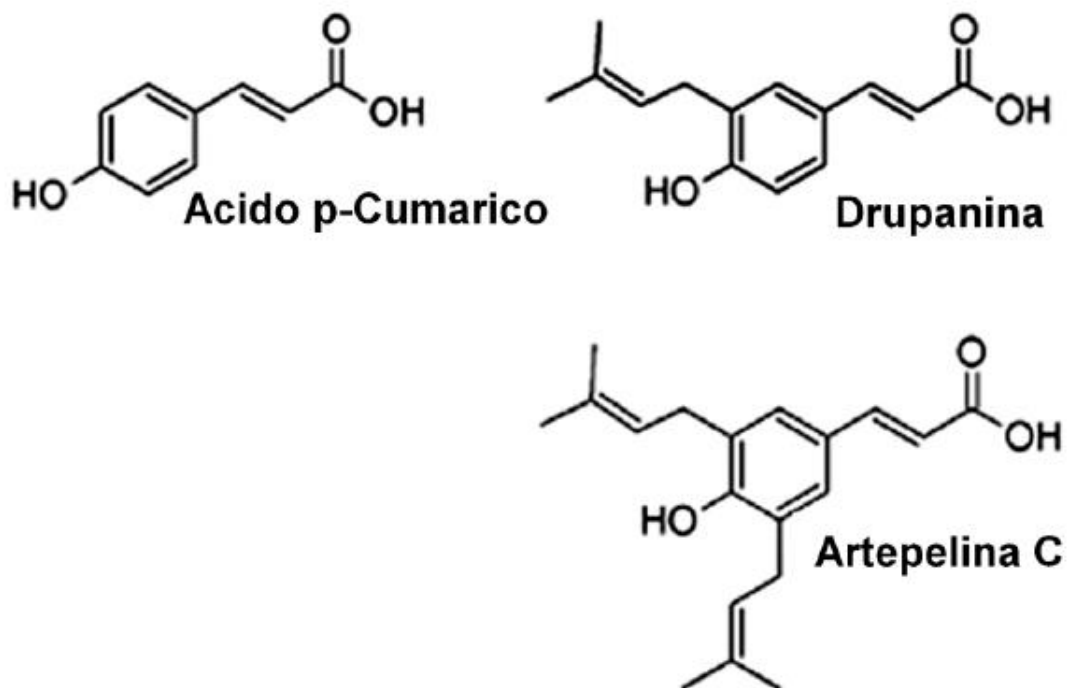


Figura 3 – Alguns compostos fenólicos presentes na própolis (CHANG et al. 2008).

As atividades mais estudadas da própolis são a antibacteriana e a antifúngica (MARCUCCI, 1995) além da atividade antiviral (MANOLOVA et al. 1985), imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (BANKOVA et al.



2000). Na própolis brasileira, as atividades antibacterianas e antifúngicas estão associadas a presença de ácidos prenilados p-cumarínicos e os diterpenos (BANKOVA, 2005). Estudos demonstram que as propriedades da própolis e suas atividades biológicas diferem de acordo com a região geográfica em que o produto foi coletado (MARKHAM et al. 1996). Nesse sentido, a propriedade antimicrobiana da própolis tem sido extensivamente estudada e seu efeito antibacteriano frente a bactérias gram-positivas, como *S. aureus* e *E. faecalis*, assim como algumas bactérias gram-negativas tem sido demonstrado por diversos autores (GRANGE & DAVE, 1990; KUJUMGIEV et al. 1999; SFORCIN et al. 2000; FERNANDES et al. 2001; ORSI et al. 2005; ORSI et al. 2006; SCAZZOCCHIO et al., 2006;).

#### **2.4 A Própolis como potencial alternativa antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da própolis da abelha *Apis mellifera* tem sido extensivamente relatada por vários autores, como Park et al. (1998) que verificaram que o crescimento do *Streptococcus* foi inibido pela ação do extrato etanólico de própolis oriundo de várias regiões brasileiras e Fernandes et al. (2001) que relataram a atividade antibacteriana da própolis de diversos estados brasileiros contra bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus* sp) e frente a espécie gram-negativa *E. coli*. Em 1991, Davey & Grange também reportaram que a própolis tem ação antibacteriana contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*) e ação limitada em bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Kedzia et al. (1990) relataram que o mecanismo de ação antimicrobiano da própolis poderia ser atribuído ao fenômeno de sinergismo entre os constituintes químicos da resina.

Em resumo, a Tabela 1 mostra vários estudos que relatam a atividade antimicrobiana da própolis frente a vários micro-organismos com virulências diferente, provenientes de cepas selvagens (*Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*) e de cepas padrões (*S.aureus* -ATCC 6538-P, 25922; *S. pyogenes*-ATCC 12204; *E. faecalis*-ATCC 29212; *E.coli*-ATCC 8739, 1053, 25922; *P. aeruginosa*-ATCC 27853, 9027; *B. cereus*-ATCC 11778; *C.albicans*-ATCC 10231, 90028).

Tabela 1- Levantamento da atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis frente a cepas ATCC\*\* e cepas selvagens de microrganismos gram-positivos, gram-negativos e leveduras.

Microrganismos	(ATCC**)	Sensibilidade/ n° artigos	CIM (µg/ml)	Referências
	6538-P	+ / 2	*NR	MOHAMMADZADEH <i>et al.</i> , 2007
			NR	PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004
			50- 100	ALENCAR <i>et al.</i> , 2007
			62,5- 125	CABRAL <i>et al.</i> , 2009
<i>S.aureus</i>	25923	+ / 12	*NR	KARTAL <i>et al.</i> , 2003; REZENDE <i>et al.</i> , 2006; KOSALEC <i>et al.</i> , 2005; PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004; DAUGSCH <i>et al.</i> , 2008; BURIOL <i>et al.</i>
Microrganismos	(ATCC**)	Sensibilidade/ n° artigos	CIM (µg/ml)	Referências
<i>S. pyogenes</i>	12204	+ / 1	*NR	KOSALEC <i>et al.</i> , 2005
<i>S. pyogenes</i>	*	+ / 1	7.8 – 107.90	MORENO <i>et al.</i> , 1999
			1250-310	STEPANOVIC <i>et al.</i> , 2003
<sup>§</sup> <i>E. faecalis</i>	29212	+ / 3	*NR	KOSALEC <i>et al.</i> , 2005; PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004
		-	-	KARTAL <i>et al.</i> , 2003
<i>E. faecalis</i>	*	+	14.60 – 210	MORENO <i>et al.</i> , 1999
	8739	+ / 1	500	MOHAMMADZADEH <i>et al.</i> , 2007;
	10538	-	*NR	BURIOL <i>et al.</i> , 2009
<i>E. coli</i>			*NR	1875- 7500 SILICI & KUTLUCA, 2005
	25922	+ / 1	5000- 1250	STEPANOVIC <i>et al.</i> , 2003
		-	*NR	MORENO <i>et al.</i> , 1999; KARTAL <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i>	*	+ / 1	*NR	PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004
			7630	PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004;
		+ / 4	*NR	BURIOL <i>et al.</i> , 2009; KOSALEC <i>et al.</i> , 2005
	27853		1875- 7500	SILICI & KUTLUCA, 2005
<i>P. aruginosa</i>		- / 2	*NR	MORENO <i>et al.</i> , 1999; KARTAL <i>et a.</i> , 2003
	9027	+	500	MOHAMMADZADEH <i>et al.</i> , 2007
<i>B. cereus</i>	11778	+ / 1	*NR	PEPELJNJAK & KOSALEC, 2004
			250	MOHAMMADZADEH <i>et al.</i> , 2007
<i>C. albicans</i>	10231	+ / 3	*NR	KARTAL <i>et al.</i> , 2003; REZENDE <i>et al.</i> , 2008
	90028	*NR	468- 3750	SILICI & KUTLUCA, 2005
<i>C. albicans</i>	*	+ / 1	310-2500	STEPANOVIC <i>et al.</i> , 2003
		-	*NR	SILVA <i>et al.</i> , 2008

No entanto, há poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana da própolis e geoprópolis produzidas por outras espécies de abelhas, como os reportados por Miorin et al. (2003) que mostraram a atividade antimicrobiana da geoprópolis coletada de abelhas da espécie *Tetragonisca angustula* frente à cepa de *Staphylococcus aureus*. Dessa forma, há necessidade de vários estudos comprovando a atividade antimicrobiana da geoprópolis frente a várias espécies de bactérias e fungos.

Diversos autores tem identificado os compostos químicos que são relacionados às atividades biológicas da própolis e da geoprópolis oriundos de regiões do Brasil e outros países (MALTERUD et al. 1985; BANSKOTA et al. 1998; SAWAYA et al. 2002; SAWAYA et al. 2004; LUSTOSA et al. 2008). São os compostos fenólicos, como a diidrocampferide (dihidroflavonol) e a isosacuranetina (flavonona), que apresentam atividade antimicrobiana (FINGER et al. 2013).

## **2.5 Quantificação de flavonóides e fenóis totais da geoprópolis por espectrofotometria**

Muitos métodos têm sido utilizados para o isolamento e identificação dos constituintes da própolis e uma alternativa analítica que representa baixo custo em análises de rotina é a espectrofotometria, visto que as substâncias fenólicas podem ser quantificadas por este método. É um método preciso, isto é, reprodutível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro. A análise por espectrofotometria de flavonóides e fenóis totais em amostras de própolis são as mais comumente realizadas, visto que essa classe está presente na própolis de qualquer origem (MARCUCCI, 1996).

Um método muito utilizado para quantificação de polifenóis é o de *Folin-Ciocalteu*. Ele é capaz de determinar simples derivados de benzeno, bem como hidroxicinamatos, tocoferóis e flavonóides. Este método utiliza o reagente de *Folin-Ciocalteu*, que é uma mistura de ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias

reduzoras. A figura 4 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxi-redução entre o ânion fenolato e o molibdênio do reagente de *Folin* sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (OLIVEIRA et al. 2009).

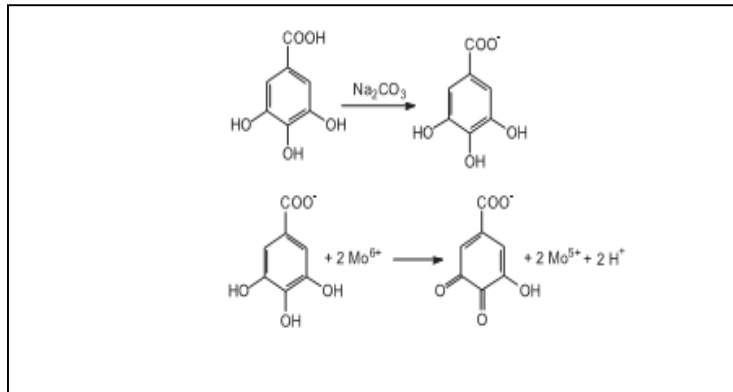
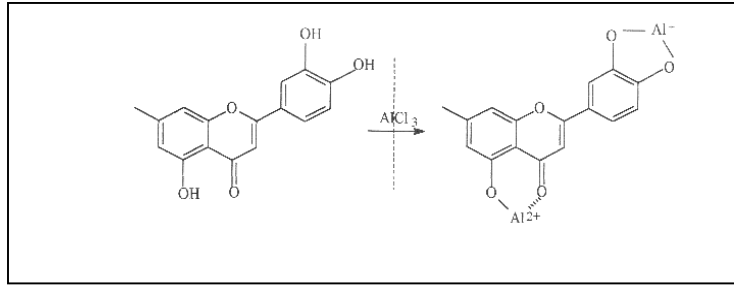


Figura 4- Reação de desprotonação de compostos fenólicos em meio básico, gerando o ânion fenolato e o molibdênio sofre redução pelo ânion fenolato (OLIVEIRA et al 2009).

Na quantificação de flavonóides totais, a metodologia baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio com o carbono C4 do grupo ceto e os grupos hidroxilas dos carbonos C3 e C4 de flavonas e flavonóis em meio metanólico (CHANG et al. 2002). A formação do complexo promove um desvio para maiores comprimentos de onda (deslocamento batocrômico). Desta maneira é possível determinar a quantidade de flavonóides no comprimento de onda de 425 nm, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas que também causam uma intensificação na absorção (MARCUCCI, 1996). No entanto, a estimativa do teor de flavonóides totais pode estar subestimada na amostra, pois outros flavonóides com estruturas diferentes não são detectados por este método, como de flavonona que tem sido detectada na análise por CLAE (FUNARI & FERRO, 2006).



**Figura 5-** Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Markham, 1982).

## 2.6 Capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)

A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) é utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante de uma determinada amostra. O trolox é caracterizado como um composto antioxidante sintético similar à vitamina E, e é utilizado para o preparo da curva padrão da metodologia ABTS•+ (ARTS et al. 2004). Com esse método, pode-se medir a atividade antioxidante para compostos lipofílicos, hidrofílicos, incluindo flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides, entre outros (RE et. al. 1999). A figura 6 mostra a atividade de estabilização do radical ABTS•+ na presença de antioxidantes.

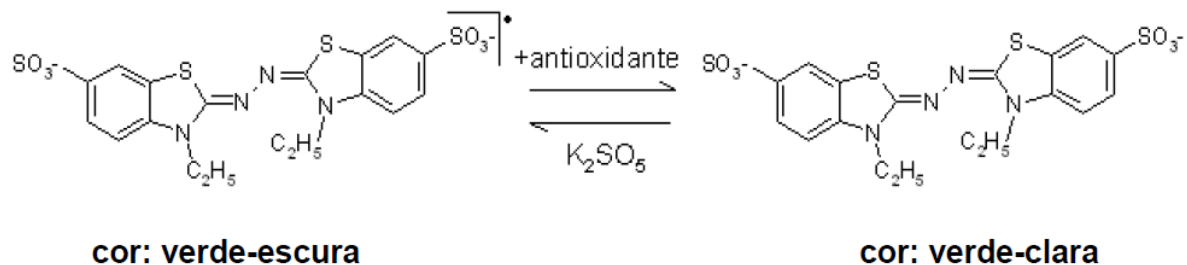


Figura 6 – Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (RUFINO et al. 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e antioxidante de amostras de geoprópolis obtidas das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula*, assim como quantificar o teor de compostos fenólicos presentes nestas geoprópolis.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos Extratos Etanólicos de Geoprópolis (EEGP) das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula* frente as cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Avaliar a atividade antioxidante dos EEGP das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula* pelo método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC);
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais presentes nos EEGP das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula*;
- Determinar o teor de flavonóides totais presentes nos EEGP das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata* e *Tetragonisca angustula*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo da geoprópolis

As amostras de geoprópolis analisadas foram produzidas pelas abelhas *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), *Melipona marginata* (Manduri) e *Tetragonisca angustula* (Jataí) em apiários localizados em Prudentópolis, localizada na região sudeste do estado do Paraná. Em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do Departamento de Química (DEQ) da Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO) para análise e preparação dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGP), conforme descrito por SCHMIDT, 2010 (Figura 7).

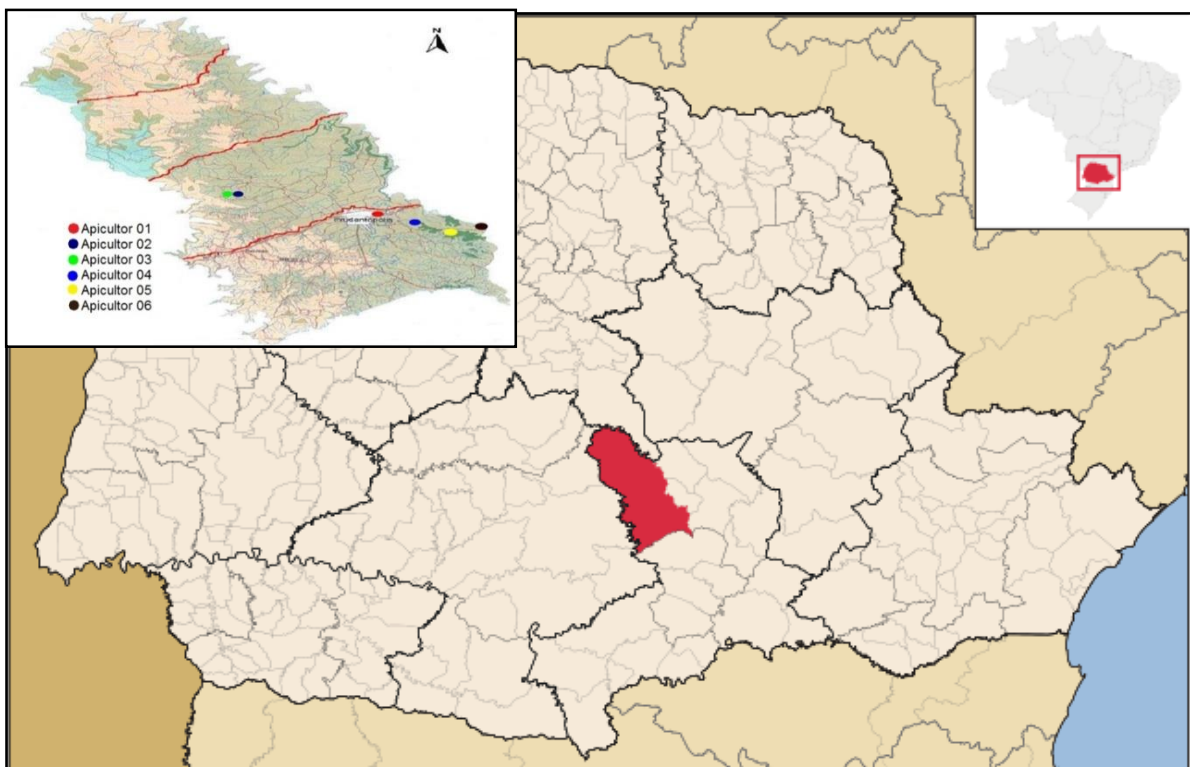


Figura 7 – Mapa do estado do Paraná, localizado ao sul do Brasil, com a região de Prudentópolis, localizada no sudeste do estado, e os locais de coleta da geoprópolis. No mapa superior encontram-se as localizações dos apiários de onde foram coletadas as amostras analisadas. Fonte: SCHMIDT, 2010, modificado.

Foram coletadas três amostras de geoprópolis, de três apicultores de localidades distintas de Prudentópolis/PR. A primeira amostra corresponde a geoprópolis coletada da abelha Jataí, seguindo com a amostra 02 coletada da abelha Manduri e da amostra 03 que foi coletada a partir da abelha Mandaçaia, como mostra o quadro 2. Após a coleta, foram preparados os extratos de geoprópolis das amostras, utilizando álcool 70% como solvente, e ao final do processo esses extratos foram evaporados, pesados conforme metodologia descrita por SCHMIDT, 2010. Em seguida, foram enviados ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFGA para avaliação das atividades biológicas.

	<b>Sigla</b>
Amostra 01	Jataí
Amostra 02	Manduri
Amostra 03	Mandaçaia

Quadro 2 – Amostras enviadas pelo CRONAT da UNICENTRO, de 03 apiários localizados na cidade de Prudentópolis/PR, perfazendo um total de 3 amostras.

#### **4.2 Diluição dos extratos para a pesquisa do potencial antimicrobiano da geoprópolis**

Para a realização dos testes antimicrobianos, inicialmente foram usados os extratos de geoprópolis, sendo diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% e homogeneizados em agitador de tubo por 5 minutos. Para a realização dos testes microbiológicos foram utilizadas as soluções estoque de geoprópolis da Jataí, Manduri e Mandaçaia (30mg/mL), e a partir destas, foram feitas diluições para se chegar às concentrações usadas em cada poço da microplaca (25-0,74 mg/mL). Além disso, cada extrato foi protegido da umidade, luz e do calor, usando-os somente no momento do ensaio, em ambiente estéril.



### 4.3 Avaliação do potencial antimicrobiano da geoprópolis

#### 4.3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS

Para a realização da pesquisa foram utilizadas cepas de referência (*American Type Culture Collection* - ATCC) dos micro-organismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) que foram mantidas em ágar nutriente, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para os ensaios, todas as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio específico para cada bactéria, para certeza de identificação de espécie. O *E. faecalis* foi semeado em ágar Sangue; *S. aureus* foi semeado em ágar Manitol; *E. coli* em ágar Macconkey e *P. aeruginosa* em ágar Cetrimide. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa para verificação do crescimento, para posterior preparação dos inóculos.

#### 4.3.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar nutriente (HIMEDIA, Índia), ágar manitol (HIMEDIA, Índia), ágar macconkey (HIMEDIA, Índia) e ágar sangue (HIMEDIA, Índia). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

#### 4.3.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* MRSA, *E. coli* ATCC (8739) e *P. aeruginosa* (ATCC 25853). A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição do NCCLS (*National Committee for Laboratory Standards*) de janeiro de 2012. Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo  $1 \times 10^8$  UFC/ml por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo  $1 \times 10^3$  UFC/ml.

#### 4.3.4 TESTE DE MICRODILUIÇÃO

O método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a diluição em caldo, por ser considerado um dos testes mais confiáveis para a determinação da atividade antimicrobiana, quando comparado com as técnicas de difusão em ágar, sendo escolhida o ensaio de microdiluição em placas de 96 poços (ALVES et al., 2008). Esse ensaio seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição do NCCLS (*National Committee for Laboratory Standards*) de janeiro de 2012.

Para os testes antimicrobianos, os extratos foram padronizados com solvente DMSO 20%. Em seguida, os extratos foram colocados em tubos de plásticos, e 100µL de cada concentração foi adicionada em poços das microplacas juntamente com 100µL de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^3$  UFC/mL), obtendo as seguintes concentrações por poço: 25 – 0,79 mg/ml. Cada ensaio foi realizado em triplicata para cada

concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 20% (solvente) e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg). Ao final deste processo a microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas (Figura 8).

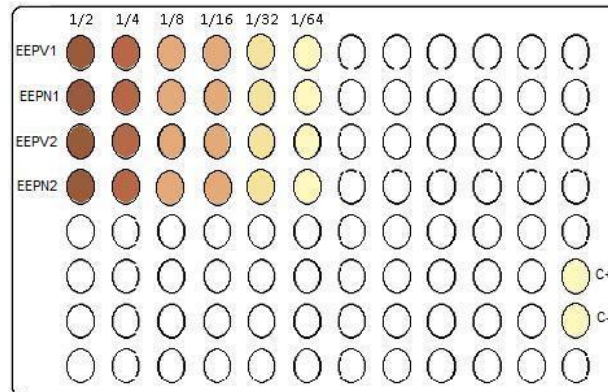


Figura 8 – Esquema de distribuição das concentrações dos extratos na microplaca, incluindo os controles positivo e negativo. Fonte: Autor.

#### 4.3.4.1 Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade, sendo esse um parâmetro para avaliar a potência *in vitro* da amostra testada (MENDES, 1997; CLSI, 2009).

A CIM foi estipulada a partir da menor concentração dos extratos de geoprópolis capazes de impedir o crescimento de pelo menos 50% do micro-organismo avaliado (efeito bacteriostático). Para a obtenção de CIM foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al. 2012). A resazurina é um corante com ótima solubilização em água e apresenta uma coloração azul, utilizado como referência em testes para verificar a viabilidade de células, na presença destas, sofre uma redução, sendo transformada em resorufina e mostrando uma coloração rosa, como pode ser

observado na figura 9 (MONTEJANO et al. 2005; ALVES et al. 2008). Sendo assim, fica estabelecido que o valor da CIM foi definido como a menor concentração encontrada que impediu a mudança de cor, total ou parcial, do meio na microplaca analisada (MALACARNE, 2010; MONTEIRO et al. 2012).

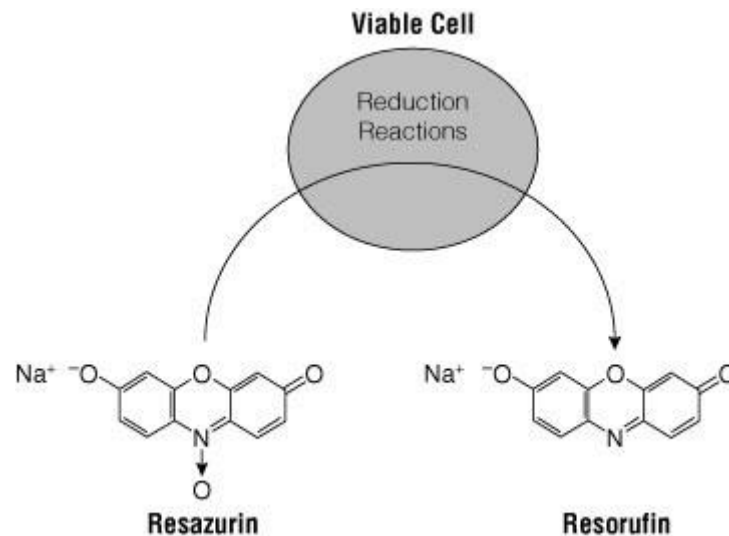


Figura 9: Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis.

Para isso, após o término do tempo de incubação anterior, 15µL de resazurina a 0,01% foram acrescentados em cada poço, para identificação da CIM (figura 10). Um período de 3 horas foi necessário para a reação com a resazurina e então se partiu para a interpretação dos resultados.

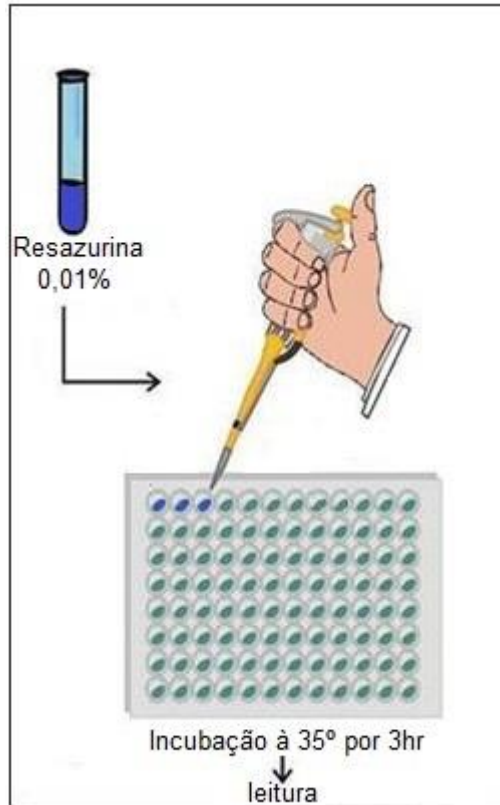


Figura 10: Esquemática da metodologia usada para a determinação da CIM.

#### 4.3.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos micro-organismos testados. A CBM foi obtida a partir da técnica de contagem das UFC, sendo considerada a menor concentração do extrato que resultou em nenhum crescimento ou no crescimento de no máximo três colônias por placas, conforme relatado por Quadros et al. (2011).

Esta metodologia foi realizada após a técnica de microdiluição em microplacas, no qual se obteve o CIM, conforme descrito acima. Para a obtenção do CBM, 10µL de cada poço contendo diferentes inóculos bacterianos e extratos de própolis foram semeados em placas de petri contendo Ágar Muller Hinton (AMH), em seguida incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e obtenção da concentração capaz de matar pelo menos 99 a 100% dos micro-organismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias

gram-positivas na concentração de 250 µg/ml, já para bactérias gram-negativas, penicilina-estreptolisina foi o antibiótico de escolha para controle de positivo, na concentração 10000unit/10mg.

#### 4.4 Determinação do teor de compostos fenólicos

As determinações do teor de compostos fenólicos dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGP) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do Departamento de Química (DEQ) da Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO), conforme as descrições abaixo:

##### 4.4.1 CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

O ácido gálico foi diluído em metanol nas concentrações de 1 à 7 µg/mL, em balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se 500µl do reagente de *Folin-Ciocalteu*, 6 mL de água destilada, esperou-se 1 min; em seguida, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio à 10% (m/V) e a solução foi agitada por 30 segundos. Completou-se o volume com água destilada.

A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra. As soluções permaneceram em repouso por 2 h, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 760 nm (SOUSA et al. 2007). Cada ponto da curva correspondeu à média de três determinações.

##### 4.4.2 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS NA AMOSTRA

O extrato seco foi ressuspendido em metanol na concentração de 100 mg/mL, a partir deste foi feito uma solução à 1 mg/mL em balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se 100 µL de extrato, 500µl do reagente de *Folin-Ciocalteu* e 6 mL de água

destilada, esperou-se 1 min; em seguida, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio à 10% (m/V) e a solução foi agitada por 30 seg e completou-se o volume com água destilada.

A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra. As soluções permaneceram em repouso por 2 h, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 760 nm (SOUSA et al. 2007). O resultado corresponde à média de três determinações. Ele foi comparado com o teor de substâncias fenólicas estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

#### **4.5 Determinação do teor de flavonóides totais**

As determinações do teor de flavonóides totais dos extratos etanólicos de geoprópolis (EEGP) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do Departamento de Química (DEQ) da Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO), conforme as descrições abaixo:

##### **4.5.1 CURVA PADRÃO DE QUERCETINA COM CLORETO DE ALUMÍNIO**

A quercetina foi diluída em metanol nas concentrações de 2,5 à 8,5 µg/mL, em balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio à 2,5% (m/V). A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra. As soluções permaneceram em repouso por 30 min, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm (FUNARI & FERRO, 2006). O resultado corresponde à média de três determinações. Ele foi comparado com o teor de flavonóides totais estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

#### 4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NA AMOSTRA

O extrato seco foi ressuspendido em metanol na concentração de 2 mg/mL. Em balão de 25 mL adicionou-se 2 mL desta amostra, 1 mL de solução de cloreto de alumínio à 2,5% (m/V) e completou-se o volume com metanol. A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra. As soluções permaneceram em repouso por 30 min, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm (FUNARI & FERRO, 2006). Os valores de absorbâncias obtidos corresponderam à média de três determinações.

#### 4.6 Determinação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Segue-se o método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração.

Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), produzindo diretamente o radical cátion  $ABTS^{*+}$ , cromóforo de coloração verde/azul, com absorbância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação.

Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo. Assim, extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion  $ABTS^{*+}$  é determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições.



Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mmol/L) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra que se pretende estudar, padrão de medida este denominado *trolox equivalente antioxidant capacity* (TEAC). Os testes foram realizados em duplicata utilizando-se solvente etanol/água 50% e 90%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antimicrobiana

#### 5.1.2 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

➤ *Enterococcus faecalis*

A figura 11 mostra os valores de CIM e CBM dos extratos de geoprópolis das três abelhas frente a espécie *E. faecalis*. Houve uma excelente atividade da abelha Manduri, com valor de CIM e CBM de 0,45 mg/ml. A espécie Mandaçaia apresentou boa atividade antimicrobiana (CIM e CBM de 1,53 mg/ml), seguido por Jataí (CIM de 2,99 mg/ml e CBM de 5,98 mg/ml).

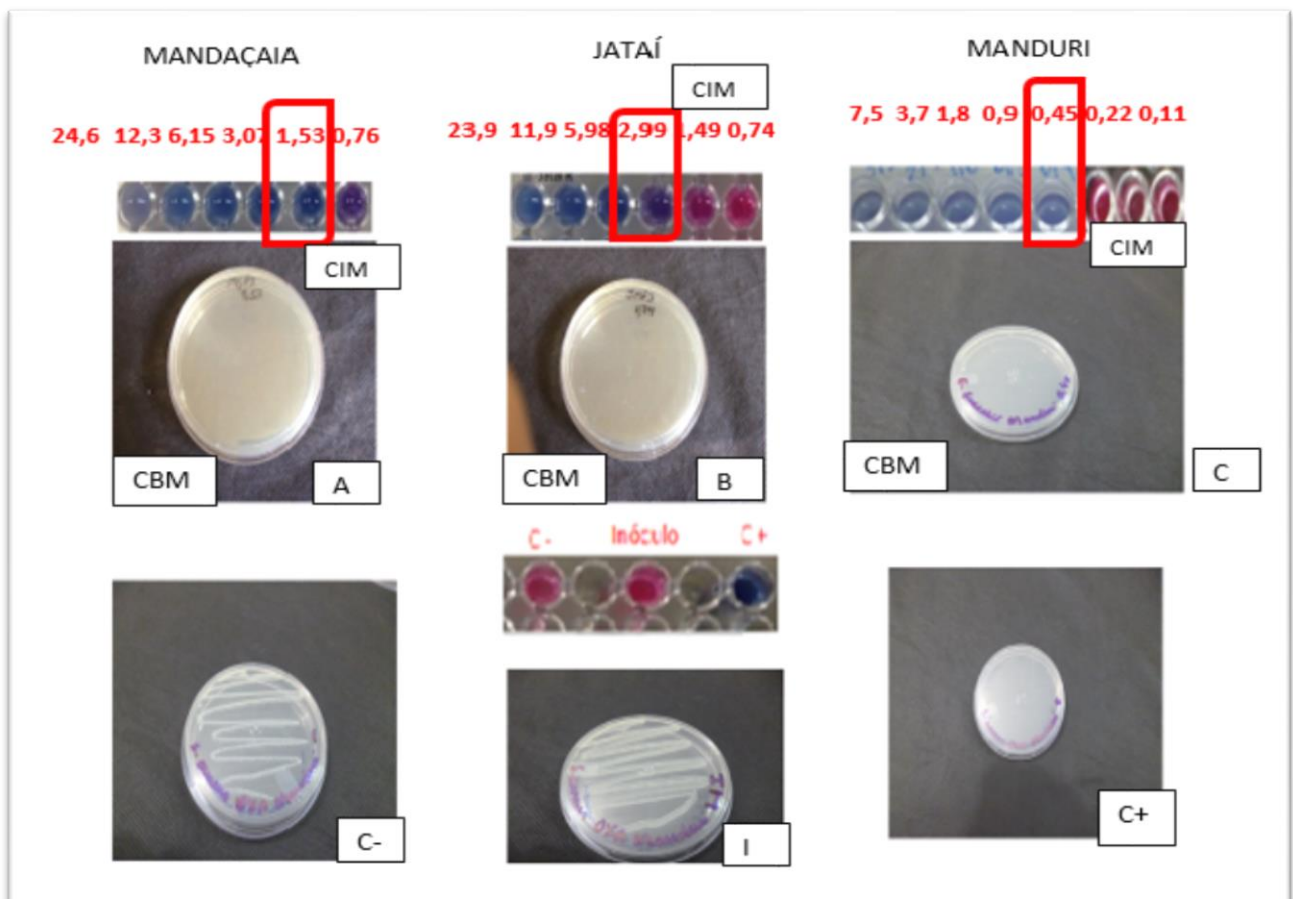


Figura 11 – Valores da CIM obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. faecalis*. Os valores estão expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , onde (A) representa o valor de CIM para Mandaçaia, (B) representa o valor de CIM para Jataí e (C) representa o valor de CIM para Manduri, (C-) representa o controle negativo, (I) representa o Inóculo e (C+) representa o controle positivo.

➤ *Staphylococcus aureus* MRSA

A figura 12 mostra que todos os extratos de geoprópolis apresentaram excelente atividade antibacteriana contra *S. aureus* MRSA, com destaque para a abelha Manduri que apresentou valor de CIM e CBM de 0,22 mg/ml, seguida por Jataí (CIM de 1,8 mg/ml e CBM de 7,5 mg/ml) e Mandaçaia (CIM de 3,7 mg/ml e CBM de 3,7 mg/ml).

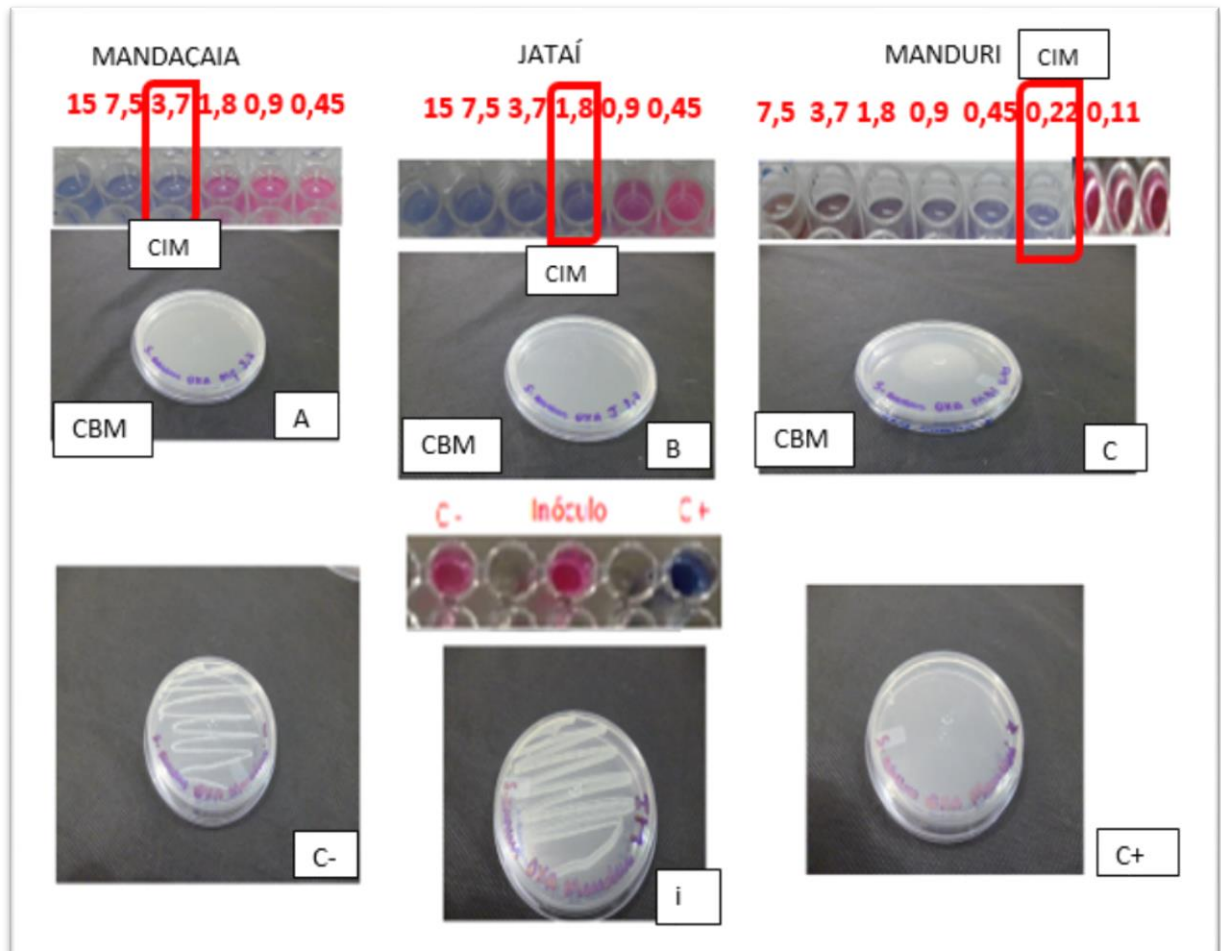


Figura 12 – Valores da CIM obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus* MRSA. Os valores estão expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , onde (A) representa o valor de CIM para Mandaçaia, (B) representa o valor de CIM para Jataí e (C) representa o valor de CIM para Manduri, (C-) representa o controle negativo, (I) representa o Inóculo e (C+) representa o controle positivo.

➤ *Staphylococcus aureus* ATCC

A figura 13 mostra que o extrato de geoprópolis da abelha Manduri apresentou excelente atividade antibacteriana contra *S. aureus* (cepa ATCC) com valor de CIM de 0,93 mg/ml e CBM de 1,87 mg/ml. No entanto, os extratos de geoprópolis das abelhas Mandaçaia e Jataí (CIM de 3,7 mg/ml e CBM de 7,5 mg/ml) mostraram uma atividade moderada frente a esta espécie de bactéria.

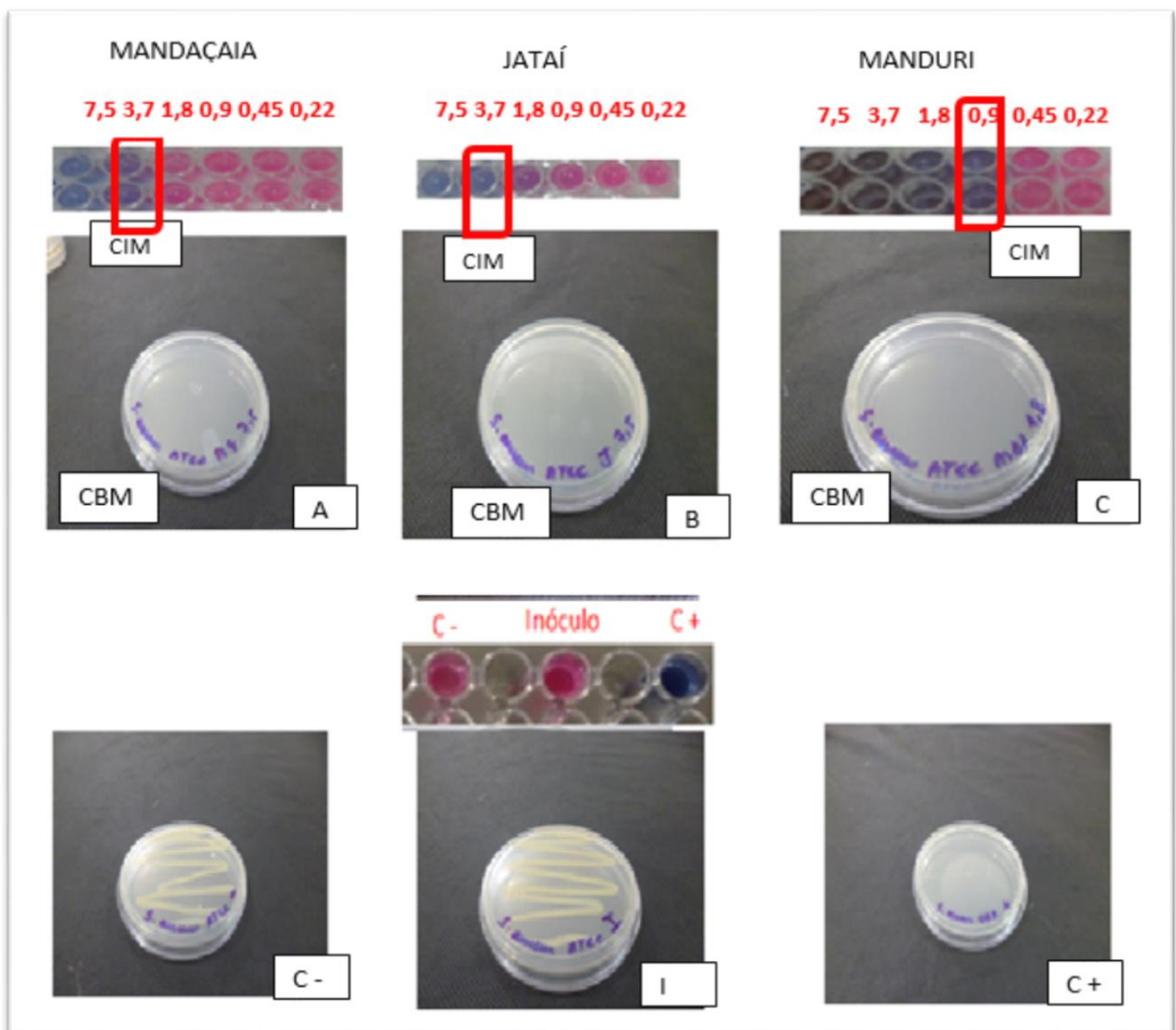


Figura 13 – Valores da CIM obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus* ATCC. Os valores estão expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , onde (A) representa o valor de CIM para Mandaçaia, (B) representa o valor de CIM para Jataí e (C) representa o valor de CIM para Manduri, (C-) representa o controle negativo, (I) representa o Inóculo e (C+) representa o controle positivo.

### 5.1.3 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

#### ➤ *Escherichia coli*

A amostra de Mandaçaia foi a única que apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* com valor de CIM de (15 mg/ml); as demais amostras de geoprópolis apresentaram valores de CIM superiores a 15 mg/ml. Os valores de CBM são superiores a 15 mg/ml nas amostras de Mandaçaia, Jataí e Manduri.

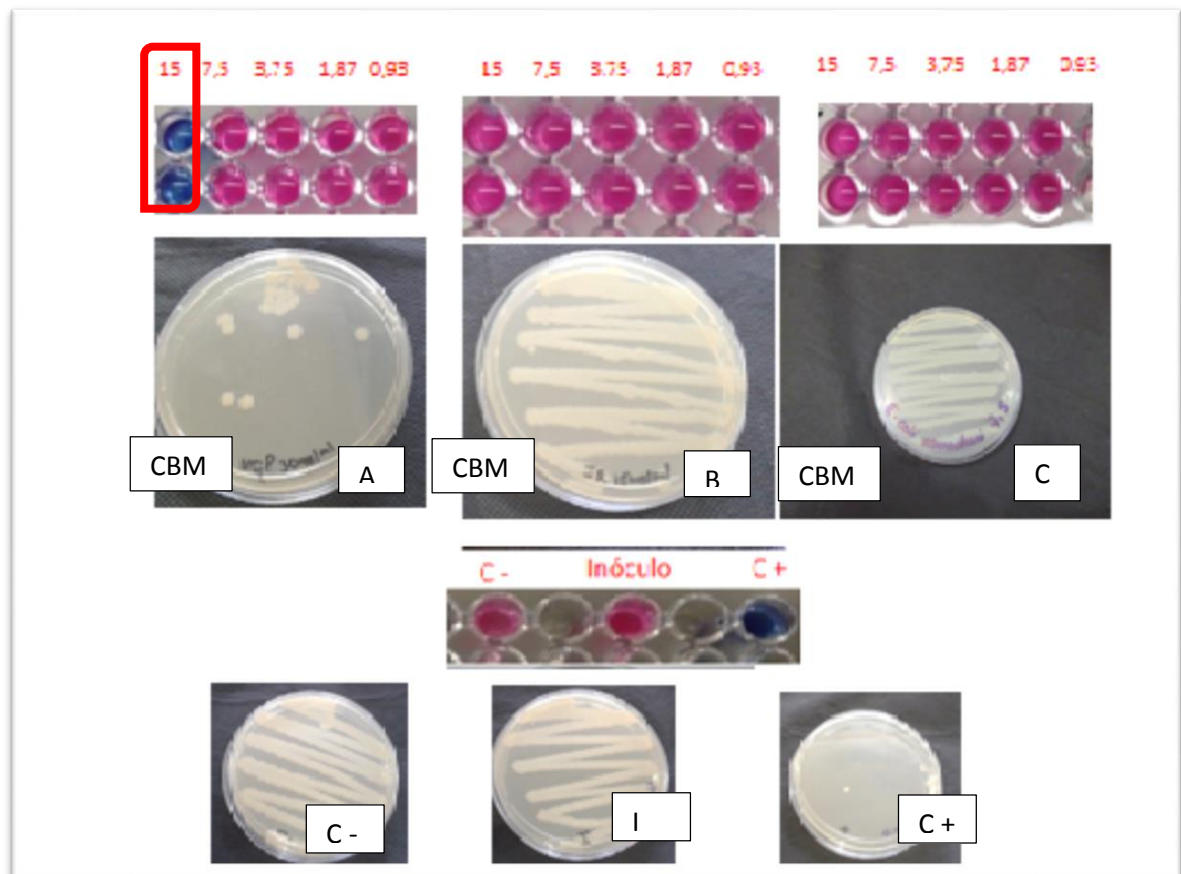


Figura 14 – Valores da CIM obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. coli*. Os valores estão expressos em µg/ml, onde (A) representa o valor de CIM para Mandaçaia, (B) representa o valor de CIM para Jataí e (C) representa o valor de CIM para Manduri, (C-) representa o controle negativo, (I) representa o Inóculo e (C+) representa o controle positivo.

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Assim como os resultados encontrados na determinação do CIM frente a *E. coli*, a única amostra que apresentou sensibilidade contra *P. aeruginosa* foi a de Mandaçaia (15 mg/ml). As demais amostras apresentaram valores de CIM superiores a 15 mg/ml.

Os valores de CBM são semelhantes aos do CIM, ou seja, para a amostra de Mandaçaia (15 mg/ml), Jataí (> 15 mg/ml) e Manduri (> 15 mg/ml).

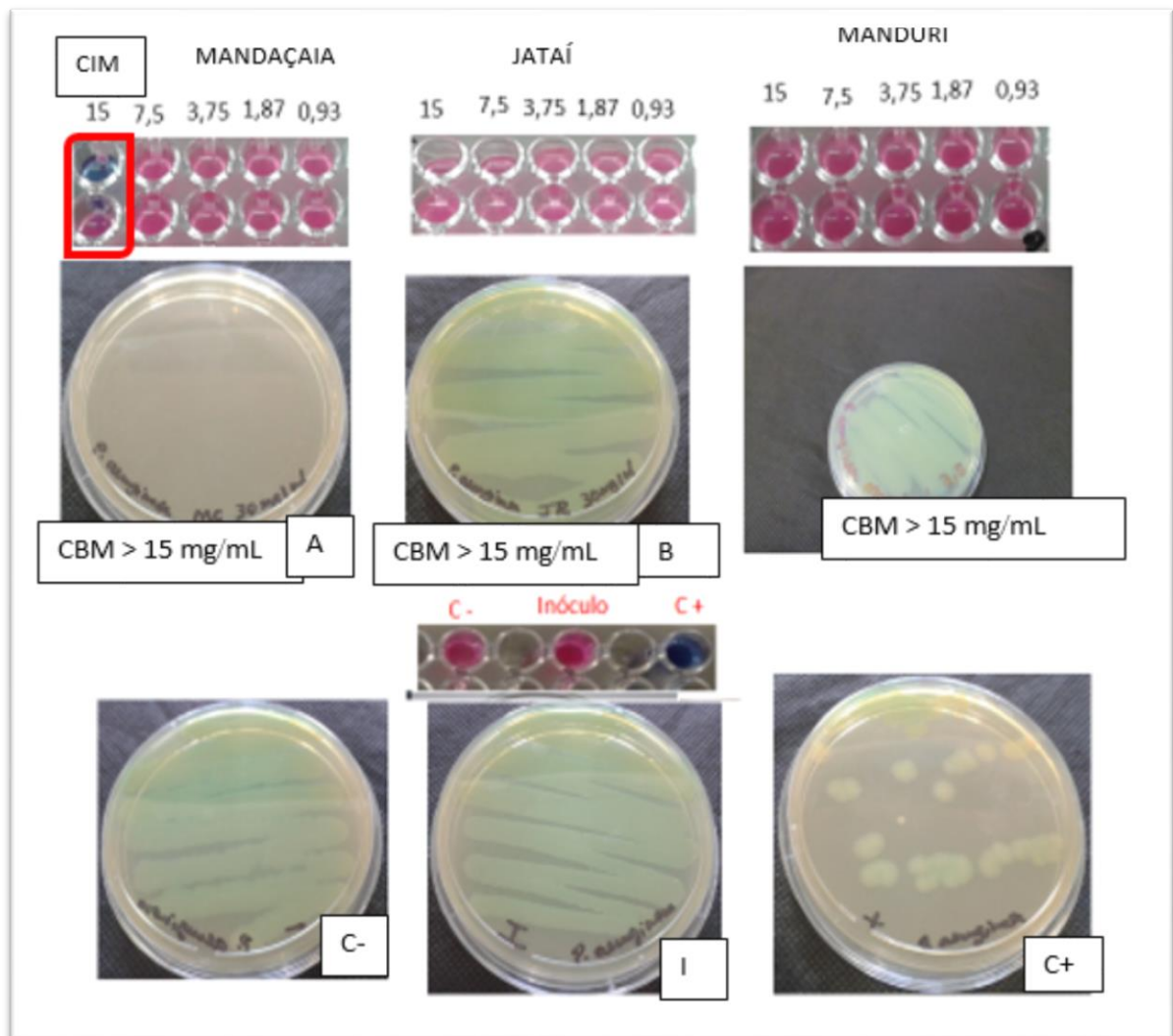


Figura 15 – Valores da CIM obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *P. aeruginosa*. Os valores estão expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , onde (A) representa o valor de CIM para Mandaçaia, (B) representa o valor de CIM para Jataí e (C) representa o valor de CIM para Manduri, (C-) representa o controle negativo, (I) representa o Inóculo e (C+) representa o controle positivo.

A tabela 2 mostra um resumo das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras de geoprópolis das abelhas Mandaçaia, Jataí e Manduri.

Tabela 2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de geoprópolis.

Bactéria - CIM e CBM (mg/mL)										
Extrato de geoprópolis	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC		Methicilin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<b>Manduri</b>	0,93	1,87	0,22	0,22	0,45	0,45	> 15	> 15	> 15	> 15
<b>Mandaçaia</b>	3,75	7,50	3,75	3,75	1,53	1,53	15	15	15	>15
<b>Jataí</b>	3,75	7,50	1,87	3,75	2,99	5,98	> 15	> 15	> 15	> 15

## 5.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

A Figura 16 mostra os percentuais de compostos fenólicos totais presentes na geoprópolis das abelhas Manduri, Mandaçaia e Jataí. Os resultados demonstraram que na geoprópolis produzida pela abelha Manduri foram encontrados elevados níveis de teor fenólicos (29%), enquanto na geoprópolis das abelhas Mandaçaia e Jataí foram detectados baixos níveis destes compostos (1,1 e 0,2%, respectivamente).

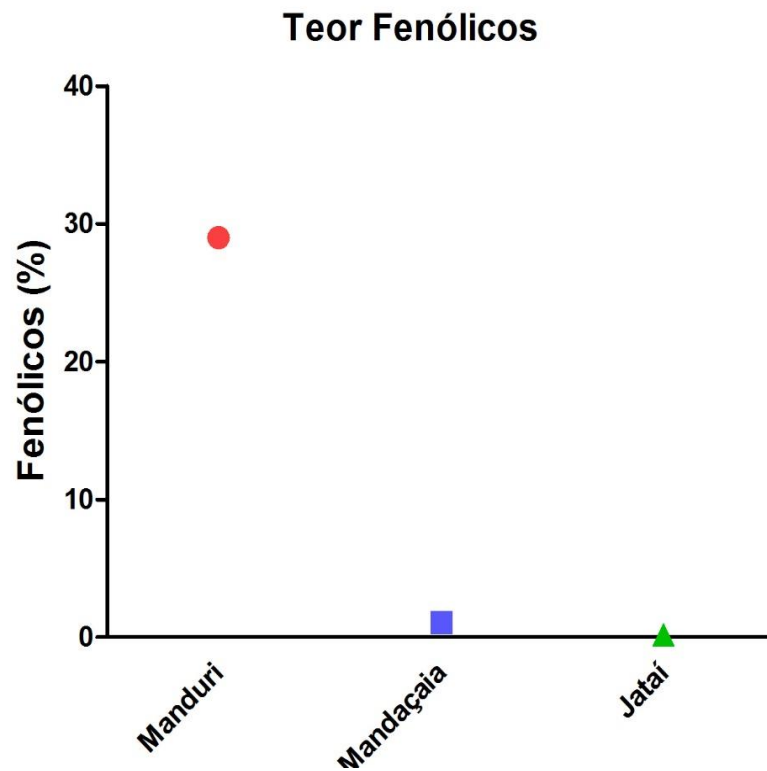


Figura 16 – Determinação do teor de compostos fenólicos totais (%) dos extratos etanólicos de geoprópolis.

### 5.3 Quantificação de flavonóides

A determinação do teor de flavonóides presentes nas amostras de geoprópolis foi mostrada na figura 17, verificando-se que a geoprópolis produzida pela espécie Manduri também foi a que apresentou maiores níveis de teor de flavonóides (0,7%), seguida por Mandagaia (0,2%). Por outro lado, a geoprópolis produzida pela Jataí não apresentou níveis detectados deste composto através da metodologia de complexação com alumínio.



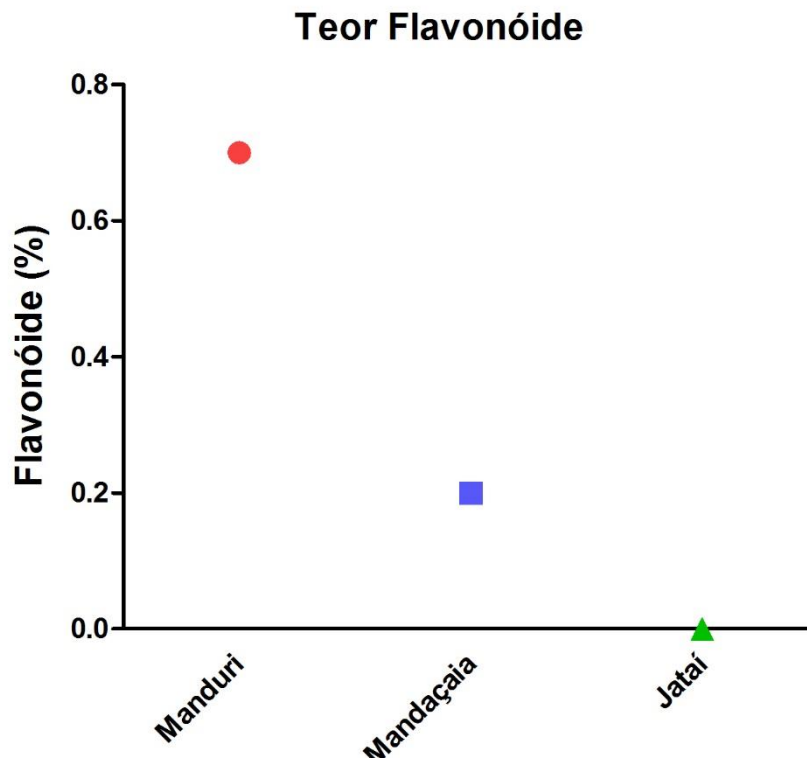


Figura 17 – Determinação do teor de flavonóides totais (%) dos extratos etanólicos de geoprópolis.

#### 5.4 Atividade antioxidante total

Na análise da capacidade antioxidante total dos extratos etanólicos de geoprópolis à 50 e 90% (figura 18), observou-se que os extratos de geoprópolis proveniente da abelha Manduri apresentaram níveis elevados da capacidade antioxidante total (2,7 e 2,75 mmol/L, respectivamente). Enquanto que nas amostras das outras duas espécies foram detectados baixos níveis de antioxidantes (Mandaçaia= 0,31 e 0,20 mmol/L e Jataí = 0,24 e 0,21 mmol/L para os extratos 50 e 90%, respectivamente).

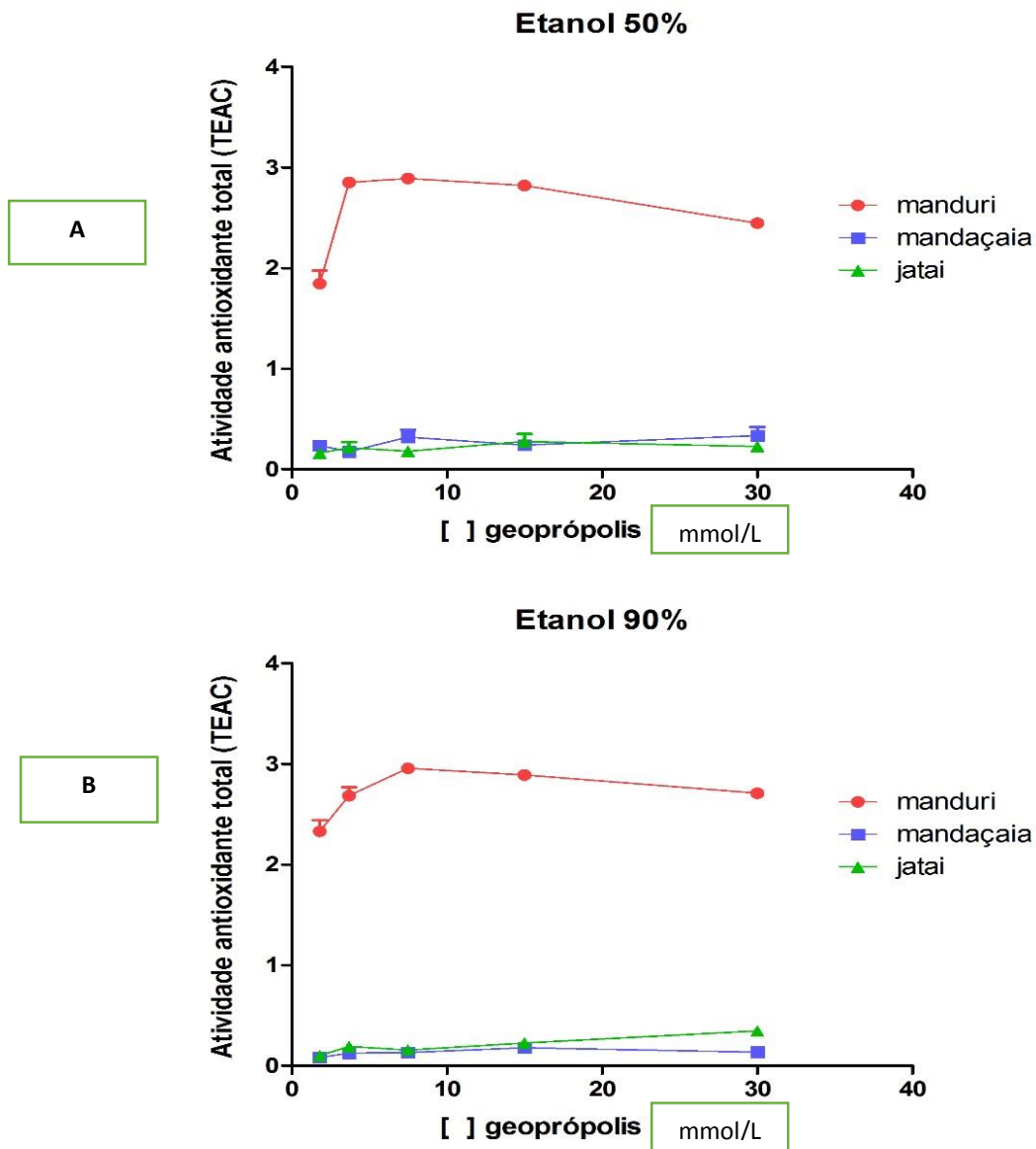


Figura 18 – Correlação da atividade antioxidante total com diferentes concentrações dos extratos etanólicos de geoprópolis à 50% (A) e à 90% (B).

O quadro 3, resume os valores do rendimento dos extratos de geoprópolis, teor de compostos fenólicos e flavonóides, e atividade antioxidante total (TEAC).

<b>Amostra</b>	<b>Rendimento Extração (%)</b>	<b>Fenólicos (%)</b>	<b>Flavonóides (%)</b>	<b>TEAC (mmol/L) Etanol 50%</b>	<b>TEAC (mmol/L) Etanol 90%</b>
Jataí	80	0,20 ± 0,009	0,0 ± 0,001	0,24	0,21
Mandaçaia	60	1,10 ± 0,04	0,2 ± 0,004	0,31	0,20
Manduri	07	29,0 ± 0,057	0,7 ± 0,047	2,60	2,75

Quadro 3 - Rendimento dos extratos de geoprópolis, teor de compostos fenólicos e flavonóides, e atividade antioxidante total (TEAC).

## 6 DISCUSSÃO

Para a manutenção da vida nas colmeias das abelhas, a atividade antimicrobiana da própolis e da geoprópolis apresenta papel fundamental, sendo esta devida a efeitos sinérgicos entre os seus diversos componentes químicos, como o teor de flavonóides, de ácidos fenólicos e derivados (BANKOVA et al. 1995; MARCUCCI, 1995; SFORCIN & ORSI, 2005).

Com relação a atividade antimicrobiana, nossos dados mostraram que a geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão apresentaram atividade antimicrobiana similar aos estudos encontrados na literatura com os extratos etanólicos de própolis da abelha *Apis mellifera*, os quais relatam uma excelente ação antimicrobiana da própolis frente as bactérias gram-positivas e moderada inibição contra bactérias gram-negativas (MENEZES, 2005; UZEL et al. 2005).

Nesse sentido, Velikova et al. (2000) investigaram a composição química e a atividade antibacteriana de própolis oriundo de abelhas brasileiras, incluindo *T. angustula*, *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata*. Segundo eles, os compostos majoritários encontrados foram os derivados do ácido benzóico, principalmente o ácido gálico, além de diterpenos e triterpenos. Esses extratos foram ativos contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*, porém não elucidam o mecanismo de ação antimicrobiana. Além da própolis, alguns autores relataram a atividade antimicrobiana do mel produzido por esta espécie de abelha (MIORIN et al. 2003; TORRES et al. 2004).

O mecanismo de ação antimicrobiana da própolis é complexa e é atribuída ao sinergismo entre os compostos fenólicos e outros componentes presentes na resina (BURDOCK, 1998) e alguns autores sugerem que esses componentes provocam danos na membrana citoplasmática da bactéria, causando assim um aumento na permeabilidade, refletindo na concentração de potássio intracelular (BANKSOTA, TEZUKA & KADOTA, 2001; MIRZOEVA, GRISHANIN & CALDER, 1997; CUSHNIE et al. 2007).

Essa diferença de ação antimicrobiana se deve a diferente constituição da parede celular entre as bactérias gram-negativas e gram-positivas, já que uma das hipóteses sobre a ação dos flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na própolis seja diretamente na estrutura da parede celular bacteriana (VARGAS et al.

2004). Embora a parede celular das bactérias gram-negativas ser menos rígida que as gram-positivas, devido a menor espessura da sua camada de peptidoglicanos, no entanto, a parede celular das gram-negativas são mais complexas quimicamente (presença de lipopolissacarídeo e lipídeos) (VARGAS et al. 2004).

Outros estudos também relatam outros mecanismos de ação da própolis, como Mirzoeva et al. (1997) que mostram que alguns componentes da própolis alteram a permeabilidade da membrana bacteriana levando a uma diminuição no potencial de membrana devido ao gradiente eletroquímico de prótons através da membrana. Esse mecanismo é essencial para a manutenção da síntese de ATP, do transporte de membrana e para a motilidade bacteriana. Já Cushnie & Lamb (2005) comprovaram que um importante componente químico da própolis, a Galangina, pode induzir a depleção de potássio causando danos na membrana citoplasmática, como o enfraquecimento da parede celular ou a inibição de sua síntese resultando em lise celular.

Interessantemente, em nosso estudo os valores de CIM encontrados para a espécie *S. aureus* (ATCC) dos extratos de geoprópolis das abelhas Manduri e Jataí foi maior do que aquele encontrado para o *S. aureus* MRSA. Ou seja, estes extratos apresentaram maior inibição frente à cepa meticilina resistente do que frente à cepa ATCC. Entretanto, tal resultado também foi encontrado por outros autores (ALCARÁZ et al. 2000; ADELMAN, 2005).

A ação antibacteriana frente ao *S. aureus* MRSA provocada pelos flavonóides é dependente de suas estruturas moleculares, colocando as chalconas como mais efetivas quando comparadas às estruturas das flavonas e flavanonas, já que a região carbonílica da molécula está relacionada a maior atividade anti-MRSA dos flavonóides (ALCARÁZ et al. 2000). Por isso, as diferenças quanti e qualitativas na composição de flavonóides das amostras de geoprópolis podem justificar a excelente ação dos extratos provenientes das abelhas sem ferrão frente a cepa *S. aureus* MRSA.

Em relação a quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides presentes nas geoprópolis, os resultados mostraram que os teores oriundos da abelha Manduri apresentou maiores níveis destes compostos, enquanto as geoprópolis das outras abelhas apresentaram níveis baixos (Mandaçaia) ou não foram detectados (abelha Jataí) tais compostos. De acordo com o Ministério da Agricultura, o valor mínimo exigido para compostos fenólicos em extratos de própolis é de 0,50% (m/m) e 0,25%

para compostos flavonóides (BRASIL, 2001), caracterizando que apenas o extrato proveniente da abelha Jataí estava em desconformidade com a legislação.

Esta variação no teor de compostos fenólicos e flavonóides entre as diferentes própolis já foi evidenciada por outros autores, como Righi et al. (2013) que avaliaram a constituição química de diversos extratos de própolis provenientes de diferentes estados brasileiros e relataram uma constante variação na presença de compostos fenólicos nesses extratos de 0,9% a 27,3%. Dutra (2006) analisou o conteúdo fenólico e de flavonóide de geoprópolis produzidas no Maranhão e obteve resultados entre 1,7% a 31,8% para compostos fenólicos e de 0,17 a 6,0 % para flavonóides. Já Cunha et al. (2009) relataram que os valores de flavonóides e polifenóis totais nos extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* provenientes do mesmo Estado ficaram entre 0,85% a 1,85% e 7,36% a 37,04%, respectivamente.

Esta variação no teor de compostos fenólicos e flavonóides nos diferentes estudos pode ser devido a diferença na época e tempo de coleta da própolis, na vegetação ou no tipo de solo coletado pelas abelhas, uma vez que o método de extração e o solvente extrator utilizado nesse estudo foi o mesmo. Nesse sentido, Cunha et al. (2004) realizaram a avaliação do rendimento dos extratos de própolis frente ao teor de polifenóis variando as soluções extrativas e os métodos de extração. Estes autores observaram que apesar da extração com etanol absoluto proporcionar maior rendimento do teor de sólidos, as soluções etanólicas entre 60 e 80% (V/V) levam a um melhor rendimento no teor de substâncias fenólicas. Em outro estudo, Park et al. (1998) avaliaram o rendimento da própolis verde e concluiu que a solução etanólica a 80% (V/V) é a melhor para extração.

Além disso, Borges & Blochtein (2005) observaram que existe uma diferença nas atividades externas de espécies de abelhas sem ferrão de acordo com as estações do ano, como a atividade de voo e de polinização, o que pode interferir na expressão de metabólicos secundários ativos em resinas, como a geoprópolis, e no mel, bem como na atividade biológica. Isso pode explicar as diferenças nos teores de substâncias fenólicas entre os três extratos analisados, já que os mesmos foram coletados em épocas distintas. Além disso, Park et al. (1998) e Koo & Park (1997) relataram que a ecologia vegetal do local onde a geoprópolis foi coletada e a variabilidade genética das abelhas rainhas podem interferir na composição química desta resina. Stock et al. (2010) afirmaram que o teor de compostos fenólicos é maior nas amostras que apresentam menor tempo de maturação.

Em relação aos constituintes fenólicos, poucos estudos são realizados com a geoprópolis, como os realizados por Miorin et al. (2003) que identificaram componentes da geoprópolis produzida de *T. angustula* (Jataí) que pudessem estar associados a atividade antimicrobiana, tais como: 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenoico, e um derivado do ácido cinâmico. Além disso, recentemente, Maia et al. (2014) avaliaram por espectrometria de massas, os constituintes presentes na geoprópolis coletada em Prudentópolis e relataram os seguintes compostos fenólicos: ácido 3,4-diidroxil-5-prenil-cinâmico; diidrocampferide; ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinamoil oxil)-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil}-2-propenoico; isosakuranetina; ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, também conhecido como artemillina C, e campferide.

Por outro lado, Bankova et al. (1998) relataram diferenças na composição química da geoprópolis das abelhas sem ferrão da América do Sul, já que foram encontradas alguns compostos químicos, como aldeídos e alguns tipos de flavonóides, que eram presentes em *Melipona sp.* e ausentes em *Tetragonisca sp.*

Uma das principais propriedades atribuídas aos diferentes tipos de própolis e seus compostos fenólicos é a sua capacidade antioxidante, visto que podem eliminar radicais livres (BANSKOTA et al. 1998; CHOI et al. 2006; CABRAL et al., 2009). Em nosso estudo, a atividade antioxidante do extrato da abelha Manduri também foi a que apresentou melhor atividade (2,60 a 2,75 mmol/L), fato que pode ser explicado pelo alto teor de compostos fenólicos e flavonóides encontrados na amostra (MOREIRA et al. 2008). Já os demais extratos apresentaram baixas atividades antioxidantes devido ao baixo teor de polifenóis.

O conteúdo fenólico total está relacionado diretamente com a atividade antioxidante, visto que tais compostos têm sido extensivamente identificados como os antioxidantes mais abundantes e efetivos nas amostras de própolis brasileiras (BANSKOTA et al. 1998; APAK et al. 2007; CABRAL et al. 2009). No entanto, o sinergismo de componentes fenólicos com outros compostos químicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana da própolis e geoprópolis (BANKOVA, 2005). Sendo assim, ao correlacionarmos a ação antimicrobiana destes extratos com o teor de substâncias fenólicas, incluindo os flavonóides, nota-se uma boa ação antimicrobiana dos três extratos de geoprópolis frente as bactérias gram-positivas, incluindo o *S. aureus* MRSA. No entanto, a espécie Manduri quando comparada as

outras abelhas, alcançou valores de CIM bem menores frente as bactérias gram-positivas. Pode-se, então, sugerir que os altos valores de substâncias fenólicas presentes no extrato de geoprópolis da Manduri podem estar associados a maior eficácia deste extrato frente a estas bactérias.

Entretanto, a espécie Jataí apresentou valores abaixo do preconizado pelo Ministério da Agricultura para a presença de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, e ainda assim mostrou boa atividade antimicrobiana frente às cepas gram-positivas. Desta forma, pode-se sugerir que o teor dessas substâncias não está relacionado diretamente a ação antimicrobiana do geoprópolis, evidenciando a necessidade de revisão ou inclusão de novos parâmetros para avaliação da qualidade de extratos de geoprópolis das abelhas sem ferrão, visto que a legislação é voltada para os produtos da espécie *Apis mellifera*, e há um crescente aumento da atividade meliponícula no Brasil. Corroborando, Araújo (2009) correlacionou a atividade de diversos extratos de própolis do Brasil com o teor de substâncias fenólicas e também observou que nem sempre a ação antimicrobiana está relacionada à presença ou mesmo a grande quantidade de flavonóides nas amostras de própolis.



## 7 CONCLUSÃO

- Todas as amostras de geoprópolis utilizadas nesse estudo mostraram atividade antimicrobiana frente às bactérias gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA), sendo que a abelha Manduri apresentou menor valor de CIM e CBM;
- A geoprópolis da abelha Mandaçaia foi a que apresentou moderada atividade antimicrobiana frente as bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*);
- A geoprópolis da abelha Manduri foi a que apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonóides, seguido da geoprópolis da abelha mandaçaia, e ambas estavam em conformidade com os parâmetros preconizados da Instrução Normativa nº 3 (2001) do MAPA;
- A geoprópolis da espécie Manduri também apresentou elevados níveis de antioxidante total em relação as demais abelhas.

Com isso, neste estudo foi mostrado que a atividade antimicrobiana dos extratos de geoprópolis não está diretamente associada aos elevados níveis de compostos fenólicos, incluindo flavonóides, visto que mesmo em baixos níveis destes compostos, como o geoprópolis da abelha Jataí, foi observada excelente atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas. Desta forma, há necessidade da criação de normas específicas que comprovem a eficácia do geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão nas atividades biológicas destes extratos que podem estar relacionadas a outros compostos químicos não fenólicos.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADELMAN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. 176f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AHN, M.R., KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., BANG, K.S., NAKAYAMA, T. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7286–7292, 2004.
- ALCARÁZ, L. E., BLANCO, S. E., PUIG, O. N., TOMÁS, F.; FERRETTI, F. H . **Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Journal of Theoretical Biology, v. 205, p. 231-240, 2000.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALECN, P.L.; IKEGAKI, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis.** Journal of Ethnopharmacology. v.113, p.278-283, 2007.
- ALVES, E. G.; **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.** Quim. Nova, Vol. 31, No. 5, p1224-1229, 2008.
- APL. APICULTURA DO SERTÃO. Programa de mobilização para o desenvolvimento dos arranjos e territórios produtivos locais do estado de Alagoas. Alagoas, 200 Disponível em: [http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1247145013.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1247145013.pdf). 7. Acesso em 01/12/2014.
- APAK, R.; GUCLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E.; BEKTASOLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. **Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay.** Molecules 2007, 12, 1496–1547.
- ARAÚJO, Yzila Liziane Farias Maia de. Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco – Brasil. Aracaju, 2009.
- ARTS, M. J. T. J. et al. **A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay.** Food Chemistry, Barking, v. 88, p. 567-570, 2004.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian Propolis.** Zeitschrift Fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences, v. 50c, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, V., MARCUCCI, M.C., SIMOVA, S., NIKOLOVA, N., KUJUMGIEV, A., POPOV, S. **Antibacterial diterpenic acids from Brazilian Propolis.** Zeitschrift Fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences 51c, 277–280, 1996.

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. **Constituents of Brazilian Geopropolis.** *Z. Naturforsch.* 53c,1998.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L., MARCUCCI, M.C. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin.** *Apidologie* 31, 3–15, 2000.
- BANKOVA, Vassya. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** *Journal of Ethnopharmacology.* Bulgaria, v.100, p.114-117, 2005.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSHUIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. **Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities.** *J. Nat. Prod.* 1998.
- BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I.K., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., Message, D., HUERTAS, A.A., KADOTA, S. **Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China.** *Journal of Ethnopharmacology* 72, 239–246, 2000.
- BANKSOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. **Recent progress in pharmacological research of própolis.** *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 7, pp. 561–571, 2001.
- BARTH, O.M. **Pollen analysis of Brazilian Propolis.** *Grana* 37:97-101, 1998.
- BARTH, O.M. **Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil.** *Apiacta* 41:71-85, 2006.
- BARTH, O.M., DUTRA,V.M.L. & JUSTO, R.L. **Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional.** *Ciência Rural* 29:663-667, 1999.
- BARTH, O.M. & LUZ, C.F.P. **Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments.** *Grana* 42:121-127, 2003.
- BARTH, O. M.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. **Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do Rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil.** *Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico*, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 277-290, 2009.
- BARTH, O. M.; FREITAS, A.S.; SOUSA, G. L.; M, L. B. A. **Pollen and physiochemical analysis of Apis and Tetragonisca (APIDAE) honey.** *INERCIÊNCIA.* VOL. 38; Nº 04, 2013.
- BASTOS, E.M.A.F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil.** Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.
- BATALHA-FILHO, H., MELO, G.A.R.; WALDSCHIMDT, A.M., CAMPOS, L.A.O., FERNANDES-SALOMÃO, T.M. **Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae),** *Zoologia* 26, 213–219, 2009.

BORGES, Francine von B.; BLOCHTEIN, Betina. **Atividades externas de *Melipona marginata obscurior* Moure (Hymenoptera, Apidae), em distintas épocas do ano, em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Zoologia, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BREYER, E. U. **Abelhas e saúde.** 3. ed. Santa Catarina: Uniporto, 1983. 80 p.

BURDOCK, G.A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis).** Food and Chemical Toxicology 36, 347–363, 1998.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; DOS SANTOS, J.M.; DA ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F. **Composição química e atividade biológica de extratos oleosos de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico.** Química Nova, São Paulo, v.32, n.2, 2009.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. **Composição fenólica, atividade antimicrobiana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química nova, São Paulo, v.32, n.6, 2009.

CAMARGO J. M. F.; PEDRO, S. R. de M. **Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review.** Apidologie, 23: 509-522, 1992.

CAMARGO J. M. F.; PEDRO, S. R. de M.. Meliponini Lepeletier, 1836, p. 272–578. In: J.S. Moure, D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.** Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, xiv+1058pp, 2007.

CAMARGO, J. M. F.; ROUBIK, D. W. **Neotropical Meliponini: *Paratrigonoides mayri*, new genus and species from western Colombia (Hymenoptera, Apidae, Apinae) and phylogeny of related genera.** Zootaxa, 1081: 33-45, 2005.

CARVALHO, S. M. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, 2006.

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

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** *Journal of Food and Drug Analysis*, Taipei, v.10, p. 178-182, 2002.

CHANG, R.; Piló-Veloso, D.; Morais, A. L.; Nascimento, E.A. **Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and CG-MS.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V.18, n. 4, p.549-556. 2008.

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart – Eighth Edition. CLSI document M07-A8, 2009

Coopernatural. **Abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*), 2007.** Disponível em: <<http://www.coopernatural.com/index.html>>. Acesso em: 23 de outubro de 2014.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T., MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. **Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15, 964–970, 2004.

CUNHA, M. S.; DUTRAS, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DOS SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A.; DO AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Standardization of extracts of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba).** *Cad. Pesq., São Luís*, v. 16, n. 3, ago./dez. 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; HAMILTON, V. E. S.; CHAPMAN, D. G.; TAYLOR, P. W.; LAMB, A. J. **Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin.** *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, no. 5, pp. 1562–1567, 2007.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. **Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss.** *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, no. 1–3, pp. 243–248, 2005.

DAVEY, R.W.; GRANGE, J.M. **Antibacterial properties of propolis (bee glue).** *J. R. Soc. Med.* 83, 159–161, 1990.

DE CASTRO, S.L. **Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product.** *Annual Review of Biomedical Science* 3, 49–83, 2001.

DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B., SHARMA, K., SHAH, S.A., NAQVI, S.A., DANDIYA, P.C. **Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products.** *Journal of Ethnopharmacology* 35, 77–82, 1991.

DOS SANTOS, C.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LUCIO, E.M.R.A.; ARAUJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. **Otimização do processo de**

**extração de propolis através da verificação da atividade antimicrobiana.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Rio de Janeiro, v.13, p.71-74, 2003.

DA SILVA, Dora Lemasson Naves; ZUCCHI, Ronaldo; KERR, Warwick Estevam. **BIOLOGICAL AND BEHAVIOURAL ASPECTS OF THE REPRODUCTION IN SONIE SPECIES OF *MELIPONA* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE).** *Anita. Behav.*, 1972.

DUTRA, Richard Pereira. Características físico-químicas do geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) produzido no estado do Maranhão. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Federal do Maranhão, 2006.

Embrapa Meio-Norte. Sistema de Produção, 3 ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica Jul/2003.

FARNESI A. P. et al. **Effects of stingless bee and honey propolis on four species of bacteria.** *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

FERNANDES, Jr., A., LEOMIL, L., FERNANDES, A.A.H., SFORCIN, J.M. **The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees.** *The Journal of Venomous Animals and Toxins* 7, 173–182, 2001.

FINGER, D. **Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de prudentópolis.** Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2009.

FINGER, Daiane. MACHADO, C. S.; TORRES, Y. R.; QUINAIA, S. P.; THOMAZ, A. C. G.; GOBBO, A. R.; MONTEIRO, M. C.; FERREIRA, A. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. **ANTIFUNGAL BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF AN OIL EXTRACT OF PROPOLIS.** *Journal of Food Quality*, 2013.

FRANCO, S. L; BRUSCH, M. L, MOURA, L. P. P, BUENO, J. H. P. **Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá.** *Rev Bras Farmacog*, n 9, p.1-10, 2000.

FREITAS, S.F., SHINOHARA, L., SFORCIN, J.M., GUIMARÃES, S. ***In vitro* effects of própolis on *Giardia duodenalis* trophozoites.** *Phytomedicine* 13, 170–175, 2006.

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

GARCIA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMAS-BARBERAN, F.A. **Study of Canadian Propolis by GC–MS and HPLC.** *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 48c, 731–735, 1993.

GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review.** *Bee World* 60, 59–84, 1979.

GONÇALVES, L. S. 50 anos de abelhas africanizadas no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 16, Aracajú, 2006.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. **Antibacterial properties of propolis (bee glue).** Journal of the Royal Society of Medicine 83, 159–160, 1990.

GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R. **The analysis of bud exudate of *Populus euramericana*, and of propolis, by gas chromatography–mass spectrometry.** Proceedings of the Royal Society London 232, 249–272, 1987.

HIGASHI, K.O., DE CASTRO, S.L. **Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells.** Journal of Ethnopharmacology 43, 149–155, 1994.

ISDM. Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) /Favízia Freitas de Oliveira, Bárbara Tadzia Trautman Richers, Jacson Rodrigues da Silva, Rinéias Cunha Farias, Tércio Alves de Lima Matos. Tefé: IDSM, 2013.

ITO, J., CHANG, F.R., WANG, H.K., PARK, Y.K., IKEGAKI, M., KILGORE, N., LEE, K.H. **Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis.** Journal of Natural Products 64, 1278–1281, 2001.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPU, G. **Antimicrobial activity of propolis sample from two different regions of Anatolia.** Journal of Ethnopharmacology. v.86, p.69-73, 2003.

KEDZIA, B., GEPPERT, B., IWASZIEWICZ, J.. **Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis.** Phytotherapie 6, 7 – 10, 1990.

KERR, W.E., ALMEIDA, G.A. & NASCIMENTO, V.A. *Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação.* Belo Horizonte: Fundação Acangú, 1996.

KILIC A. et. al. **In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.** *Annals of Microbiology*, v.55, n.2, p.113-117, 2005.

KLEINERT, A.M.P.; RAMALHO, M.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; RIBEIRO, M.F.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. *Abelhas Sociais (Meliponini, Apinini, Bombini).* Em: Panizzi, A.R. & Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos. Base para o manejo integrado de pragas.** Embrapa Informação Tecnológica. Brasília. pp. 371-424, 2009.

KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Aspects of the trophic niche of *Melipona marginata marginata* Lepageletier (Apidae, Meliponinae).** *Apidologie*, Les Ulis Cedex, 18, 1987.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. **Investigation of flavonoids aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region.** *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1997.

KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., PARK, Y.K., IKEGAKI, M., SATTLER, A. **Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats.** Caries Research 33, 393–400, 1999.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** Journal of Ethnopharmacology 64, 235– 240, 1999.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. **Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível.** Agriculturas, v. 2, n. 4, 2005. Disponível em: <<http://www.aspta.org.br/publique/media/artigo1v2n4.pdf>>. Acesso em: 24 outubro de 2014..

LU, Li-Chang; CHEN, Yue-Wen; CHOU, Cheng-Chun. **Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*.** *International Journal of food microbiology*, v.102, p. 213-220, 2005.

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

MAIA, Cristiane S. F.; REIS, Júlia S. S.; OLIVEIRA, Gedeão B.; MONTEIRO, Marta C.; MACHADO, Christiane S.; TORRES, Yohandra R.; PREDIGER, Rui D. **Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats.** *Phytomedicine*, 2014.

MALACARNE, B.; **Ocorrência de *C. tropicalis* no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, estudo de sua suscetibilidade a antifúngicos com propostas de métodos modificados para aprimoramento dos testes *in vitro*.** 123 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

MANARA, F.T. **Milionário abelhas de ouro**, 2013. Disponível em: <<http://abelhadeouro.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 10 de abril de 2015.

MANOLOVA, N., MAXIMOVA, V., GEGOVAa, G., SEKEDJIEVA, Yu., UZUNOV, S., MAREKOV, N., BANKOVA, V. **On the antiinfluenza action of fractions from propolis.** *Comptes rendus de l'Academie bulgare de Sciences* 38, 735–738, 1985.

MARCUCCI, M.C. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity.** *Apidologie* 26, 83–99, 1995.

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

MARCUCCI, M.C., RODRIGUEZ, J., FERRERES, F., BANKOVA, V., GROTO, R., POPOV, S. **Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state.** *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 53c, 117–119, 1998.



MARKHAM, K.E., MITCHEL, K.A., WILKINS, A.L., DALDY, J.A., LU, Y. **HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis.** *Phytochemistry* 42, 205–211, 1996.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VELEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; DOS REIS, R. E. *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul.* Porto Alegre, 2004.

MELLIYOU, E., CHINO, I. **Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis.** *Planta Medica* 70, 515–519, 2004.

MENDES, C. M. F.; **Avaliação da atividade *in vitro* do cefetamet e outros agentes antimicrobianos diante de bactérias isoladas de infecções do trato respiratório.** *Rev. Ass. Med. Brasil*, Vol. 43(1), p47-52. 1997.

MENEZES, H. **Propolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, p. 405-411, 2005.

MICHENER, C.D. **Classification of the Apidae (Hymenoptera).** *The University of Kansas Science Bulletin*. 54(4): 75-164, 1990.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World.** Baltimore: Johns Hopkins University Press, Baltimore, 913pp, 2000.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World.** 2nd ed., Baltimore: Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953pp, 2007.

MILLER, N. J. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** *Clinical Science*, [s. l.], v. 84, p. 407-412, 1993.

MILLER, James S. *The Discovery of Medicines from Plants: A Current Biological Perspective.* JAMES S. *Economic Botany*, 2011.

MIORIN, P. L., JUNIOR, N. C. L., CUSTODIO, A. R., BREZ, W. A., MARCUCCI, M. C. **Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 913–920, 2003.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. **Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria.** *Microbiological Research*, vol. 152, no. 3, pp. 239–246, 1997.

MOHAMMADZADEH, Shiva; SHARIATPANAH, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S.N. **Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis.** *Food Chemistry*. v.103, p.1097-1103, 2007.

MONTEIRO, M. C. et al; **A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin.** Journal of Biomolecular Screening, Vol. 17(4), p542-549, 2012.

MONTEJANO, H.A. et al. **The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents.** Dyes and Pigments. n. 64. p. 117-124, 2005.

MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B.N.; PENA, R. **Pollen grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential drugs in Chilean plants.** Phytion – International Journal of Experimental Botany 66: 15-23, 2000.

MONTENEGRO, G.; PENA, R.; TIMMERMANN, B.N. **Botanical resources for propolis in an apiary network in Central Chile.** Phytion – International Journal of Experimental Botany 50:191-201, 2001.

MORENO, M.I.N, ISLA, M.I.; CUDMANI, N.G.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. **Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis.** Journal of Ethnopharmacology, v. 68, p.97-102, 1999.

MOURE, J.S. *Meliponas* do Brasil. **Chácaras e Quintais**, 74: 609-612, 1946.

MOURE, J.S. **A Preliminary Supra-specific Classification of the Old World Meliponine Bees (Hym., Apoidea).** Studia Entomologica, 4(1- 4): 181-242, 1961.

NAGY, E., PAPAY, V., LITKEI, G., DINYA, Z. **Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method.** Studies in Organic Chemistry (Amsterdam) 23, 223–232, 1986.

NETO, A. F. L.; NETO, A. R. M. **Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura brasileira.** Mensagem doce, São Paulo, v. 84, p 2 -23, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** Journal of Natural Products 70:461– 477, 2007.

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

NUNES, L. A.; PASSOS, G. B.; CARVALHO, C. A. L.; ARAÚJO, E. D. **Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini),** 2013.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Química nova, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., RALL, V.L.M., FUNARI, S.R.C., BARBOSA, L., FERNANDES Jr., A. **Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil.** The Journal of Venomous Animals and Toxins 11, 109–116, 2005.

ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C., FERNANDES Jr., A., BANKOVA, V. **Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi***. Brazilian Journal of Microbiology 37, 108–112, 2006b.

ORSOLIC, N., BASIC, I. **Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP)**. Biomedicine & Pharmacotherapy 59, 561–570, 2005.

PALAZUELOS - BALLIVIAN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão - M'yg**. São Leopoldo, Oikos, 2008.

PARK, Y.K., KOO, M.H., ABREU, J.A.S., IKEHAKI, M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L.. **Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms**. Curr. Microbiol. 36, 24–28, 1998.

PARK, Y.k.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis**, Journal of Agricultural and Food chemistry, v.50, p.2502-2506, 2002.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S; AQUINO NETO, F.R. **Própolis:100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras**. Química Nova. Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

PEREIRA, A.S; B. Bicalho; AQUINO NETO, F.R. **Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula***. Apidologie 34:291-298, 2003.

PHILLIPSON, J. David. **Phytochemistry and medicinal plants**. Phytochemistry, 2001.

PINTO, Luciana de Matos Alves; DO PRADO, Ney Robson Taironi; DE CARVALHO, Lucas Bragança. **PROPRIEDADES, USOS E APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS**. Revista Eletrônica de Farmácia. Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PORTAL BRASIL. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/02/exportacao-de-mel-soma-us-98-milhoes-em-2014>. Acesso em 10/04/2015.

QUADROS, A. U. et al, **Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism**. Folia Microbiol., Vol. 56, 349–352, 2011.

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

RIGHI, A. A.; NEGRI, Jean.; SALATINO, A. **Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.

ROCHA, Jean Samel. **Apicultura**. Niterói : Programa Rio Rural, 2008.

ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 514pp, 1989.

RUFINO M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico On Line, Fortaleza, v. 127, p. 1-4, 2007.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees, pp. 361-423. *In: Social Insects*. H.R. Hermann, ed., vol. III. Academic Press, New York, 1982.

SALATINO, A., TEIXEIRA, E.W., NEGRI, G., MESSAGE, D. **Origin and chemical variation of Brazilian propolis**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2, 33–38, 2005.

SANFORD, M. T. **Apicultura no Brasil: um gigante adormecido desperta**. Parte II. Mensagem Doce. São Paulo, v. 84, p. 24 – 27, nov. 2005.

SANTOS, C. R. et. al. **Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 13, p. 71-74, 2003.

SCAZZOCCCHIO, F.; D'AUREA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis**. Microbiological Research. Roma, v.161, p.327-333, 2006.

SCHMIDT, E. M.; **Análise da composição em compostos fenólicos e mineral da própolis de Prudentópolis: aplicações da análise multivariada**. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2010.

SCHWARZ, H. F. VI- Th e Genus *Melipona*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. 63: 231-460, 1932.

SFORCIN, J.M., FERNANDES Jr., A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity**. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 243–249, 2000.

SFORCIN, J. M.; ORSI. R. O.; BANKOVA, V.; **Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 301-305, 2005.

SILICI, Sibel; KUTLUCA, Semiramis. **Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by tree different races of honeybees in the same region**. *Journal of Ethnopharmacology*. v.99, p.69-73, 2005.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte. Min. Meio Ambiente/Fund. Araraucária. 253p, 2002.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALIA, I. **Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria.** American Journal of Dentistry 9, 236–23, 1996.

STEPANOVIC, S.; ANTIK, N. DAKIC, I., SVABIC-VLAHOVIC, M. **In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs.** Microbiol. Res., v. 158, n.4, p 353-357, 2003.

STOCK, Daniele; SCHMIDT, Eduardo Morgado; TORRES, Yohandra reyes; CAETANO, Isis Kaminski; QUINÁIA, Sueli Pércio. Análise de extratos de própolis com diferentes tempos de maturação. Anais do XIX EAIC UNICENTRO, Guarapuava –PR, 2010.

TERNOSKI, S; KUSMA, M; MACOHON, E.R; KLOSOWSKI, A. L; ANTONELI, V; apicultura e associativismo no município de Prudentópolis. Disponível em: <[http://hosting.udlap.mx/sitios/unionlat.extension/memorias2009/trabajos/movimientos\\_sociales/apicultura\\_e\\_associativismo\\_no\\_municipio\\_de.pdf](http://hosting.udlap.mx/sitios/unionlat.extension/memorias2009/trabajos/movimientos_sociales/apicultura_e_associativismo_no_municipio_de.pdf)> Acesso em Nov. 2014.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; GARCIA-VIGUERA, C., VIT-OLIVIER, P., FERRERES, F., TOMAS-LORENTE, F. **Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela.** Phytochemistry 34, 191–196, 1993.

TORRES, A.; GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. **Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey—a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia.** Thermochim Acta 415:107–113, 2004.

UZEL, A.; SORKUN, H.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. **Chemical compositions and Antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** Microbiological Research, v. 160, p. 189-195, 2005.

VARGAS, A. C. et al; **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis.** Ciência Rural, v. 34, n. 1, p159-163, jan-fev, 2004.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TAVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. **Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae.** Zeitschrift für Naturforschung 55C, 785–789, 2000.

WARAKOMSKA, Z. & MACIEJEWICZ, W. **Microscopic analysis of propolis from Polish regions.** Apidologie 23:277-283, 1992.

WILLE, A. **Phylogeny and relationship among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world.** Revista de Biología Tropical. 27(2): 241-277, 1979.

WITTMANN, D.; BEGO, L. R.; ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S. **Oviposition behavior and related aspects of stingless bees XIV. *Plebeia (Mourella) caerulea*, with comparative notes on the evolution of oviposition patterns (Apidae, Meliponinae).** Japanese Journal of Entomology, 1991.

ZÜGE, V.P. **Abelhas indígenas sem ferrão-meliponário de Züge/imagens, 2013.** Disponível em: <<http://www.meliponario.com.br/userinfo.php?uid=1>>. Acesso em: 10 de abril de 2015.