



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO.**

**Atividades antioxidante, antibacteriana e citotóxica da
geoprópolis de *Melipona mondury*
(Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

TÁSSIA LIZ ARAÚJO DOS SANTOS



**Jequié-BA
2016**



TÁSSIA LIZ ARAÚJO DOS SANTOS

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**Atividades antioxidante, antibacteriana e citotóxica da geoprópolis de
*Melipona mondury***

(Hymenoptera: Apidae: Meliponini)



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador:
Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt

Co-orientador:
Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz
Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula



Jequié-BA

2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo,

Por mais uma das inúmeras promessas cumpridas e por me sustentar com sua forte mão até aqui.

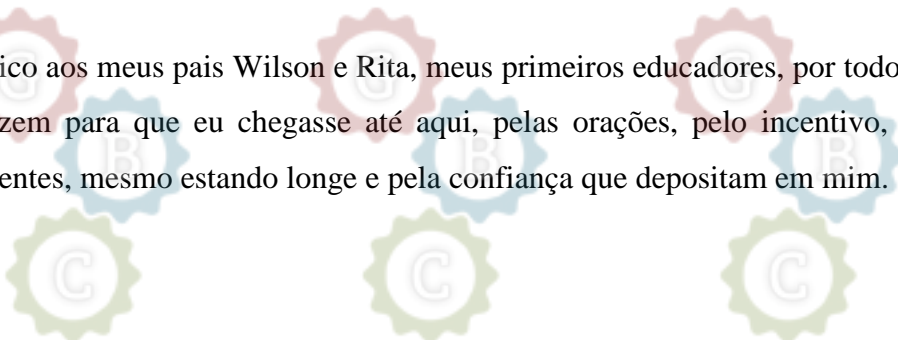
"Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares." Josué 1:9

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dedico aos meus pais Wilson e Rita, meus primeiros educadores, por todo esforço que fizeram e fazem para que eu chegasse até aqui, pelas orações, pelo incentivo, por sempre estarem presentes, mesmo estando longe e pela confiança que depositam em mim.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus! Pela fidelidade e cuidado durante essa caminhada!!!!

Aos meus pais, Wilson Amorim e Rita de Cássia, pelo incentivo, confiança, por serem meu porto seguro. Vocês me fazem querer ir adiante. Amo vocês!!!!

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB pela oportunidade e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro, e dando assim condições para elaborar este trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt, pela orientação, recepção e confiança, pelo total apoio no projeto, pelo seu profissionalismo e sabedoria transmitida.

Ao Prof. Dr. Raphael Queiroz, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, experiência transmitida, disponibilidade, ajuda essencial e incomparável durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa Dra Vanderlúcia pela co-orientação, compartilhamento de seus conhecimentos e por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório.

Ao meu namorado, João Paulo, pelos inúmeros momentos felizes, carinho, companheirismo, pela firmeza necessária e ajuda indispensável.

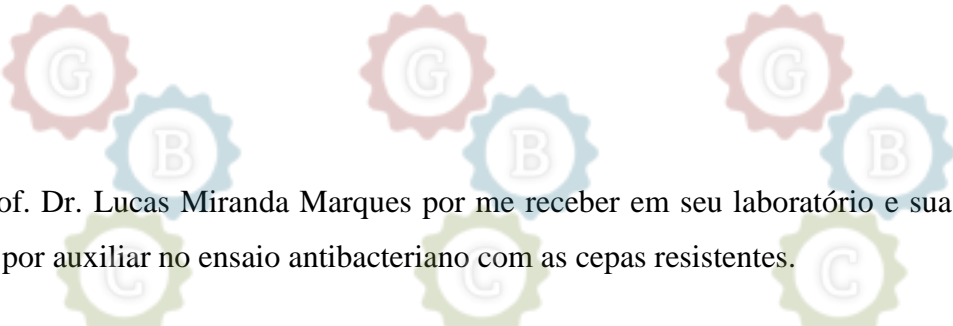
A minha mana, Maiara, e ao meu cunho, Márcio, pelos momentos de descontração, ajuda, incentivo e cuidado.

Aos meus tios de coração, tia Léi e tio Vavá, por me receberem de braços abertos e cuidarem de mim como uma filha, pelos sábios conselhos e exemplo de vida.

Aos abelhudos, colegas do LPN e do Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da UESB, em especial Léia, Joque, Gleiza, Michele, Danielba, Zaline, Adrielle e Lauro, pela ajuda, os bons momentos vividos e pela amizade.

Às queridas Nathália Esther e Denise, por abrirem as portas de suas casas para mim! E alegrando minhas estadias... Obrigada meninas!

A minha pastora Suely Miranda e minhas amadas companheiras da vida, Nara e Roberta, pela intercessão e por sempre estarem prontas para me ajudar em qualquer situação.



Ao Prof. Dr. Lucas Miranda Marques por me receber em seu laboratório e sua aluna Hellen Braga por auxiliar no ensaio antibacteriano com as cepas resistentes.

Ao Prof. Dr. Daniel Bezerra, sua aluna Ana Carolina e à FIOCRUZ por me receberem e ajudarem no ensaio citotóxico.

À Profa Dra Alexandra Sawaya e sua aluna Begoña Gimenez por ajudarem na parte química deste trabalho.

À todos vocês, meu muito obrigada!!! Que Deus os abençoe poderosamente.





RESUMO

A geoprópolis é um tipo especial de própolis produzida pelas abelhas sem ferrão como *Melipona mondury*, que coleta o material resinoso das plantas e o mistura com cera e barro. A geoprópolis de diversas espécies de abelhas possui atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-edematogênica, imunomodulatória, citotóxica e gastroprotetora. Este trabalho descreve o teor de fenólicos, atividade antioxidante e antibacteriana da geoprópolis de *M. mondury*. A concentração de fenólicos foi estimada com reagente de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante dos extratos e frações foi realizada pelos ensaios *in vitro* DPPH, ABTS^{•+}, sistema β-caroteno/ácido linoléico. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método da microdiluição em placa pelo qual foram estimadas a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade (CA-MRSA). A fração butanólica da geoprópolis foi a que apresentou maior concentração de fenólicos ($303,1 \pm 0,1 \mu\text{g EAG}/\text{mg}$ da amostra) e, conseqüentemente, melhores propriedades antioxidantes nos três ensaios (DPPH[•]_{CE50} = $2,23 \pm 0,05$, ABTS^{•+}_{CE50} = $0,87 \pm 0,003$, sistema β-caroteno/ácido linoléico %IO = $78,6 \pm 0,3$). As frações acetato de etila e butanólica atuaram como bacteriostáticas e bactericidas contra as cepas bacterianas testadas. O extrato hidroalcoólico e as frações hexânicas e acetato de etila exibiram potente inibição da proliferação celular nas duas linhagens testadas HL-60 (leucemia promielocítica) e HEPG2 (carcinoma hepatocelular). Com base nas análises químicas realizadas por ESI(-)-MS e UPLC-MS/MS sugere-se a presença de terpenos com grupamentos ácidos e benzofenonas como principais constituintes da geoprópolis. Este é o primeiro estudo realizado com a geoprópolis de *M. mondury* e os resultados indicam que este produto é uma fonte em potencial de moléculas com distintas propriedades farmacológicas.

Palavras-chave: Geoprópolis, *Melipona mondury*, Atividade antioxidante, Atividade antibacteriana, Atividade citotóxica, metabólitos secundários.



ABSTRACT

Geopropolis is a special type of propolis produced by stingless bees like *Melipona mondury*, which collects resinous material of plant and mixes it with wax and clay. The geopropolis of several species of bees has antinociceptive, anti-inflammatory, antiedematogenic, immunomodulatory, cytotoxic and gastroprotective effects. This article describes the phenolic content, antioxidant and antibacterial activity of geopropolis *M. mondury*. The concentration of phenol was estimated by the Folin-Ciocalteu method. The *in vitro* antioxidant activity of extracts and fractions was performed \bullet DPPH, ABTS \bullet^{+} , β -carotene/linoleic acid system. The antibacterial activity was determined by microdilution plate method where minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant community acquired (CA-MRSA) were estimated. The butanol fraction of geopropolis showed the highest concentration of polyphenol ($303.1 \pm 0.1 \mu\text{g EAG/mg sample}$) and, consequently, better antioxidant properties in the three tests (\bullet DPPH $\text{EC}_{50} = 2.23 \pm 0.05$, ABTS \bullet^{+} $\text{EC}_{50} = 0.87 \pm 0.003$, β -carotene system/linoleic acid IO% = 78.6 ± 0.3). Ethyl acetate and butanol fractions acted as bacteriostatic and bactericidal against tested bacterial strains. The hydroalcoholic extract and both hexanic and ethyl acetate fractions showed potent inhibition of cell proliferation in non-adherent HL60 (promyelocytic leukemia) and adherent HEPG2 (hepatocellular carcinoma) strains. The chemical analysis suggested the presence of terpenes with acid groups and benzophenones as major constituents of geopropolis. This is the first study with geopropolis from *M. mondury* and our results suggest that this product is a potential source of novel molecules with pharmacological properties.

Keywords: geopropolis, *Melipona mondury*, antioxidant activity, antibacterial activity, cytotoxic activity, secondary metabolites.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de fenólicos e atividade antioxidante do extrato e frações da geoprópolis de <i>Melipona mondury</i>	20
Tabela 2: Coeficiente de correlação de Pearson entre os métodos DPPH*, ABTS*+ e sistema ácido linoleico e teor de fenólicos totais das amostras de geoprópolis	21
Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato e frações da geoprópolis de <i>M. mondury</i>	22
Tabela 4: Porcentagem de inibição da proliferação celular do extrato e frações da geoprópolis de <i>M. mondury</i> em linhagens tumorais.....	24
Tabela 5: Principais íons observados no <i>Fingerprint</i> obtidos por ESI-MS em modo negativo e padrão de dissociação de compostos encontrados nas amostras de geoprópolis de <i>M. mondury</i>	28



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu 11

Figura 2: Reação entre o DPPH e uma molécula antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio12

Figura 3: Redução do $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de amônio $((NH_4)_2S_2O_8)$ 13

Figura 4: Ensaio de viabilidade celular através do método MTT pelo Extrato hidroalcoólico (EHAGP), fração hexânica (FHGP), Fração acetato de etila (FAEGP) e fração butanólica da geoprópolis de *M. mondury* (FBGP) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, comparando com C^- (Meio sem extrato ou frações) e C^+ (Triton X-100). A coluna marcada com (*) difere de forma significativa do controle negativo (C^-) com, $p < 0,05$ 14

Figura 5: *Fingerprint* de amostras de geoprópolis obtidas por ESI-MS em modo negativo ...15



LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS⁺• cátion Radical - 12,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA – Análise de Variância

BHI- Ágar de infusão de cérebro-coração (do inglês: Brain Heart Infusion)

CE₅₀- Concentração do extrato ou fração que induz metade do efeito máximo

CIM- Concentração inibitória mínima.

CBM- Concentração bactericida mínima.

DMSO- Dimetilsulfóxido

•DPPH- Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EHAGP- Extrato hidroacoolico da geoprópolis de *Melipona mondury*

ESI - Ionização por *eletrospray* (do inglês: Eletrospray Ionization)

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por *eletrospray* (do inglês: Eletrospray Ionization Mass Spectrometry)

ESI(-)-MS- Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* em modo negativo (do inglês: Eletrospray Ionization Mass Spectrometry negative mode)

FHGP- Fração Hexânica da geoprópolis de *Melipona mondury*

FAEGP- Fração acetato de etila da geoprópolis de *Melipona mondury*


FBGP- Fração butanólica da geoprópolis da geoprópolis de *Melipona mondury*

INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio

MS- Espectrometria de Massas (do inglês: Mass Spectrometry)

MS/MS- Espectrometria de Massas sequencial (do inglês: Tandem Mass Spectrometry)



m/z - Razão massa/carga

RPMI 1640 - Meio desenvolvido para cultura in vitro de células humanas saudáveis e neoplásicas (do inglês: Roswell Park Memorial Institute).

UPLC-MS^d Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês: Ultra Performance Liquid Chromatography), acoplada à Espectrometria de Massas.

UPLC-MS/MS- Cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplada à Espectrometria de Massas sequencial

λ - comprimento de onda



Programa de Pós-Graduação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação

Genética, Biodiversidade e Conservação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS	17
2.2. PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS	17
2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS	19
2.4. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS	19
2.4.1. Atividade antioxidante.....	20
2.4.2. Atividade antibacteriana.....	20
2.4.3. Câncer e atividade citotóxica.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. METODOLOGIA	24
4.1. COLETA DO MATERIAL	24
4.2. PREPARO DOS EXTRATOS	24
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	24
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
4.4.1. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre [•] DPPH.....	25
4.4.2. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS ^{•+}	26
4.4.3. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	27
4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	28
4.5.1. Cepas bacterianas.....	28
4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	29
4.6. ATIVIDADE CITOTÓXICA	29
4.6.1. Preparo das amostras.....	29
4.6.2. Manutenção das células em cultura.....	29
4.6.3. Ensaio de citotoxicidade.....	29
4.7. VIABILIDADE CELULAR	30
4.7.1. Cultura de células.....	30
4.7.2. Viabilidade celular pelo método MTT.....	30
4.8. ANÁLISES QUÍMICAS	31
4.8.1. Fingerprints.....	31
4.8.2. UPLC- MS/MS.....	31
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33



6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

1. INTRODUÇÃO

Os recursos naturais são utilizados com fonte alimentar e medicamentosa pelas comunidades desde épocas remotas. Dentre esses produtos, destacam-se aqueles oriundos das abelhas. Além de serem importantes polinizadoras, as abelhas produzem mel, pólen, própolis, geléia real, dentre outros. A própolis tem recebido destaque, pois estudos apontam que sua utilização na medicina ocorre há milênios como agente embalsamador, antimicrobiano, antisséptico, anti-inflamatório e desinfetante bucal. Esses fatos têm atraído interesse científico na descoberta de novas substâncias ativas entretanto estudos com este propósito ainda são escassos.

A própolis é produzida por abelhas que coletam o material resinoso das plantas e o misturam com suas secreções. Uma das espécies de abelhas mais conhecida no mundo é *Apis mellifera* por sua alta produtividade de mel, pólen e própolis. Entretanto, o foco deste trabalho é a geoprópolis, um tipo especial de própolis produzida pelas abelhas sem ferrão, os meliponíneos. Como relatado em estudos da área, os meliponíneos compreendem as espécies pertencentes à família Apidae, subtribo Meliponini, onde estão incluídas representantes do gênero *Melipona*.

No Brasil, as abelhas do gênero *Melipona*, além de serem excelentes agentes polinizadores de plantas nativas ou cultivadas, fornecem, principalmente, mel, e geoprópolis que possui em sua constituição além de resinas, o barro ou argila. Dentre as espécies de meliponíneos que ocorrem na Bahia a *Melipona mondury* Smith 1863, urucu-amarela, é considerada uma espécie importante para conservação da flora desta região, distribuindo-se em um quarto dos municípios do Estado.

A maioria das propriedades biológicas da própolis descritas na literatura é referente à própolis coletada da espécie de abelhas *Apis mellifera*. Estudos sobre a geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão têm aumentado nos últimos anos, mais ainda se sabe pouco sobre a constituição química e propriedades terapêuticas da própolis produzida por estas abelhas. Os poucos estudos existentes na literatura descrevem atividades antioxidantes, antimicrobianas, antinociceptiva, anti-inflamatória, imunomodulatória, gastroprotetora e citotóxicas.

Considerando que os meliponíneos são eficientes polinizadores da Mata Atlântica, a ausência de estudos científicos sobre a geoprópolis da espécie *M. mondury* e as atividades biológicas atribuídas a esse produto, este estudo visou analisar as atividades farmacológicas e composição química da geoprópolis de *M. mondury* a fim de agregar valor a este produto natural e elucidar seu potencial como fonte de produtos bioativos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ABELHAS

As abelhas são de extrema importância para os ecossistemas, pois vivem em alto nível de cooperação com a natureza, recebendo desta o alimento, como pólen, néctar, resinas e local para abrigo e, ao mesmo tempo prestam o benefício da polinização que se aproxima de 30 a 40% de acordo com o bioma (Kerr, 1997).

A Ordem Hymenoptera é uma das maiores em diversidade de espécies da Classe Insecta e possui aproximadamente 150 mil espécies descritas, entre elas, espécies fósseis desde o Período Triássico (Triplehorn & Johnson, 2005). Nessa Ordem, os representantes da Família Apidae são caracterizados pela modificação do ovipositor em ferrão e, de todas as Tribos dessa Família, somente os representantes da família Meliponinae sofrem atrofia do ferrão durante o seu desenvolvimento, sendo por esse motivo, chamados abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997).

Embora a *Apis mellifera*, conhecida como abelha melífera, é a espécie mais conhecida no mundo, ela foi introduzida no Brasil por imigrantes europeus no século XIX. As abelhas pertencentes à tribo Meliponini ocorrem em todas as regiões tropicais do mundo e subtropicais do hemisfério sul (Silveira *et al.*, 2002). Diferenciam-se das demais por apresentarem ferrão não funcional (atrofiado), redução e fragilidade de venação e ausência de pelos nos olhos (Michener, 1999).

Dentre as abelhas sem ferrão, *Melipona* é o gênero com maior número de espécies. A espécie *Melipona mondury*, conhecida popularmente como “uruçu amarela” faz parte do grupo *rufiventris* (Melo, 2003) e distribui-se ao longo da Mata Atlântica, nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Silveira *et al.*, 2002; Moure & Melo, 2013). Na Bahia, sua ocorrência foi registrada em 25% dos municípios baianos e está restrita a áreas quentes e úmidas dentro de habitats da Mata Atlântica (Souza *et al.*, 2012).

2.2. PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

Dentre os produtos originados pelas abelhas, mel, geléia real, pólen e própolis, esta última vem merecendo especial atenção, devido as suas diversas propriedades terapêuticas (Ghisalberth, 1979). Própolis é uma resina de coloração e consistência variada produzida pelas abelhas, a partir da mistura de substâncias coletadas de diferentes partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudados resinosos, com as secreções produzidas em seu organismo. É utilizada para vedar pequenas frestas da colmeia, protegê-la contra a invasão de

insetos, micro-organismos e embalsamar insetos mortos (Ghisalberti, 1979; Salatino *et al.*, 2005).

O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 A.C. (Da Silva *et al.*, 2006), quando os egípcios utilizavam a própolis para embalsamar cadáveres, devido as suas propriedades anti-putrefativas. Durante a segunda guerra mundial foi amplamente utilizada devido suas propriedades cicatrizantes (Pereira *et al.*, 2002). O maior interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, que apresentou em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (Lima, 2006).

As própolis brasileiras produzidas pela *Apis mellifera* foram reunidas em doze grupos de acordo com a constituição química e atividade biológica (Park *et al.*, 2004; Bankova, 2005; Cabral *et al.*, 2009). A “própolis verde”, oriunda da região sudeste do Brasil, tem como origem botânica a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo (Paredes-Guzman *et al.*, 2003). Pesquisas apontam que a presença do composto fenólico Artepillina C é responsável pelas diversas atividades biológicas atribuídas a esta própolis como: antioxidante, antimicrobianas, antitumoral, analgésica, anti-inflamatória, neuroprotetora, hepatoprotetora, e imunomoduladora (Bankosta *et al.*, 2001., Shimizu *et al.*, 2004; Salatino *et al.*, 2005; Búfalo *et al.*, 2009).

A “própolis vermelha”, também produzida pela *Apis mellifera* possui esse nome por apresentar coloração vermelha intensa sendo proveniente das colméias encontradas ao longo das praias e rios nordestinos, no estado de Alagoas e tem como origem botânica a espécie de leguminosa, *Dalbergia ecastophyllum*(L) Taub (Silva *et al.*, 2008). A própolis vermelha já demonstrou atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica (Alencar *et al.*, 2007; Daugsch *et al.*, 2008; Righi *et al.*, 2011; Begnini *et al.*, 2014). As atividades biológicas desta própolis são atribuídas a classe de polifenóis e isoflavonas presentes nas amostras da própolis (Silva *et al.*, 2008; Daugsch *et al.*, 2008).

Por outro lado, as abelhas indígenas sem ferrão produzem tanto própolis (trigoníneos) quanto geoprópolis (*Melipona*), e a quantidade e composição desses produtos na colmeia variam de acordo com a espécie de abelha (Kerr, 1987; Nogueira-Neto, 1997). A geoprópolis, a exemplo da produzida pela *Melipona mondury*, é uma mistura de resina de plantas com cera e barro. Esse tipo de própolis tem sido empregada popularmente para tratar hemorroidas, inflamação, gastrites e promover cicatrização (Kerr, 1987; Cunha *et al.*, 2013).

2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS

A composição química tanto da geoprópolis quanto da própolis é bastante complexa e varia de acordo com a flora de cada região visitada pelas abelhas, com o período de coleta da resina e com a variabilidade genética das abelhas rainhas. Assim, própolis de regiões diferentes possuem também uma composição química completamente distinta (Marcucci, 1995; Bankova *et al.*, 2000).

A atividade farmacológica da própolis está diretamente relacionada à sua composição química, onde já foram identificados mais de 300 compostos orgânicos como: flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides, fenilpropanoides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, dentre outros (Ozkul *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Hayacibara *et al.*, 2005).

Todavia, estudos relacionados sobre a composição química da geoprópolis são escassos, embora o interesse dos pesquisadores tenha crescido. Bankova *et al.* (1998) identificaram mais de cinquenta compostos das classes dos ácidos graxos, ácidos aromáticos, flavonoides, diterpenos e triterpenos em amostras de geoprópolis brasileiras. Recentemente, alguns autores demonstraram que as atividades farmacológicas estão relacionadas à presença de benzofenonas preniladas, diterpenos, ácidos fenólicos, terpenos, flavonoides e compostos voláteis como estireno, benzaldeído, limoneno, verbenona entre outros (Velikova *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014; 2015; Souza *et al.*, 2014; Torres-González *et al.*, 2016). Os compostos fenólicos e os terpenoides são considerados os principais constituintes bioativos da mesma (Cunha, 2001; Sawaya *et al.*, 2006).

Estudos comparativos das resinas de própolis de diferentes abelhas por espectrometria de massas por ionização por *eletrospray* em modo negativo indicaram a presença de íons marcadores de *Schinus terebenthifolius* (Anarcadinaceae) e de coníferas na maioria das amostras (Sawaya *et al.*, 2006; Sawaya *et al.*, 2007).

2.4. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS

À geoprópolis são conferidas inúmeras atividades incluindo as propriedades antioxidante (Silva *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2015; Dutra *et al.*, 2014), antimicrobiana (Cunha *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014; 2015), antinociceptiva (Franchin *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014), anti-inflamatória (Franchin *et al.*, 2012), imunomodulatória (Libério *et al.*, 2011), gastroprotetora (Ribeiro-Júnior *et al.*, 2015) e citotóxicas (Cunha *et al.*, 2013; 2016).

2.4.1. Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidas fisiologicamente e possuem importante papel na defesa e sinalização intracelular. Quando em excesso, essas espécies podem modificar macromoléculas endógenas, alterando suas funções, estando relacionadas com o desenvolvimento de diversas patologias, como câncer, aterosclerose, artrite e doenças neurodegenerativas (Kohen, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2006; Niki, 2010).

A produção de ROS/RNS nos seres vivos é controlada por antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) e da dieta, cuja função é desativar essas espécies, cessar sua produção ou reparar o dano tecidual (Halliwell & Gutteridge, 2006; Niki, 2010). Os antioxidantes dietéticos têm sido associados com a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como aquelas cardiovasculares, câncer, diabetes, doença de Alzheimer e Parkinson (Lin & Chang, 2005). Por esse motivo, houve um crescente interesse na pesquisa por produtos naturais que contenham fitoquímicos com potencial antioxidante.

Silva *et al.* (2013) comprovaram a atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas (*M. interrupta* e *M. seminigra*). Souza *et al.* (2013) estudaram a geoprópolis de *Melipona subnitida* (Jandaíra) e demonstraram seu potencial em desativar radicais livres. Dutra *et al.* (2014) comprovaram a atividade antioxidante da geoprópolis de *M. seminigra*, oriunda do Maranhão e, mais recentemente, Campos *et al.* (2014) e Campos *et al.* (2015) também verificaram o mesmo potencial da geoprópolis de *Melipona orbigny* e *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí), respectivamente.

2.4.2. Atividade antibacteriana

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Com isso, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas ao desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, não apenas pelo aumento da resistência bacteriana aos medicamentos tradicionais (Sheldon, 2003) como também pelos diversos efeitos colaterais causados pelos mesmos (Cunha, 2001). Daí a importância da pesquisa por fontes de novas substâncias com atividades bactericida ou bacteriostática.

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são particularmente importantes por serem associadas com infecções nosocomiais e por se mostrarem resistentes aos medicamentos disponíveis na clínica, o que estimula novas abordagens para tratamentos alternativos. Nos hospitais os reservatórios de micro-organismos são representados pelos

pacientes colonizados, funcionários e pelo próprio ambiente, em que a bactéria gram-positiva *S. aureus* é responsável por mais de 30% dos casos de infecções hospitalares (Mundim, 2003; Sampaio *et al.*, 2013).

A resistência da *S. aureus* aos antimicrobianos ocorre pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou eventualmente, de outras espécies e/ou por mutações em seus genes. A resistência a penicilina é conferida pela produção de enzimas, as betalactamases, capazes de inativar essas drogas. Já a resistência a meticilina é concedida por um gene, o *mecA*, que codifica a proteína ligante de penicilina com baixa afinidade pelo fármaco (Toufen *et al.*, 2003; Trabulsi & Alterthum, 2005; Sampaio *et al.*, 2013).

A *P. aeruginosa* é outra bactéria frequentemente presente nos efluentes hospitalares. Trata-se de um patógeno causador de infecções em diversas regiões do corpo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Este micro-organismo permanece incubado em diversos ambientes por longos períodos, além de adquirir ou desenvolver intrinsecamente resistência contra antimicrobianos (Chuanchuen *et al.*, 2001; Fuentesfria, 2008). A resistência intrínseca é importante nessa bactéria e ocorre quando o micro-organismo passa a expressar vários sistemas de efluxo de múltiplas drogas (MDR) (Chuanchuen *et al.*, 2001). Por esses motivos, as infecções causadas por esta bactéria são de difícil tratamento, o que justifica a pesquisa por alternativas medicamentosas.

Dentre os produtos naturais, a própolis é considerada importante adjuvante no tratamento ou na prevenção das doenças infecciosas (Libério *et al.*, 2009). Analisando diferentes amostras de própolis produzidas por *Melipona compressipes*, proveniente do Piauí, e por *Melipona quadrifasciata anthidioides*, do Paraná, Kujumgiev *et al.* (1999) comprovaram sua ação contra *S. aureus*, *Candida albicans* e o vírus influenza. Duailibe *et al.* (2007) comprovaram atividade do extrato de geoprópolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata* (tiúba) contra *Streptococcus mutans*. Libério *et al.* (2011) descreveram que amostras de geoprópolis do Maranhão, coletadas da *M. fasciculata*, apresentaram atividade bactericida contra *S. mutans* e *C. albicans*, além de ação imunomodulatória. Geoprópolis coletadas de *M. scutellaris*, na Bahia, exibiram atividade contra *S. aureus* e *S. mutans* (Cunha *et al.*, 2013). Campos *et al.* (2015) descrevem que o extrato etanólico da geoprópolis de *Tetragonisca angustula friebigi*, coletada no Mato Grosso, também apresentou atividade não apenas contra *S. aureus* mas também frente *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumonia*.

2.4.3. Câncer e atividade citotóxica

O câncer é considerado “um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Ao se dividirem rapidamente, essas células provocam a formação de tumores malignos e podem se espalhar para outras partes do corpo, no processo conhecido como metástase” (INCA, 2014). O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2014) estimou 576 mil casos de câncer no Brasil nos anos 2014/2015 e para os anos de 2016/2017 as estimativas são de 596 mil casos de câncer (INCA, 2016).

Mais de 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda principalmente por não disporem de recursos para diagnóstico, tratamento e prevenção (WHO, 2006). Tendo em vista a importância desse contexto, as pesquisas relativas à descoberta de novos fármacos com propriedades antineoplásicas também cresceram consideravelmente. A respeito disto, os ensaios com modelo *in vitro* constituem formas rápidas e eficazes de se estudarem os produtos naturais ou moléculas sintéticas, antecipando os testes *in vivo*. Muitas dessas metodologias verificam o potencial da amostra em eliminar células neoplásicas em cultura e correlacionam o efeito numa curva dose-resposta (Chabner & Roberts Jr, 2005).

Estudos relatam atividade citotóxica da geoprópolis de algumas espécies de abelhas. Borges *et al.* (2011) evidenciaram a ação da própolis produzida por *Scaptotrigona* sp no Estado do Maranhão sobre glioblastoma humano (U251 e U343) e fibroblastos (MRC-5). Cinegaglia *et al.* (2013) relataram atividade citotóxica *in vitro* sobre células de osteossarcoma canino (OSA), uma neoplasia óssea primária, frequentemente diagnosticada em cães. Cunha *et al.* (2013) demonstraram que a geoprópolis produzida por *M. scutellaris*, em Entre Rios, Bahia possui atividade antiproliferativa *in vitro* sobre células de câncer do ovário (OVCAR-3) e melanoma (UACC-62). Recentemente, Cunha *et al.* (2016) demonstraram que essa geoprópolis também possui ação antiproliferativa sobre linhagens celulares de câncer de cólon (COLO205 e KM12). Campos *et al.* (2015) investigaram a ação da geoprópolis produzida por *Tetragonisca fiebrigi* no Mato Grosso do Sul sobre linhagem eritroleucêmica K562.

Essas e outras publicações relacionadas à ação antiproliferativa da geoprópolis sugerem o caráter promissor de sua aplicabilidade e justificam estudos posteriores para investigar esse potencial, haja vista a ineficiência do tratamento antineoplásico atual para muitos tipos de cânceres.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo avaliar a constituição química e as atividades farmacológicas e toxicológicas da geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão *Melipona mondury*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de fenólicos totais no extrato hidroalcólico e frações da geoprópolis de *M. mondury* e relacioná-lo com a ação antioxidante;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de sequestro do radical livre •DPPH, sequestro do radical livre ABTS^{•+} e pelo sistema da inibição da auto-oxidação do β -caroteno;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcólico e frações da geoprópolis contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas. aeruginosa* e *S. aureus* resistente à metilina (CA-MRSA);
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* do extrato hidroalcólico e frações da geoprópolis de *M. mondury*;
- Caracterizar quimicamente o extrato hidroalcólico e frações da geoprópolis de *M. mondury*.

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DO MATERIAL

A coleta da geoprópolis foi realizada no município de Nova Ibiá, no estado da Bahia (S- 13° 48'36'' e W 39°37'32'', a 292 m) em agosto de 2015. A geoprópolis foi coletada da parte interna e das frestas da tampa da caixa racional (modelo INPA) de *M. mondury*, com luvas e paletas estéreis e transportada ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPN) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. A geoprópolis foi triturada com uso de graal e pistilo e, em seguida, mantida sob refrigeração.

4.2. PREPARO DOS EXTRATOS

A geoprópolis triturada foi submetida à extração a frio com etanol 80% por 72 h e em seguida filtrado para eliminar a porção inorgânica (terra). O processo de extração foi repetido três vezes. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador, originando o extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHAGP= 10 g). Uma porção do EHAGP foi reservada e outra parte foi submetida à partição líquido-líquido com os solventes hexano, acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade, originando as frações hexânicas (FHGP= 0,5 g), acetato de etila (FAEGP= 1,6g) e butanólica da geoprópolis (FBGP= 0,5 g).

4.3. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A concentração de compostos fenólicos totais nos extratos brutos e frações foi estimada pelo ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, com modificações (Slinkard; Singleton, 1977; Piccinelli *et al.*, 2004). O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação 6 (VI) e possui coloração amarela. Porém, na presença de agentes redutores, como compostos fenólicos ou outros de natureza não fenólica, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio de cor azul, o que permite a determinação da concentração das substâncias reductoras (De Oliveira, 2009). Para realização do ensaio, as amostras foram diluídas em etanol na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 125 µL de cada extrato e frações foram misturadas com 125 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada, agitando-se por 3 min. Em seguida, 125 µL da solução saturada de Na₂CO₃ foram adicionadas e a mistura reacional foi incubada por 30 min a 37 °C. As absorbâncias das amostras foram medidas em 750 nm. O aparecimento de coloração azulada produzida é diretamente proporcional ao teor de fenólicos presentes no material analisado. As análises

foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico (0,5, 5, 10, 15, 25 µg). Os valores foram expressos como microgramas de equivalente de ácido gálico por miligrama de extrato (µg EAG/mg da amostra), considerando o erro padrão da média.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

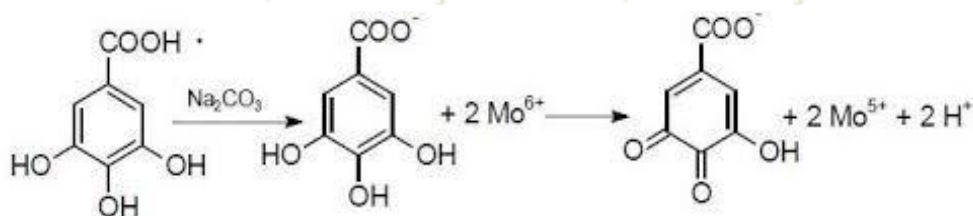


Figura 1: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre \bullet DPPH

O teste do \bullet DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é um método colorimétrico rápido e eficaz para estimar a atividade antiradicalar. Brand-Williams *et al.* (1995) propuseram o método envolvendo a utilização do \bullet DPPH, no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol. A redução do \bullet DPPH é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o \bullet DPPH apresenta absorbância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical ($\text{R}\bullet$) a absorbância diminui.

A atividade antioxidante das amostras de geoprópolis foi avaliada pelo método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995), com modificações. O extrato e as frações foram diluídos em etanol para as concentrações de 1,5 a 150 µg/mL. Uma alíquota de 300 µL de cada diluição do extrato ou fração foi incubada com 1700 µL de solução etanólica de \bullet DPPH (70 µM) por 20 min a 25°C. As absorbâncias das misturas reacionais foram obtidas espectrofotometricamente a 517 nm. As análises foram feitas em triplicata. Etanol foi empregado como controle negativo e padrões de ácido gálico e trolox foram tratados nas mesmas condições da amostra. A porcentagem da atividade antioxidante foi plotada graficamente contra a concentração dos extratos, ajustando os dados em equação hiperbólica

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

retangular para obter a CE_{50} , definida como concentração da amostra necessária para causar 50% de redução do radical.

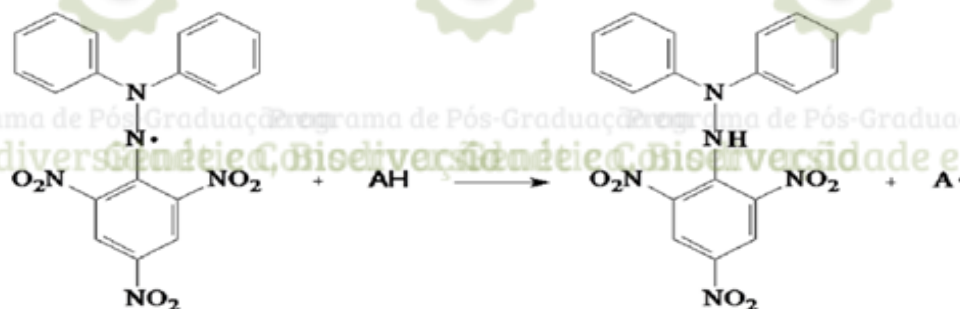


Figura 2: Reação entre o \cdot DPPH e uma molécula antioxidante (AH) através da transferência de um átomo de hidrogênio.

4.4.2. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre $ABTS^{\bullet+}$

O método do $ABTS^{\bullet+}$ 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) também é um teste de atividade antioxidante rápido e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens, como permitir a análise de compostos tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica (Kuskoski *et al*, 2005). O método segundo Re *et al*. (1999) baseia-se na geração do $ABTS^{\bullet+}$, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de amônio. Portanto, avalia-se a habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$, reduzindo-o ao ABTS, incolor. Para realização do teste o extrato e as frações foram diluídos para 1.5 a 150 μ g/mL em etanol. O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi formado pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de amônio (140 mM) e incubados à 25 °C por 16 h na ausência de luz. A mistura reacional final foi diluída em etanol até a obtenção do valor de absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734nm. Uma alíquota de 300 μ L do extrato ou fração foi incubada com 1700 μ L de solução etanólica do $ABTS^{\bullet+}$ por 20 min a 25 °C. As absorvâncias das misturas foram obtidas espectrofotometricamente a 734 nm. Etanol foi empregado como controle negativo. Padrões de ácido gálico e trolox foram tratados nas mesmas condições da amostra. A porcentagem da atividade antioxidante foi plotada graficamente contra a concentração dos extratos, ajustando os dados em equação hiperbólica retangular para obter a CE_{50} , definida como concentração da amostra necessária para captar 50% do radical. As análises foram feitas em triplicata.

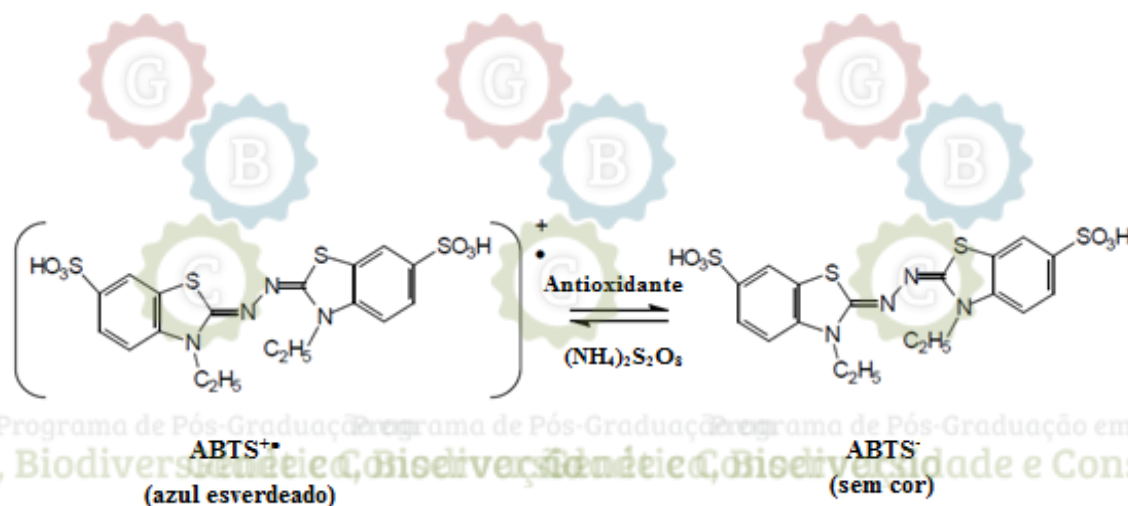


Figura 3: Redução do $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de amônio $(NH_4)_2S_2O_8$

4.4.3. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

O β -caroteno é o mais abundante dos carotenoides e largamente utilizado em terapias. É quase completamente insolúvel em água, mas facilmente solúvel em ambientes hidrofóbicos e solventes pouco polares. Muitos estudos já demonstraram que ele inibe a auto-oxidação de lipídios em tecidos biológicos e produtos alimentícios, porém poucos detalhes da cinética e mecanismo destas reações têm sido revelados (Alves, 2010; Souza *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2013).

O sistema β -caroteno/ácido linolênico, que consiste da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, estima a habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes na amostra de sequestrar o radical peroxil do ácido linoleico (LOO^\bullet), cessando a cascata de peroxidação. O método é amplamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de matrizes alimentares e em ambientes lipofílicos. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (Borguini, 2006).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico foi desenvolvido por Marco (1968), modificado por Miller (1971) e utiliza o ácido linoléico, monopalmitato de polioxiétileno sorbitano (Tween 40) e o β -caroteno. O Tween é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura β -caroteno/ácido linoléico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos como BHA, BHT e trolox, ou naturais como ácido gálico ou quercetina (Alves, 2010).

A atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi avaliada pelo método proposto por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) com adaptações. O

sistema β -caroteno/ácido linoleico foi preparado pela mistura de 10 μ L da solução de β -caroteno em clorofórmio (20 mg/mL) com 60 μ L de ácido linoleico, 530 μ L de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio. Após homogeneização, o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O produto seco foi diluído em água destilada aerada até que a absorbância da emulsão permanecesse entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Uma alíquota de 2 mL da emulsão foi misturada com 160 μ L do extrato ou frações (1 mg/mL). A oxidação da emulsão foi monitorada à 470 nm, no tempo inicial e após 120 min de incubação à 50 °C. Etanol foi empregado como controle negativo. A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação, calculada em relação a 100% da oxidação do controle (sem antioxidante), conforme expressão abaixo:

$$\%IO = (Ac - Am) \cdot \frac{100}{Ac},$$

Sendo, Ac = absorbância inicial do controle – absorbância final do controle, Am = absorbância inicial da amostra – absorbância final da amostra e %IO= porcentagem de inibição da oxidação.

4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.5.1. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas para determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima foram *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (CA-MRSA). A linhagem CA-MRSA foi cedida do estoque de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia da UFBA IMS/CAT, campus Anísio Teixeira. Esta linhagem foi isolada a partir de leite humano cru, denominada LC2. Para identificação da cepa foram feitos testes fenotípicos (catalase, coagulase e Gram) e genotípicos, estes incluíram a identificação do gene *nuc*, um gene presente apenas em *S. aureus* para confirmação da espécie (Brakstad *et al.*, 2000), detecção do gene *mecA* para identificação da resistência (Perez- Roth *et al.*, 2001) e tipagem do cassete cromossômico *mec* (*scmec*) (Boye *et al.*, 2007). O isolado LC2 foi positivo para o gene *nuc* e *mecA* e teve o *scmec* tipado como tipo IV que é incluído como uma cepa CA-MRSA.

4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As cepas bacterianas foram expandidas em caldo BHI (Ágar de infusão de cérebro-coração) por 24 h a 37°C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída em novo caldo até uma absorbância de 0,08 a 0,1 em 625 nm, o que equivale ao 0,5 da escala de McFarland. As bactérias foram, então, incubadas com o extrato ou frações em concentrações variadas (25 a 1000 µg/mL). Etanol foi empregado como controle negativo. Após incubação por 24 h a 37°C, 60 µL do corante resazurina (0,01%) foi adicionado em 200 µL de suspensão bacteriana. A CIM foi considerada a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível (cor azul) após 30 min. Para a determinação da CBM, 10 µL da suspensão bacteriana pré-incubados com os extratos ou frações em diferentes concentrações foram plaqueados em ágar Muller-Hinton a 37 °C por 24 h. O CBM foi considerado a concentração onde não houve evidência de crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura (Cunha *et al.*, 2013).

4.6. ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.6.1. Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido) puro estéril na concentração de 10 mg/mL.

4.6.2. Manutenção das células em cultura

Foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão.

4.6.3. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato e frações foi avaliada pelo o ensaio do Alamar blue. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'brien *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue é reduzido por células em proliferação. A redução do alamar blue reflete, portanto, o

metabolismo celular e, conseqüentemente, a proliferação, crescimento e/ou viabilidade celular (Ahmed *et al.*, 1994).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma suspensão de 3×10^5 células/mL para HL-60 e 7×10^4 células/mL para HepG2). Após 24 h de crescimento, as amostras dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço na concentração de 50 µg/mL e incubadas por 72 h. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de resazurina foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) em leitora de placa (Ahmed *et al.*, 1994). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, já o controle negativo recebeu o mesmo volume em DMSO. A inibição da proliferação celular foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism (5.0).

4.7. VIABILIDADE CELULAR

4.7.1. Cultura de células

Fibroblastos do Hamster V79 foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. O meio foi trocado quando a célula alcançava 80% de confluência, sendo expandida para outras garrafas de cultura.

4.7.2. Viabilidade celular pelo método MTT

O método de MTT (Brometo 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) é um método utilizado para avaliar a atividade mitocondrial em células viáveis, conforme descrito por Hansen *et al* (1989). As enzimas mitocondriais têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de azul escura. Após a solubilização com DMSO, obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional a quantidade de células viáveis (Mossman., 1983; Hansen *et al*, 1989).

O extrato e as frações foram, previamente, concentrados a vácuo para retirar todo solvente. As células (1×10^4 por poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e pré-incubadas com o extrato e as frações nas concentrações de 0 a 50 µg/mL por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. O MTT (0,25 µg/mL) foi então adicionado ao meio e o sistema foi novamente incubado por 3 horas a 37 °C. Foi realizada então a leitura de absorbância na leitora de microplacas a 570 nm e comprimento de onda de referência 630 nm.

A atividade metabólica residual foi calculada como porcentagem do grupo negativo. O Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo.

4.8. ANÁLISES QUÍMICAS

As análises químicas das amostras foram feitas em um cromatógrafo UHPLC Acquity acoplado com um espectrômetro de massas TQD Acquity (Micromass-Waters Manchester, England) disponível no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.8.1. Fingerprints

Os *fingerprints* (ESI(-)-MS) foram obtidos por injeção direta, em duplicata, de 0,01 mL de solução à 1mg/mL em metanol do extrato e frações da geoprópolis em uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) em modo negativo. A inserção da amostra na fonte de *eletrospray* foi realizada em uma mistura de metanol:água (90:10 v/v) a uma vazão de 0,1 mL/min.

4.8.2. UPLC- MS/MS

A análise cromatográfica das amostras foi feita usando uma coluna C18 BEH Waters Acquity (2,1mm x 50 mm x 1,7 μ m tamanho de partícula). A coluna foi eluída usando um gradiente de água Mili-Q com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B) em uma vazão de 0,2mL/min. A condição inicial foi mantida em 25% do solvente A e 75% do solvente B durante 8,6 min, mantendo durante 1 min a concentração de 100% de metanol (solvente B), em 10 min de análise. Ao término da corrida voltou-se as condições de eluição inicial permitindo a estabilização por 2 min antes da próxima injeção. Usou-se a detecção no modo negativo nas seguintes condições: Voltagem do capilar 3,00 kV, Cone 30 V, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 350°C. As massas analisadas estão na faixa de m/z 100 a 1000. Os espectros MS/MS foram obtidos aplicando uma energia de colisão de 30 V.

A identificação de componentes das amostras de geoprópolis foi realizada pela comparação com resultados publicados na literatura. Para tal, foram comparadas a relação massa/carga (m/z) e o padrão de fragmentação dos íons observados nas amostras da geoprópolis daqueles da literatura.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram feitas em triplicata. Os dados foram analisados utilizando ANOVA uma via e Tukey como pós-teste, usando o programa GraphPad Prism (5.0) e expressos como média \pm desvio padrão amostral, tomando-se o valor de $p \leq 0,05$ como nível máximo de significância estatística. Foi usada correlação de Pearson para avaliar a correlação existente entre o teor de fenólicos e os ensaios antioxidantes DPPH, ABTS e peroxidação lipídica.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química da própolis é dependente da diversidade de plantas utilizadas para obtenção de recursos pelas abelhas, sendo assim relacionada com a composição química da resina coletada na planta (Marcucci, 1999; Bankova *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos têm sido considerados como um dos principais constituintes bioativos da própolis (Alencar *et al.*, 2007). Ademais, essas substâncias têm recebido atenção especial por estarem relacionadas às propriedades farmacológicas, em especial, antioxidantes (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001), antimicrobianas (Taguri *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2007) e citotóxicas (Sforcin & Bankova, 2011; Sawicka *et al.*, 2012; Szliszka & Krol, 2013).

Os antioxidantes presentes em produtos naturais podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas (Haslam *et al.*, 1996; Haliwell *et al.*, 2006). Por isso, é de suma importância a determinação dos compostos fenólicos presentes nas amostras da geoprópolis para verificar se estes estão ou não associados com as propriedades biológicas observadas (Choe, 2006).

A análise dos compostos fenólicos totais e as atividades antioxidantes do extrato bruto e das frações da geoprópolis de *M. mondury* são mostrados na Tabela 1. A fração butanólica da geoprópolis (FBGP) foi a que apresentou maior quantidade de fenólicos ($303,1 \pm 0,1 \mu\text{g EAG/mg}$ da amostra), sendo estatisticamente diferente das demais ($p < 0,05$). Por outro lado, a fração hexânica (FHGP) mostrou menor quantidade de fenólicos ($40,1 \pm 0,4 \mu\text{g EAG/mg}$). A diferença na concentração dessas espécies deve estar relacionada com a natureza química das substâncias fenólicas (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos), da interação com outros nutrientes e micronutrientes presentes na amostra e da polaridade do solvente empregado no procedimento de extração (Caetano *et al.*, 2009). A concentração de fenólicos na fração apolar foi a menor, o que evidencia que os mesmos não se particionam em solventes lipofílicos. Em nosso estudo, a quantidade de compostos redutores dos íons de molibdênio e tungstênio foi superior àquela encontrada por Souza *et al.* (2013) na geoprópolis de *M. subnitida* coletada em Vieirópolis, Paraíba, que variou de $25,6 \pm 0,5$ à $115,8 \pm 0,8 \mu\text{g EAG/mg}$. Esses dados confirmam que a origem da geoprópolis e/ou espécie de abelha influenciam na composição química da mesma.

Considerando a presença de substâncias potencialmente antioxidantes no extrato e frações da geoprópolis, a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das amostras foi realizada por três diferentes métodos: o sequestro do radical livre $\bullet\text{DPPH}$, sequestro do cátion

radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e pelo sistema da inibição da auto-oxidação do β -caroteno. Nas análises pelos métodos $\bullet\text{DPPH}$ e $\text{ABTS}^{\bullet+}$, os valores foram expressos em CE_{50} (concentração efetiva para redução de 50% do cátion radical livre). No método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno, os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação, ou seja, a porcentagem a inibição da oxidação lipídica proporcionada pelas frações e extrato da geoprópolis.

Nos métodos de captura dos radicais livres estáveis todas as amostras avaliadas exibiram atividade sequestradora de $\bullet\text{DPPH}$ e $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Tabela 1). Nestes métodos, as frações acetato de etila (FAEGP) e butanólica (FBGP) apresentaram as maiores atividades antioxidantes. A FBGP foi a mais efetiva em capturar o radical $\bullet\text{DPPH}$ ($2,23 \mu\text{g/mL}$), os padrões ácido gálico e trolox apresentaram valores um pouco menores de CE_{50} que a FBGP, o que é geralmente esperado por se tratarem de moléculas purificadas. Por outro lado, no método $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a CE_{50} da FBGP ($0,87 \mu\text{g/mL}$) foi estatisticamente menor do que o padrão trolox ($1,20 \mu\text{g/mL}$) e igual ao ácido gálico ($1,08 \mu\text{g/mL}$). Em ambos os métodos, a fração que mostrou maior CE_{50} foi a FHGP ($\text{CE}_{50\text{DPPH}} = 20,2 \mu\text{g/mL}$ / $\text{CE}_{50\text{ABTS}} = 20,5 \mu\text{g/mL}$). Ainda assim, quando comparada às frações hexânicas das geoprópolis de *M. subnitida* ($\text{CE}_{50\text{DPPH}} = 239,3 \mu\text{g/mL}$ / $\text{CE}_{50\text{ABTS}} = 32,3 \mu\text{g/mL}$) (Souza *et al.*, 2013) e *M. fasciculata* ($\text{CE}_{50} =$ não detectado) (Dutra *et al.*, 2014) a fração hexânica da geoprópolis de *M. mondury* se apresentou com maior potencial antioxidante. Na realidade, as frações acetato de etila daquelas espécies foram as que mostraram melhor atividade antioxidante ($\text{CE}_{50\text{DPPH}} = 10,1 \mu\text{g/mL}$ / $\text{CE}_{50\text{ABTS}} = 4,3 \mu\text{g/mL}$ para *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2013) e $\text{CE}_{50\text{DPPH}} = 3,8 \mu\text{g/mL}$ / $\text{CE}_{50\text{ABTS}} = 1,4 \mu\text{g/mL}$ para *M. fasciculata*), o que difere dos nossos dados, cuja fração mais ativa foi a mais polar, ou seja, butanólica.

O ensaio de inibição da auto-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico é baseado na capacidade de certas substâncias protegerem o β -caroteno da oxidação causada pelos radicais de lipídeos oriundos da peroxidação do ácido linoléico em fase apolar (Krinsky, 1989; Ting *et al.*, 2011). Novamente, a fração butanólica apresentou maior capacidade de inibir a oxidação do β -caroteno (78,6 %), cujo resultado foi similar ao padrão trolox. As frações acetato de etila (26,5%) e hexânica (4,7%) inibiram de forma mais sutil a oxidação do sistema β caroteno/ácido linoléico. Quando comparadas com a *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2013), as frações hexânica (26,3%) e acetato de etila (55,1%) da geoprópolis daquela espécie se mostraram mais eficientes que deste trabalho. Por outro lado, a fração mais polar da *M. mondury* (78,6%) mostrou maior inibição de oxidação que a mais polar da *M. subnitida* (20,7%).

De qualquer forma, as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências por se basearem em diversos mecanismos. Esses fatos também podem explicar os diferentes resultados da mesma amostra de geoprópolis ou mesmo padrões em diferentes ensaios (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Niki, 2010).

Tabela 1: Teor de fenólicos e atividade antioxidante do extrato e frações da geoprópolis de *Melipona. mondury*.

AMOSTRAS	Teor de fenólicos μg EAG/ mg	DPPH CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Sistema β caroteno/ ácido linoléico (% IO)
EHAGP	$144,4 \pm 0,01^a$	$6,91 \pm 0,17^a$	$5,96 \pm 0,08^a$	$27,99 \pm 0,2^a$
FHGP	$40,12 \pm 0,4^b$	$20,22 \pm 0,2^b$	$20,51 \pm 0,15^b$	$4,7 \pm 0,001^b$
FAEGP	$140,9 \pm 0,28^a$	$6,58 \pm 0,04^c$	$5,5 \pm 0,028^c$	$26,45 \pm 0,4^a$
FBGP	$303,1 \pm 0,14^c$	$2,23 \pm 0,05^d$	$0,87 \pm 0,003^d$	$78,57 \pm 0,3^c$
Trolox	-	$1,54 \pm 0,01^e$	$1,20 \pm 0,035^e$	$83,69 \pm 0,7^d$
Ácido gálico	-	$1,45 \pm 0,01^e$	$1,08 \pm 0,04^{d,e}$	$54,7 \pm 0,4^e$

Resultados expressos com média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. EHAGP (Extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. mondury*), FHGP (Fração hexânica da geoprópolis de *M. mondury*), FAEGP (Fração acetato de etila da geoprópolis de *M. mondury*), FBGP (Fração butanólica da geoprópolis de *M. mondury*).

De maneira geral, as frações da geoprópolis que apresentaram melhor atividade antioxidante parecem conter maior concentração de fenólicos (Tabela 1), o que sugere que as moléculas redutoras (como os fenólicos) presentes na geoprópolis de *M. mondury* sejam as responsáveis pela sua atividade antioxidante. Outros autores também associam o teor de fenólicos à atividade antioxidante das geoprópolis de *M. fasciculata* (Dutra *et al.*, 2014), *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014), *M. orbigny* (Campos *et al.*, 2014), *M. interrupta* e *M. seminigra* (Silva *et al.*, 2013). Contudo, na correlação linear de Pearson entre compostos fenólicos e os métodos $\bullet\text{DPPH}$, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e sistema β caroteno/ácido linoléico (Tabela 2), apenas o ensaio de inibição da auto-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico apresentou correlação significativa com $r = 0,993$ ($p = 0,007$). Esse fato sugere que os compostos que reagem com os radicais $\bullet\text{DPPH}$ com $r = -0,880$ ($p = 0,120$) e $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com $r = -$

0,878 ($p=0,122$), podem não reduzir os íons molibdênio presentes no reagente de Folin, impedindo tal correlação.

Tabela 2: Coeficiente de correlação de Pearson entre os métodos DPPH[•], ABTS^{•+} e sistema ácido linoleico e teor totais de fenólicos das amostras de geoprópolis.

	DPPH[•]	ABTS^{•+}	Sistema β caroteno/ ácido linoleico
Teor de fenóis	-0,880	-0,878	0,993*

* $p < 0,05$.

A geoprópolis também é considerada uma alternativa na prevenção e tratamento de muitas doenças infecciosas, uma vez que exibe atividade antimicrobiana contra uma variedade de agentes infecciosos (Velikova *et al.*, 2000; Liberio *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014). Esta atividade tem sido atribuída a um sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos, diterpenos e sesquiterpenos presentes na própolis (Kedzia, 1990; Marcucci, 1995), cujos mecanismos bactericidas e bacteriostáticos são diversos e ainda não elucidados.

A atividade antibacteriana do extrato e frações da geoprópolis foi determinada pelos ensaios de microdiluição cuja Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram estimadas (Tabela 3). O EHAGP inibiu o crescimento das cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, mas não agiu sobre a *S. aureus* MRSA. Os valores de CBM mostraram que o EHAGP possui atividade bactericida apenas para cepa *S. aureus* em 1000 $\mu\text{g/mL}$. A FHGP agiu apenas como bacteriostático de *P. aeruginosa* na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$. As frações FAEGP e FBGP inibiram o crescimento de todas as cepas testadas. A CIM da FAEGP foi de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (MRSA), respectivamente. O CBM de FAEGP foi detectável apenas para *S. aureus* a 250 $\mu\text{g/mL}$. A FBGP foi a fração que mostrou menores valores de CIM (25 $\mu\text{g/mL}$) e CBM (25 $\mu\text{g/mL}$) para *S. aureus*, o que sugere um efeito bactericida. Para *P. aeruginosa* e *S. aureus* (MRSA), o CIM foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e o CBM $> 1000 \mu\text{g/mL}$.

Cunha *et al.* (2013) demonstraram que o extrato etanólico (EEGP) e a fração hexânica (HF) da geoprópolis de *M. scutellaris*, também coletada no estado da Bahia, foram potentes antibacterianos contra *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, mas não contra *P. aeruginosa*. Os autores atribuíram a atividade às benzonfenonas preniladas encontradas na mesma. Campos *et al.* (2014) reportaram uma CIM e CBM $> 1000 \mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico da geoprópolis

M. orbigny coletada no Mato grosso do Sul contra *S.aureus*. Velikova *et al.* (2000) demonstraram que a geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* exibiu atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E.coli* devido a presença do diterpeno caurenico. Campos *et al.* (2015) encontraram que o extrato etanólico da geoprópolis de *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí), agiu como antibacteriano contra duas cepas de *S. aureus* (CIM = 550-650 µg /mL) e CBM > 1000 µg/mL) e de *P. aeruginosa* (CIM = 5800-7810µg/mL e CBM > 1000 µg/mL). Tal efeito também foi atribuído ao diterpeno ácido caurenico e ainda aos compostos: ácido cinâmico e ácido p-cumárico.

As características estruturais dos diterpenos que promovem atividade antimicrobiana incluem: um grupo lipofílico, capaz de se inserir na membrana celular e um grupo doador de ligação de hidrogênio (grupo hidrofílico) estrategicamente posicionado que interage com os grupos fosforilados da membrana. Esse mecanismo apesar de ainda não ser totalmente elucidado está associado às ações bacteriolíticas e perturbadoras de membrana celular atribuídas aos diterpenos (Urzúa *et al.*,2008).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato e frações da geoprópolis de *M. mondury*.

Cepas bacterianas	EHAGP		FHGP		FAEGP		FBGP	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1000	1000	^a	^a	250	1000	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> (CA - MRSA)	^a	^a	^a	^a	500	^a	1000	^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	^a	1000	^a	1000	^a	1000	1000

^a valores >1000 µg/mL. Unidades do CIM e CBM = µg/mL

As diferenças observadas entre as atividades biológicas e constituintes químicos das geoprópolis estudadas pelos diferentes autores podem ser atribuídas ao fato de elas serem coletadas por espécies diferentes de abelhas, pela vegetação local, diferença no fracionamento ou nas metodologias empregadas para determinar CIM e CBM (Caetano *et al.*, 2009). Independente destas variáveis na grande parte dos ensaios antimicrobianos as própolis inibem mais facilmente as bactérias Gram-positivas e, geralmente, são inativas ou pouco ativas, contra as Gram-negativas (Cunha *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2015). Provavelmente, a diferença da ação antibacteriana deve ocorrer devido às diferenças estruturais destes microorganismos. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular quimicamente mais

complexa do que as Gram-positivas pela existência de uma membrana externa à parede celular. A membrana celular destas bactérias pode agir como uma barreira contra difusão de substâncias bioativas. Esta dificuldade na difusão de partículas é devido à natureza polar da membrana celular externa e pela presença de proteínas especiais, “porinas”, que são capazes de expulsar substâncias para o meio (Helander *et al.*, 1998; Nikaido, 2003).

Os compostos fenólicos são considerados importantes agentes antibacterianos por promoverem danos na membrana celular, inibirem a síntese de ácidos nucleicos e interferirem no metabolismo energético das bactérias. Além disso, estes compostos também modificam os fatores de virulência de vários tipos de bactérias como enzimas, toxinas e outras moléculas de sinalização (Vaquero *et al.*, 2010; Cushnie & Lamb, 2011; Daglia, 2012). As frações FAEGP e FBGP apresentaram menores valores de CIM e CBM e também altas concentrações de fenólicos, o que sugere um papel importante destes compostos para os efeitos antibacterianos observados para a geopropolis de *M. mondury*.

Aos compostos fenólicos também são atribuídas atividades citotóxicas por afetarem as vias de apoptose das células cancerosas (Szliszka & Krol, 2013; Szliszka *et al.*, 2013). Por essa razão, a geopropolis foi recentemente estudada quanto essas propriedades por diferentes grupos de pesquisa que demonstraram ação citotóxica contra diversas linhagens celulares como: K562(leucemia), U251 (Glioma), UACC-62(Melanoma), OVCAR-3 (câncer de ovário), OSA (osteossarcoma canino) (Cinegaglia *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014; 2015; Cunha *et al.*, 2013; 2016;). A atividade citotóxica do extrato e frações da geopropolis de *M. mondury* também foi estimada em porcentagem de inibição da proliferação celular de linhagens tumorais HL-60 (leucemia prómielocítica) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) (Tabela 4).

De modo geral, a maioria das amostras inibiu a proliferação em ambas linhagens, exceto a fração butanólica que não demonstrou potencial citotóxico. O EHAGP inibiu a proliferação celular da linhagem HepG2 em 94% e da linhagem HL-60 em 80%. As frações hexânica e acetato de etila inibiram 89% e 97% da proliferação da linhagem HepG2 e 81% e 98 % da linhagem HL-60, respectivamente. Na linhagem HepG2 as amostras com atividade citotóxica se mostraram semelhantes ao padrão, doxorubicina (87%). Já na linhagem HL-60 a fração acetato de etila demonstrou maior inibição da proliferação que a doxorubicina (79%). A fração butanólica, que foi mais ativa nos ensaios anteriores não inibiu a proliferação da linhagem HepG2 e na linhagem HL-60 reduziu apenas 9% da proliferação celular.

Tabela 4: Porcentagem de inibição da proliferação celular do extrato e frações da geoprópolis de *M. mondury* em linhagens de células tumorais.

Amostras	Porcentagem de inibição	
	HepG2	HL60
EHAGP	94,54 ±13,51 ^a	80,34 ±4,66 ^a
FHGP	89,01 ±12,49 ^a	81,63 ±1,18 ^a
FAEGP	97,63 ±11,97 ^a	98,32 ±1,46 ^b
FBGP	0 ^b	9,21 ±4,96 ^c
DOX	87,98 ±3,40 ^a	79,14 ±4,66 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. EHAGP (Extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. mondury*), FHGP (Fração hexânica da geoprópolis de *M. mondury*), FAEGP (Fração acetato de etila da geoprópolis de *M. mondury*), FBGP (Fração butanólica da geoprópolis de *M. mondury*), DOX (doxorubicina).

Ao se verificar a aplicabilidade terapêutica de um produto natural é importante que exista um equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e os efeitos tóxicos deste produto às células normais do organismo (Rodeiro *et al.*, 2006). Após constatar as propriedades biológicas da geoprópolis, verificou-se o potencial citotóxico desse produto contra células normais. Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença significativa entre as células incubadas com o extrato e frações da geoprópolis (50 µg/mL) e o controle negativo (Figura 4).

Na concentração de 50 µg/mL o extrato e as frações hexânica (FHGP) e acetato de etila (FAEGP) da geoprópolis de *M. mondury* exibiram um perfil tóxico para as linhagens cancerígenas HepG2 e HL-60, mas aparentemente atóxico para as células normais, o que sugere uma segurança relativa em se empregar a geoprópolis futuramente para tratamento de doenças com bases inflamatória, infeccioso e até alguns tipos de tumores.

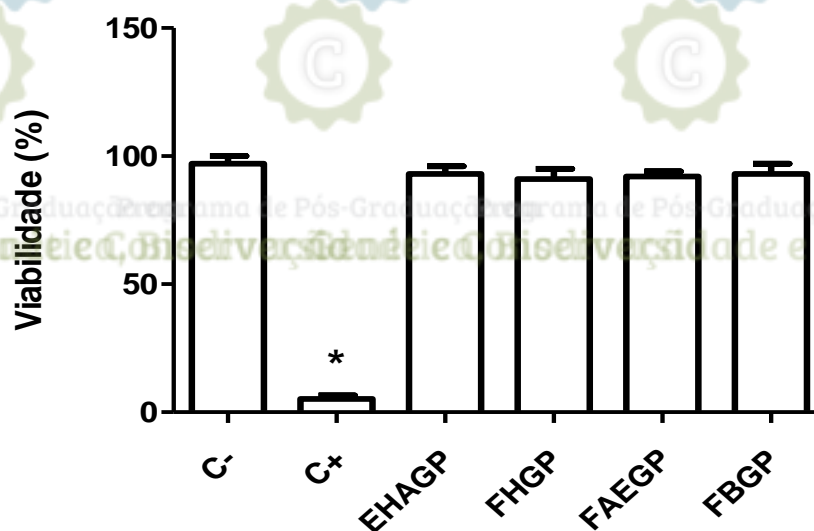


Figura 4: Determinação da viabilidade celular após incubação de fibroblastos murinos com a geopropolis. Fibroblastos foram incubados com o extrato hidroalcoólico (EHAGP), fração hexânica (FHGP), fração acetato de etila (FAEGP) ou fração butanólica (FBGP) da geopropolis de *M. mondury* na concentração de 50 µg/mL por 24 h a 37°C. Em seguida, a atividade metabólica da célula foi determinada pelo método do MTT, conforme descrito na Metodologia. Triton X-100 (1%) foi empregado como controle positivo (C+), enquanto as células sem adição de extrato ou frações foi denominada de controle negativo (C-). * $p > 0,05$, quando com o controle negativo.

Como já mencionado anteriormente, a geopropolis de diferentes espécies já foram estudadas e vários metabólitos têm sido identificados em sua composição, tais como: ácidos graxos, flavonoides, diterpenos e triterpenos, benzofenonas preniladas, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, ácido p-cumárico), ácido cinâmico, ácidos diterpênicos, elagitaninos e compostos voláteis como limoneno, benzaldeídos, estireno, β -fencheno entre outros (Bankova *et al.*, 1998, Velikova *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015; Torres-González *et al.*, 2016). Todavia, os compostos fenólicos e os terpenoides têm sido considerados os principais constituintes bioativos da mesma (Cunha, 2001; Sawaya *et al.*, 2006).

Baseado na necessidade de correlacionar a constituição química e a atividade biológica, foi realizado o *fingerprint* por ionização direta das amostras em *eletrospray* em modo negativo (ESI(-)-MS) afim de verificar o perfil químico das amostras (EHAGP, FHGP, FAEGP, FBGP) da geopropolis de *M. mondury*. O modo negativo é adequado para analisar os componentes polares e ácidos das amostras, o que foi levado em consideração para o estudo

da geoprópolis, já que a maioria dos componentes encontrados na própolis e geoprópolis são compostos polares, principalmente os compostos fenólicos (Marcucci *et al.*, 1995; Bankova *et al.* 1998; Velikova *et al.* 2000; Dutra *et al.*, 2014).

Observou-se que a maioria dos constituintes está presente em todas as amostras, o que era esperado já que as amostras foram fracionadas partindo do extrato bruto. Os íons $[M-H]^-$ mais abundantes nos espectros de massas foram os íons em m/z 601, 475 e 569 e suas distribuições parecem ser diferentes no extrato e frações. Esse fato sugere diferenças nas concentrações dos metabólitos correspondentes aos íons, o que pode explicar a diferença no potencial biológico de cada amostra nos ensaios propostos. Outros íons de menor intensidade foram observados nos espectros de massas de todas as amostras como os íons em m/z 301, 373, 401, 569. Aparentemente, o íon com m/z 475 apareceu apenas no espectro da fração acetato de etila (Figura 5).

Para complementar os dados obtidos no *fingerprint* foi feita uma análise cromatográfica por UPLC-MS e UPLC-MS/MS considerando os principais íons observados no mesmo. Os resultados são apresentados na Tabela 5. A identificação dos compostos da geoprópolis de *M. mondury* foi realizada comparando a relação massa/carga (m/z) e o modo de fragmentação dos íons observados nas amostras de geoprópolis com aqueles encontrados na literatura. Os cromatogramas obtidos nos estudos estão apresentados como anexo ao final do trabalho.

Em estudos anteriores de amostras de própolis de abelhas nativas de diferentes regiões do Brasil foram encontrados íons de m/z 373 e 401 que são diagnósticos para amostras de própolis derivadas da resina de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira vermelha), sendo atribuídos aos triterpenos presentes nesta espécie vegetal (Sawaya *et al.*, 2006; Sawaya *et al.*, 2007; Cottica *et al.*, 2011). As amostras da geoprópolis de *M. mondury* possuem estes mesmo íons, o que sugere que esta abelha também coleta resina em *S. terebinthifolius*, popularmente conhecida como “aroeira-vermelha”. No Brasil, esta espécie ocorre naturalmente na costa litorânea, em áreas remanescentes da mata atlântica (Santos *et al.*, 2007; Cavalher-Machado *et al.*, 2008), que também é uma área de ocorrência da *M. mondury* (Souza *et al.*, 2012) e tem como principais constituintes químicos compostos fenólicos, triterpenos, esteroides, antraquinonas e saponinas (Lloyd *et al.*, 1977; Lima *et al.*, 2006; Sawaya *et al.*, 2007). O ESI(-)-MS/MS dos compostos com íons em m/z 373 e 401 (composto 2 e 3) mostra uma perda neutra de 44 (CO_2), que é frequente de ácidos orgânicos no modo negativo e indica que os compostos referentes a estes íons podem ser relacionados com terpenos contendo a função ácido carboxílico ligados a grupos ácidos (Sawaya *et al.*, 2006).

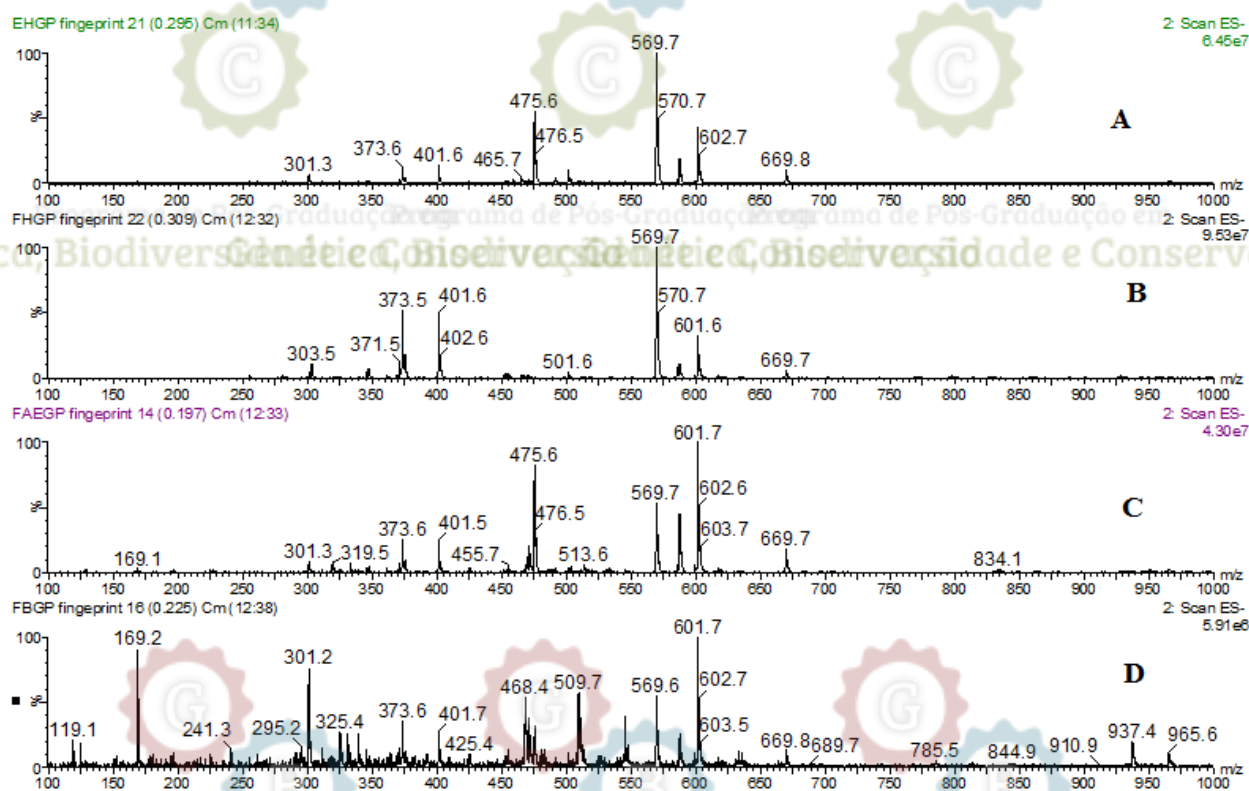


Figura 5: Principais íons observados no *Fingerprint* obtidos por ESI-MS em modo negativo das amostras de geoprópolis: **A-** EHAGP (extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. mondury*); **B-** FHGP (Fração hexânica da geoprópolis de *M. mondury*); **C-** FAEGP (Fração acetato de etila da geoprópolis de *M. mondury*) e **D-** (Fração butanólica da geoprópolis de *M. mondury*)

O constituinte com íon em m/z 301 foi presente em todas amostras analisadas e também já foi encontrado em *Myrcia bela*, uma espécie da família Myrtaceae (Vareda *et al.*, 2014), que é fonte de resina para a *M. mondury* (Lopes, 2014). Este íon é compatível com o ácido *E/Z* comúncio, que já foi identificado em amostras de própolis brasileira e em resinas de *Araucária heterophylla* (Bankova *et al.*, 1999; Sawaya, 2006). O espectro obtido por ESI(-)-MS/MS para o ácido *E/Z* comúncio apresentou íons em m/z : 301, 220 e 205, os quais também foram encontrados no ESI(-)-MS/MS do íon m/z 301 da geoprópolis de *M. mondury*. Este resultado indica a presença deste ácido nas amostras de *M. mondury*. O ácido *E/Z* comúncio pertence à classe dos diterpenos, a qual são atribuídas diversas propriedades farmacológicas como antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (Carman *et al.*, 1970; Tanaka *et al.*, 2000; Velikova *et al.*, 2000; Trusheva *et al.*, 2003; Liu & Nair, 2011; Campos *et al.*, 2015).

O constituinte com íon em m/z 601 ainda não foi reportado em amostras de geoprópolis na literatura, porém, já foi encontrado em própolis vermelha de várias regiões do

Brasil caracterizando presença de benzofenonas (Trusheva *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2011; Ischida *et al.*, 2011). Estas benzofenonas também foram encontradas em amostras de geoprópolis de *Melipona scutellaris* da Bahia (Cunha *et al.*, 2013) e são associadas à atividade antimicrobiana de amostras de própolis da região amazônica (Ishida *et al.*, 2011).

Não foi encontrado na literatura nenhum metabólito correspondente aos íons $[M-H]^-$ em m/z 475 e 569 nas amostras de geoprópolis, portanto, esses íons podem ser referentes a um componente típico da região onde a *M. mondury* habita. Há uma possibilidade, portanto, destes compostos estarem relacionados com a atividade citotóxica da geoprópolis já que as frações que contém sua presença apresentaram excelente atividade nesse ensaio (Tabela 5).

Tabela 5: Principais íons observados no *fingerprint* obtidos por ESI-MS em modo negativo e padrão de dissociação de compostos encontrados nas amostras de geoprópolis de *M. mondury*.

Compostos	$[M-H]^-$	Principais fragmentos m/z	Amostras
Ácido E/Z comúnicico	301	301, 220, 205, 109	Todas
02	373	373, 329	Todas
03	401	401, 356	EHAGP, FHGP, FAEGP
04	475	475, 407, 390, 347, 322	EHAGP, FAEGP
05	475	475, 407, 390, 347, 322, 169	EHAGP, FAEGP
06	475	475, 390	Todas
07	569	569, 490, 395, 327, 120	EHAGP, FHGP, FAEGP
08	601	601, 550, 369, 109	Todas

EHAGP (extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. mondury*); FHGP (Fração hexânica da geoprópolis de *M. mondury*); FAEGP (Fração acetato de etila da geoprópolis de *M. mondury*) e FBGP (Fração butanólica da geoprópolis de *M. mondury*)

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram pela primeira vez algumas das propriedades biológicas e caracterização química da geoprópolis produzida por *Melipona mondury*, evidenciando que a mesma possui potencial terapêutico na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com base inflamatória e/ou oxidativa bem como aquelas de caráter infeccioso causadas por bactérias Gram positiva e negativa. Além disso, a geoprópolis também demonstrou potencial citotóxico contra duas linhagens celulares tumorais HL-60 (leucemia prómielocítica) e HEPG2 (carcinoma hepatocelular), mas aparentemente inerte em células normais (fibroblastos de Hamster V79), muito embora esses dados necessitem ser melhor explorados.

Pôde-se perceber diferenças nas atividades biológicas entre geoprópolis de outras espécies de abelhas e de outras regiões com a geoprópolis de *M. mondury*, o que indica que a variação da espécie e do local de coleta de resina é um fator de influência na atividade da geoprópolis. Diferenças nas atividades biológicas também foram demonstradas entre extrato e frações da geoprópolis de *M. mondury*, uma vez que os compostos são distribuídos nas frações de acordo com sua polaridade.

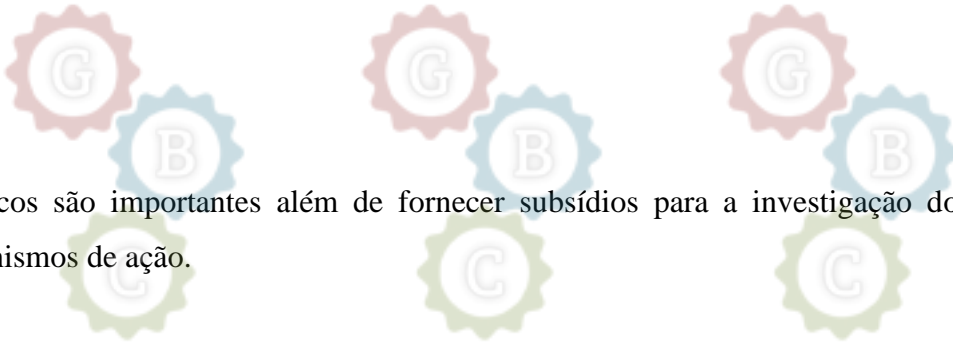
Os resultados também sugerem que a *M. mondury* utiliza a planta *Schinus terebinthifolius* como fonte de resina, pois os terpenos já identificados nesta planta também foram observados na geoprópolis de *M. mondury* por ESI-MS de alta resolução. Além disso, o ácido *E/Z* comunico, presente em outras amostras de geoprópolis, está presente nas amostras de geoprópolis de *M. mondury*, e a presença deste diterpeno pode estar relacionada com as atividades antibacterianas e citotóxicas aqui relatadas.

Não foi encontrada na literatura nenhum metabólito correspondente aos íons [M-H]⁻ em *m/z* 475 e 569, o que sugere que estes íons possam se referir a um componente típico da região onde a *M. mondury* ocorre, contudo, esse fato ainda não foi confirmado.

Adicionalmente, observa-se a necessidade da conservação das abelhas e das plantas que as mesmas utilizam como recursos tróficos, e ainda o desenvolvimento de mais estudos e palestras sobre a importância dessa conservação, para que assim possa-se manter a biodiversidade de abelhas sem ferrão e de seus habitats naturais, por questões ecológicas e da própria geração e distribuição da renda para população através da meliponicultura e produção de geoprópolis.

Finalmente, para fundamentar as propriedades farmacológicas e toxicológicas demonstradas pela geoprópolis *M. mondury*, a identificação e isolamento dos compostos

químicos são importantes além de fornecer subsídios para a investigação dos respectivos mecanismos de ação.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, SA.; GOGAL, RM.; WALSH, JE. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, vol.170, p.211 – 224.

AHN, J.; GRÜN, IU.; MUSTAPHA, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology London*, vol. 24, p. 7-14.

ALENCAR, SM.; OLDONI, TLC.; CASTRO, ML.; CABRAL, ISR.; COSTA-NETO, CM.; CURY, JA.; ROSALEN, PL.; IKEGAKI, M.; 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, Vol. 113, no. 2, p. 278-283.

ALVES, CQ.; DAVID, JM.; DAVID, JP.; BAHIA, MV.; AGUIAR, RM. 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, São Paulo. Vol.33, no.10, p.2202-2210.

BANKOSTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of própolis. *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 7, p. 561–571.

BANSKOTA AH, TEZUKA Y, ADNYANA IK, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K, KADOTA S. 2001.Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, vol. 8, p. 16–23.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI M. C.; POPOV, S. 1998. Constituents of brazilian geopropolis. *Z. Naturforsch*, vol. 53, p. 402- 406.

BANKOVA, V.; BOURDOROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, JM.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. 1999. Phytochemical evidence for the plant oringin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Zheitschrift für Naturforschung*, vol.54 C, p. 401-405.

BANKOVA V, CASTRO SL, MARCUCCI MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, vol. 31, p. 3–15.

BANKOVA V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2, p. 29–32.

BEGNINI, KR.; LEON, PMM.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, VF.; RODRIGUES, FM.; BORSUK, SIBELE ; DELLAGOSTIN, O.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, FRANCINE FERREIRA ; COLLARES, T.; HENRIQUES, JAP.; SEIXAS, FK . 2014. Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)* , v. 2014, p. 1-13.

BEVERIDGE, TJ. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, vol. 181, no. 16, p. 4725-4733.

BORGES, KS.; BRASSESCO, MS.; SCRIDELI, CA.; SOARES AEE.; TONE, LG. 2011. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2, p. 310–314.

BORGUINI, RG. 2006. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. São Paulo: Universidade de São Paulo. Dissertação de doutorado em saúde pública. 178 p.

BOYE, K.; BARTELS, MD.; ANDERSEN, IS.; MOLLER, JA.; WESTH, H. 2007. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *Clinical microbiology and infection*, Vol. 13, p. 725-727.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, ME.; BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, London, Vol. 22, p. 25-30.

BRAKSTAD, O.; KJETILL, A.; MAELND JA. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* Gene. *Journal of clinical Microbiology*, vol. 30, no. 7, p. 1654-1660.

BÚFALO, M.C., CANDEIAS, J.M.G., SFORCIN, J.M. 2009. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, p. 483-487.

CABRAL, ISR.; OLDONI, TLC.; PRADO, A.; BEZERRA, RMN.; ALENCAR, SMA.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, PL. 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quimica Nova*, vol.32, p. 47- 49.

CAETANO, ACS.; MELO, EA.; LIMA, VLAG.; ARAUJO, CR. 2009. Extraction of antioxidants from agro-industrial acerola waste. *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 12, no. 2, p. 155-160.

CAMPOS JF, DOS SANTOS UP, MACORINI LF, DE MELO AM, BALESTIERI JB. 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chemistry and toxicology*, vol. 65, p. 374-380.

CAMPOS, JF.; SANTOS, UP.; ROCHA, PS.; DAMIÃO, M J.; BALESTIERI, JBP.; CARDOSO, CAL.; PAREDES-GAMERO, EJ.; ESTEVINHO, LM.; DE PICOLI SOUZA, K.; SANTOS, EL. 2015. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)*, vol. 2015, p. 1-11.

CARMAN, R.M.; COWLEY, D.E.; MARTY, R.A. 1970. Diterpenoids. XXV. Dundathic acid and polycommunic acid.. *Australian Journal of Chemistry*, vol. 23, p. 1655–1665.

CAVALHER-MACHADO, SC.; ROSAS, EC.; BRITO, FA.; HERINGE, AP.; OLIVEIRA, RR.; KAPLAN, MA.; FIGUEIREDO, MR.; HENRIQUES, MG. 2008 The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, vol. 8, p. 1552-1560.

CHABNER B. A.; ROBERTS Jr, T. G. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 65.

CHOE, E.; MIN, DB. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 5, no. 4, p. 169-186.

CHUANCHUEN R, BEILINCH K, HOANG TT, BECHER A, KARKHOFF-SCHWEIZER RR, SCHWEIZER HP. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.45, no. 2, p.428-32.

CINEGAGLIA, NC.; BERSANO, PRO.; ARAÚJO, MJAM.; BÚFALO, MC.; SFORCIN, JM .2013. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)*, vol. 2013, p. 1-6.

COTTICA.; SM; SAWAYA.; ACHF; EBERLIN .; MN; FRANCO.; SL; ZEOULA.; LM; VISENTAINER.; JV. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, no. 5, p. 929-935.

CUNHA, BA. 2001. Antibiotic side effects. *Medical Clinics of North America*, vol. 85, p. 149-185.

CUNHA, MG.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, LCC.; RUIZ, ALTG.; CARVALHO, JE.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, SM.; KOO, H.; ROSALEN, PL. 2013. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol.13.Artigo 23.

CUNHA, MG.; ROSALEN, PL.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, SM.;IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, JA. 2016. Antiproliferative constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. *Planta Medica*, vol 82, p. 190-194.

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

CUSHNIE, TPT.; LAMB AJ. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 38, no. 2, p. 99–107.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agentes. 2012. *Current Opinion in Biotechnology*, vol.23, no.2, p. 174-181 .

DA SILVA, JFM; SOUZA, MC; MATTA, SR; ANDRADE, MR; VIDAL, FVN. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian própolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food chemistry*, vol. 99, p.431-435.

DAUGSCH, A.; MORAES, CS.; FORT, P.; PARK, YK. 2008. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 435–441.

DE OLIVEIRA, AC.; VALENTIM, IB.; GOULART, MOF.; SILVA, CA.; BECHARA, EJM.; TREVISAN, MTS. 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, vol. 32, no. 3, p. 689-702.

DUALIBE, SAC.; GONÇALVES, AG.; AHID FJM. 2007. Effect of a propolisextract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *Journal of Applied Oral Science*, vol. 15, no. 5, pp. 420-423

DUARTE-ALMEIDA JM, NOVOA AV, LINARES AF, LAJOLO FM, GENOVESE, MI. 2006. Antioxidant Activity of Phenolics Compounds From Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol.61, no.4, p.187-192.

DUTRA RP, ABREU BV, CUNHA MS, BATISTA MCA, TORRES LMB, NASCIMENTO FRF, RIBEIRO MNS, GUERRA RNM. 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and

antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 62, no. 12, p. 2549-2557.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. *In vitro* antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 47, p. 4894-4898.

FRANCHIN M, CUNHA MG, DENNY C, NAPIMOGA MH, CUNHA TM, KOO H, ALENCAR SM, IKEGAKIM, ROSALEN PL. 2012. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . Journal of Ethnopharmacology, vol. 143, no. 2, p. 709-715.

FRANCHIN, M, CUNHA, MG, DENNY, C, NAPIMOGA, MH, CUNHA, TM, KOO, H, ALENCAR, SM, IKEGAKI, M, ROSALEN, PL. 2013. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, p. 1-9.

FUENTEFRIA, DB.; FERREIRA, AE.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, vol. 41, no. 5.

GHISALBERTI, EL. 1979. Propolis: A review. Bee World, vol. 60, p. 59-84.

HALLIWELL B AND GUTTERIDGE JMC. 2006. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition. Oxford: Clarendon Press.

HANSEN, MB.; NIELSEN, SE.; BERG K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/ cell kill. Journal immunological methods, vol. 10, pag. 119-203.

HASLAM, E. 1996. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. Journal of Natural Products, vol. 59, no. 205.

HAYACIBARA, MF.; KOO, H.; ROSALEN, PL.; DUARTE, S.; FRANCO, EM.; BOWEN, W.H., IKEGAKI, M.; CURY, J.A. 2005. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, p. 110-115.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, p.3590–3595.

HU, F.; HEPBURN, HR.; LI, Y. CHEN, M.; RADLOFF, SE.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacol.*, v.100, p. 276-283, 2005.

INCA. Estimativa 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> >>. Acesso em 14 de janeiro de 2016.

INCA. Estimativa 2016. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> >. Acesso em 14 de janeiro de 2016.

ISHIDA, VFC.; NEGRI, G.; SALATINO A.; BANDEIRA MFCL. 2011. A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food chemistry*, vol. 125, p. 966-972.

KERR, J.T. 1997. Species richness, endemism, and the choice of areas for conservation. *Conservation Biology*, Vol. 11, p. 1094-1100.

KERR W. 1987. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Informe Agropecuário*, vol. 13, p.15-27.

KOHEN, R, NYSKA, A. 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, vol. 30, no.6, p. 620-650.

KRINSKY, NI. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* journal, vol.7, p. 617-635.

KRINSKY, NI. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, vol.66, p. 1003-1010.

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

KUSKOSKI, EM.; ASUERO, AG.; TRONCOSO, AM.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de alimentos, Campinas*, vol. 24, no. 4, p. 726-732.

LIBÉRIO SA, PEREIRA ALA, ARAÚJO MJAM, DUTRA RP, NASCIMENTO FRF, MONTEIRO-NETO V, RIBEIRO MNS, GONÇALVES AG, GUERRA RNM. 2009. The potencial use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 125, p. 1-9.

LIBERIO, AS.; PEREIRA, ALA.; DUTRA, RP.; REIS, AS.; ARAÚJO, MJAM.; MATTAR, NS.; SILVA, L A.; RIBEIRO, MNS.; NASCIMENTO, FRF.; GUERRA, RNM.; MONTEIRO-NETO, V. 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11.P. 108.

LIMA, M.G. 2006. *A Produção de Própolis no Brasil*. São Sebastião Editora e Gráfica, São João da Boa Vista.

LIMA, MRF.; LUNA, JS.; SANTOS, AF.; ANDRADE, MCC.; SANT'ANA, AEG.; GENETJ, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. 2006. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 137-47.

LIN, CH.; CHANG, CY. 2005. Textural change and antioxidante properties of broccoli under different cooking treatments. *Food chemistry*, vol. 90, no. 1-2, p. 9-15.

LIU, Y. and NAIR, M.G. 2011. Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. *Food Chemistry*, vol.124, p. 527–532

LLOYD, H. A.; JAQUINI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F. 1977. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1301-1302.

LOPES, Z. S. 2015. Análise melissopalínológica e recursos polínicos utilizados por *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera: Apidae) na mata atlântica no estado da Bahia. Jequié: Universidade Estadual do sudoeste da Bahia. Dissertação de mestrado em genética biodiversidade e conservação. 110 p.

MARCUCCI MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, vol. 26, p. 83–99.

MARCO, G. J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, vol. 45, p. 594-598.

MELO, GAR. 2003. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae): 85-91. In: MELO, G. A. R & ALVES-DOS-SANTOS, I. (org). *Apoidea neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. UNESC. Criciúma, 320.p.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 2, p. 127-130.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, PR.; GIOVANAZ, DSH.; MÜLLER, G.; DELAMARE, APL.; PINTO DA COSTA, SO.; ECHEVERRIGARAY, S. 2005. Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, vol. 36, no.1.

MICHENER, CD.1999. The bees of the World. Johns Hopkins: University Press. 913 p. Baltimore.

MILLER, H. E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemist's Society, vol. 48, p. 91.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, vol. 65, pag. 55-63.

MOURE, JS. & MELO, GAR. 2013. Catalogo das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região neotropical- versão on-line. Disponível em: <<http://www.moure.cria.or.be/catalogue>. Acesso em 14.12.2015>. Acesso em 07 de janeiro 2016.

MUNDIM, GJ.; DEZENA, RA.; DE OLIVEIRA, ACS.; DA SILVA, PR.; CARDOSO, M.; PEREIRA, GA.; DE MORAES, CA.; TERRA, APS. 2003. Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, vol. 36, no. 6, p. 685-688.

NIKAIDO, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews, vol. 67, n. 4, p 593-656.

NIKI E. 2010. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology and Medicine journal, vol. 49, p. 503-515.

NOGUEIRA-NETO, P. 1997. Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão. São Paulo: Editora Nogueirapis, 445 p.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European journal of biochemistry, vol.267, p.5421 – 5426

OZKUL, Y; SILICI, S; ERÖGLU, E. 2004.The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture.Phytomedicine, vol. 12, p.742-747.

PAREDES-GUZMAN, JF.; AGUIAR, CL.; FUJIWARA, FY.; PARK, YK. 2003. Estudo das própolis que contém Artepillin C. Mensagem Doce, vol. 74, p. 9-16.

PARK, YK.; PAREDES-GUZMAN, JF.; AGUIAR, CL.; ALENCAR, SM.; FUJIWARA, FY. 2004 Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis.Journal Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, p. 1100-1103.

PEREIRA, AS; SEIXAS, FRMS; AQUINO NETO, FR. 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Química nova. Vol.25. p. 321-326.

PEREZ-HOTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. Journal of clinical microbiology, vol. 39, no. 11, p. 4037-4041.

PICCINELLI AL, DE SIMONE F, PASSI, S, RASTRELLI L. 2004. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea.Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.52, p. 5863-5868.

RAMALHO, M., KLEINERT-GIOVANNINI, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1990. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and Trigonini) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review, Apidologie, Vol. 21, P. 469–488.

RAMIREZ-TORTOZA C, ANDERSEN OM, GARDNER PT, MORRICE PC, WOOD, SG, DUTHIE SJ, COLLINS AR, DUTHIE GG. 2001. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin e depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine* journal, vol. 31, no. 9, p. 1033-1037.

RE R, PELEGRINI N, PROTEGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* journal, vol. 26, no. 9-10, p. 1231-1237.

RIBEIRO-JÚNIOR JA, FRANCHIN M, CAVALLINI ME, DENNY C, ALENCAR SM, IKEGAKI M, ROSALEN PL. 2015. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric oxide and Prostaglandine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, p. 1-5.

RIGHI, AA.; ALVES, TR.; NEGRI, G.; MARQUES, LM.; BREYER, H.; SALATINO, A. . 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, p. 2363-2370.

Rodeiro, I.; Cancino, L.; González, JE.; Morffi, J.; Garrido, G.; González, RM.; Nuñez, A.; Delgado, R. 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical toxicology*, vol. 44, pag. 1707-1713.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidencebased Complementary and Alternative Medicine*, vol.2, no.1, p.33-38.

SAMPAIO CPL, DIAS IM, FARIA FM, OLIVEIRA MVM. 2013. Principais bactérias causadoras de infecção hospitalar. *Revista Digital de Buenos Aires*. Vol. 10, p.182.

SANTOS, A.C.A. dos; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L. dos; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. 2007. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista brasileira de Biociências*, vol. 5, p. 1011-1013.

SAWAYA, ACHF. 2006. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de doutorado em Ciências(Química analítica) . 87 p

SAWAYA, ACHF.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C; RODRIGUES, RFO;EBERLIN, M. N. 2007. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera* Apidologie, vo. 37, p. 398-407

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; AIDAR, D. S.; SILVA, E. C. A.; CARVALHO, C. A. L.; EBERLIN, M. N. 2007. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. Apidologie, vo. 38, p. 93-103.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA , MH.; AND NIKLIŃSKI, J. 2012. “The anticancer activity of propolis,” Folia Histochemica et Cytobiologica, vol. 50, p. 25–37.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology, vol. 133, no. 2, p. 253-260.

SHAHIDI F, NACZK M. 1995. Food phenolics: souces, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing.

SHELDON JR. AT. 2003. Antibiotic resistance: who is winning the war? Introductory remarks. International Journal of Toxicology, vol. 22, p. 129-130.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. 2004. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 42, p. 181–188.

SILVA BB, ROSALEN PL, CURY J A, IKEGAKI M, SOUZA VC, ESTEVES A, ALENCAR SM. 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine, vol.5, no. 3, p. 313–316.

SILVA ECC, MUNIZ MP, NUNOMURA RCS, NUNOMURA SM, ZILSE GAC. 2013. Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees. *Química Nova*, vol. 36, no. 5.p. 628-633.

SILVEIRA, FA; MELO, GAR. & ALMEIDA, EAB. 2002. *Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte. 253p.

SLINKARD K and SINGLETON VL. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology Viticulture*, vol. 28:, p.49–55

SINGH, S.; GUPTA, AK.; VERMA, A. 2013.Review On-Natural Compounds Used For Antioxidant Activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, vol. 4, no. 2, p. 936.

SOUZA HAC, VIANA MVC, ALVES RMO, PEREIRA DV; WALDSCHMIDT AM. 2012. Distribution of *Melipona mondury* Smith1863 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) from state of Bahia. *Semana Entomológica da Bahia. Magistra, Cruz das Almas*, vol. 24, p. 99 – 104.

SOUZA SA, CAMARACA, SILVA EMS, SILVA TMS. 2013. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees.Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, p. 1-5.

SOUZA SA, DIAS TLMF, SILVA TMG, FALCÃO RA, ALEXANDRE-MOREIRAMS, SILVA EMS, CAMARA CA, SILVA TMS. 2014.Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, vol. 61, no. 4, p 560-565.

SZLISZKA, E., CZUBA, ZP., DOMINO, M., B. MAZUR, ZYDOWICZ, G AND W. KROL. 2009. “Ethanollic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells,” *Molecules*, vol. 14, no. 2, p. 738–754.

SZLISZKA, E., CZUBA, ZP.,BRONIKOWSKA, J., MERTAS, A., PARADYSZ, A AND KROL, W. 2011. “Ethanollic extract of propolis (EEP) augments TRAIL-induced apoptotic

death in prostate cancer cells”Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2011, 11 pages.

SZLISZKA, E and KROL, W. 2013. “Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells,” Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, 10 pages.

SZLISZKA, E.; LETOWYSKA, AS.; KUCHARSKA, AZ.; JAWORSKA, J.; CZUBA, ZP and KROL, W. 2013. Ethanol Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol.2013, 12pag.

TAGURI T, TAKASHI T, KOUNO, I. 2006. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. Biological & Pharmaceutical Bulletin, vol. 29, no. 11, p. 2226-2235.

TANAKA, R.; OHTSU, H.; IWAMOTO, M.; MINAMI, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; YOSHITAKE, A. 2000. Cancer chemopreventive agents, labdane diterpenoids from the stem bark of Thuja standishii (Gord.) Carr. Cancer Letters, vol.161, no. 2, p. 65–170

TING HC, HSU Y, TSAI C, LU F, CHOU M, CHEN W. 2011. The in vitro and in vivo antioxidant properties of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil. Food chemistry, vol.125, p. 652-659.

TORRES-GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ-RIVERA, P.; DUARTE-LISCI, G.; LÓPEZ-RAMÍREZ, A.; CORREA-BENÍTES, A & RIVERO-CRUZ, F. 2015. Analysis of volatile components from Melipona beecheii geopropolis from Southeast Mexico by headspace solidphase microextraction. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, em 6 de julho de 2015.

TOUFEN, JC.; HOVNANIAN, ALD.; FRANCA, SA.; CARVALHO, CRR. 2003. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. Revista do Hospital das Clínicas, vol. 58, no. 5, p. 254-259.

TRABULSI, LR e ALTERTHUM, F. 2005. Microbiologia. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 780P.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. Borror and De Long's Introduction to the study of insects. 2005. Belmont Thomson Brooks/Cole. 864 p.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKI, C.; SABATINI, A.G. 2003. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. Rivista Italiana EPPOS, vol. 36, p. 3–7.

URZÚA, A., REZENDE, M.C., MASCAYANO, C., VASQUEZ, L., 2008. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, vo.13, p. 882-891.

VAQUERO MJR, FERNÁNDEZ PAA, NADRA MCM, SAAD AMS. 2010. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 10, p. 6048–6052.

VELIKOVA, M., BANKOVA, V., MARCUCCI, M. C., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A. 2000a. Chemical Composition and Biological Activity from Brazilian Meliponiae. *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 55c, p. 785-789.

VELIKOVA M, BANKOVAA V, TSVETKOVAB I, KUJUMGIEVB A, MARCUCCIC MC. 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Phytotherapie*, vol. 71, no. 6, p. 693-696

WILMS, W., WENDEL, L., ZILIKENS, A., BLOCHSTEIN, B., ENGELS, W. 1997. Bees and other insects recorded on flowering trees in a subtropical Araucaria forest in southern Brazil. *Studies of Neotropical Fauna & Environment*, vol. 32, p. 220-226.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Day: Global action to avert 8 million cancer-related deaths by 2015. Genebra, 2006. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/en/index.html>> Acesso em: 20 de janeiro de 2015.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

ANEXOS



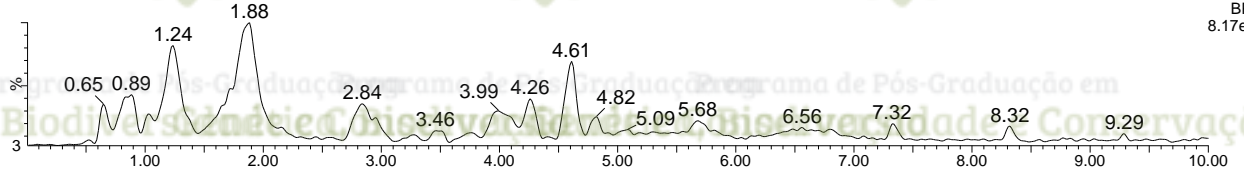
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



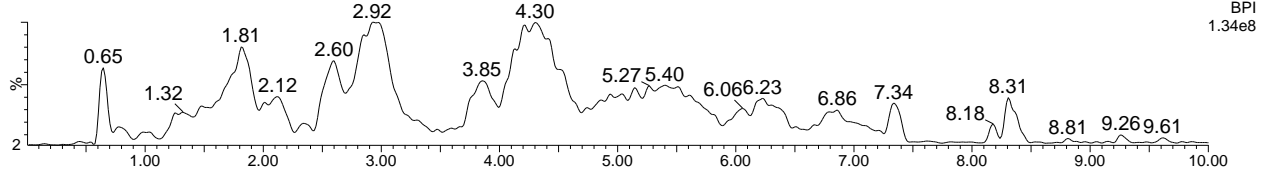
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

“CROMATOGRAMAS UHPLC-MS DAS AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS DE MELIPONA MONDURY”

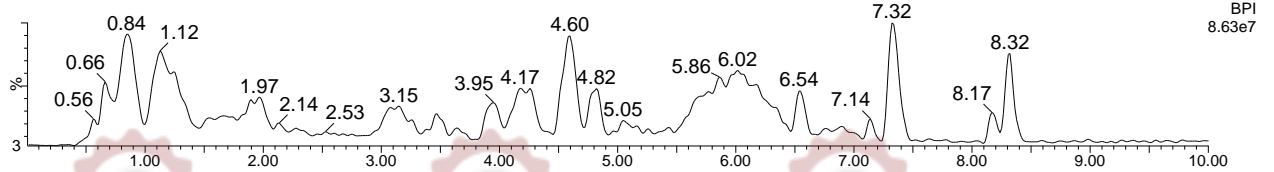
EHGP cromatograma 3



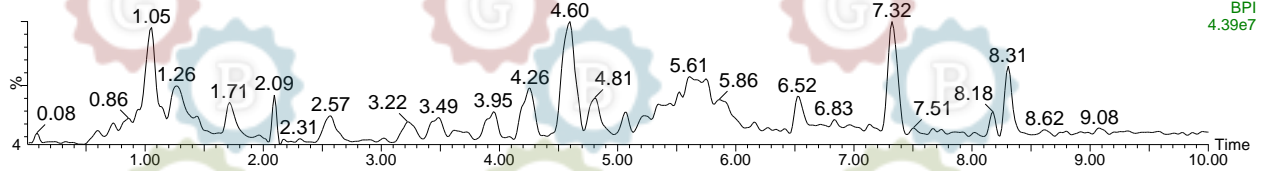
FHGP cromatograma 3



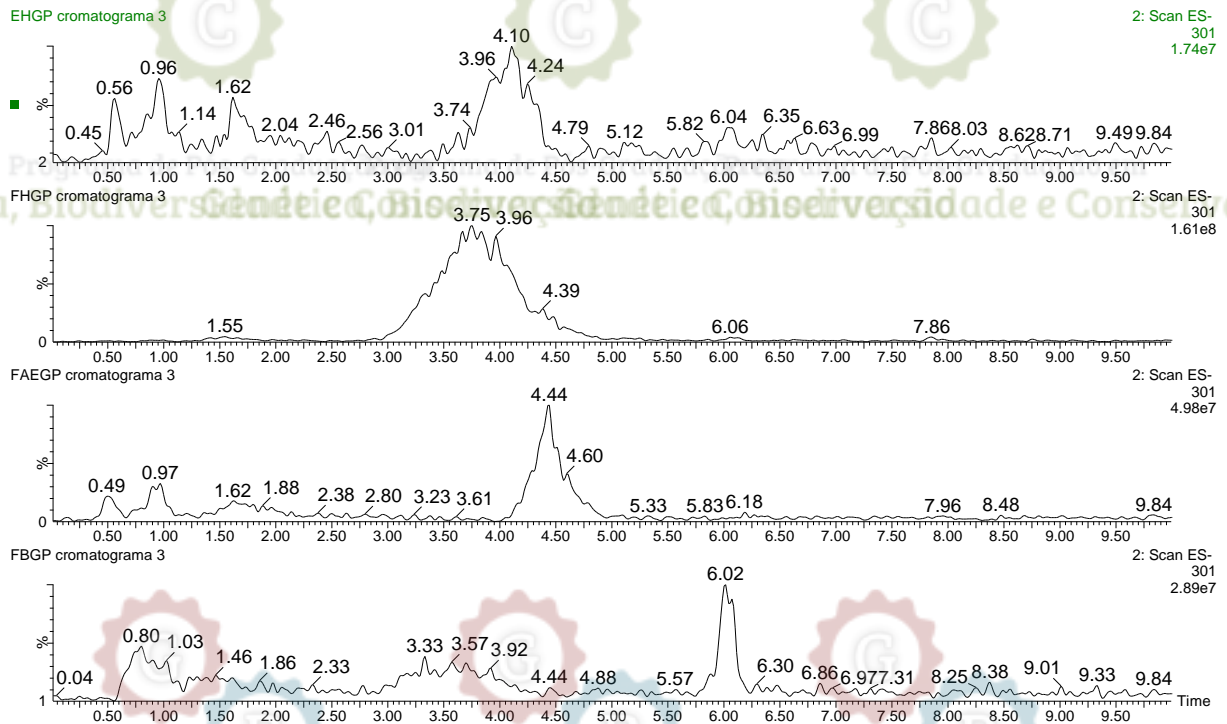
FAEGP cromatograma 3



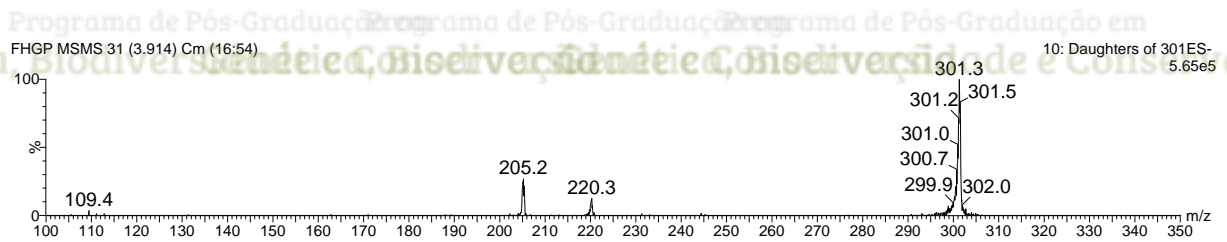
FBGP cromatograma 3



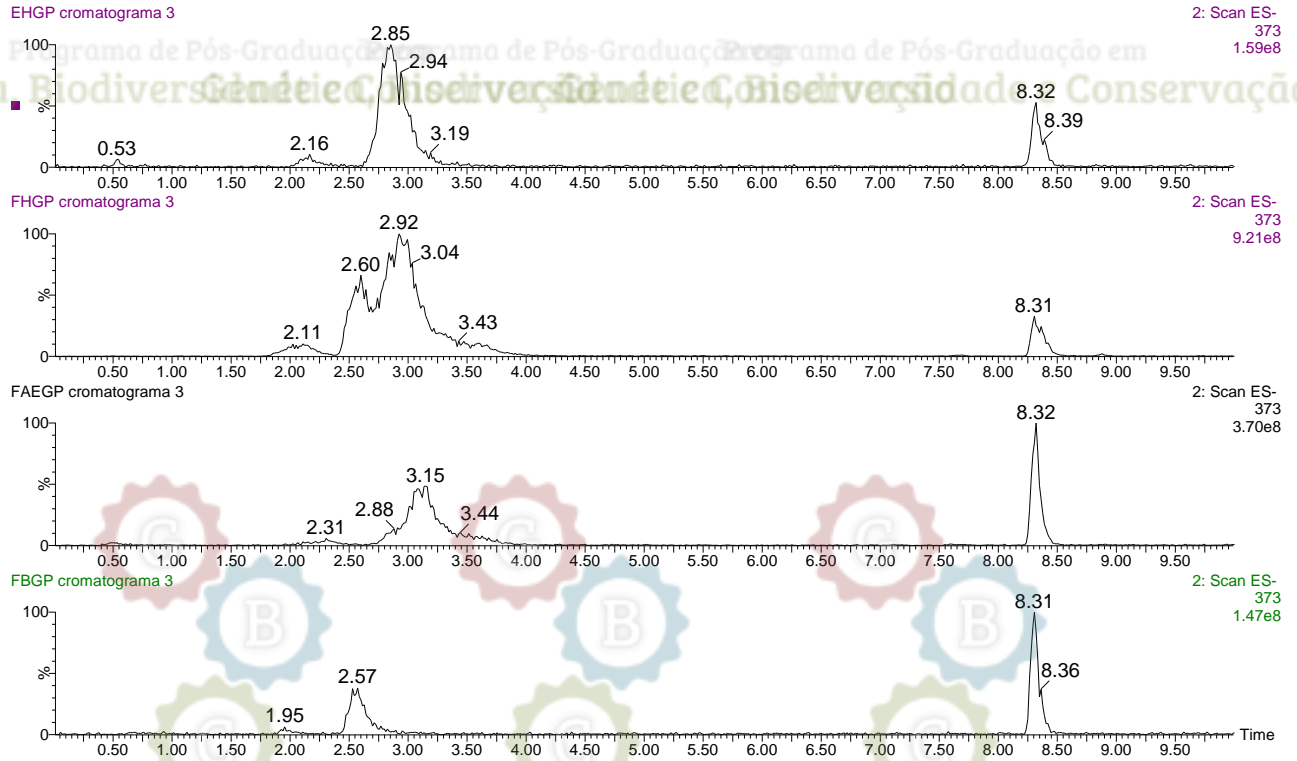
“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDO DO ÍON m/z 301”



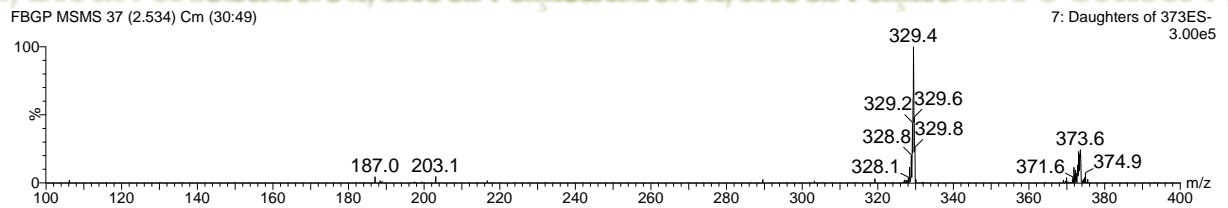
“ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”



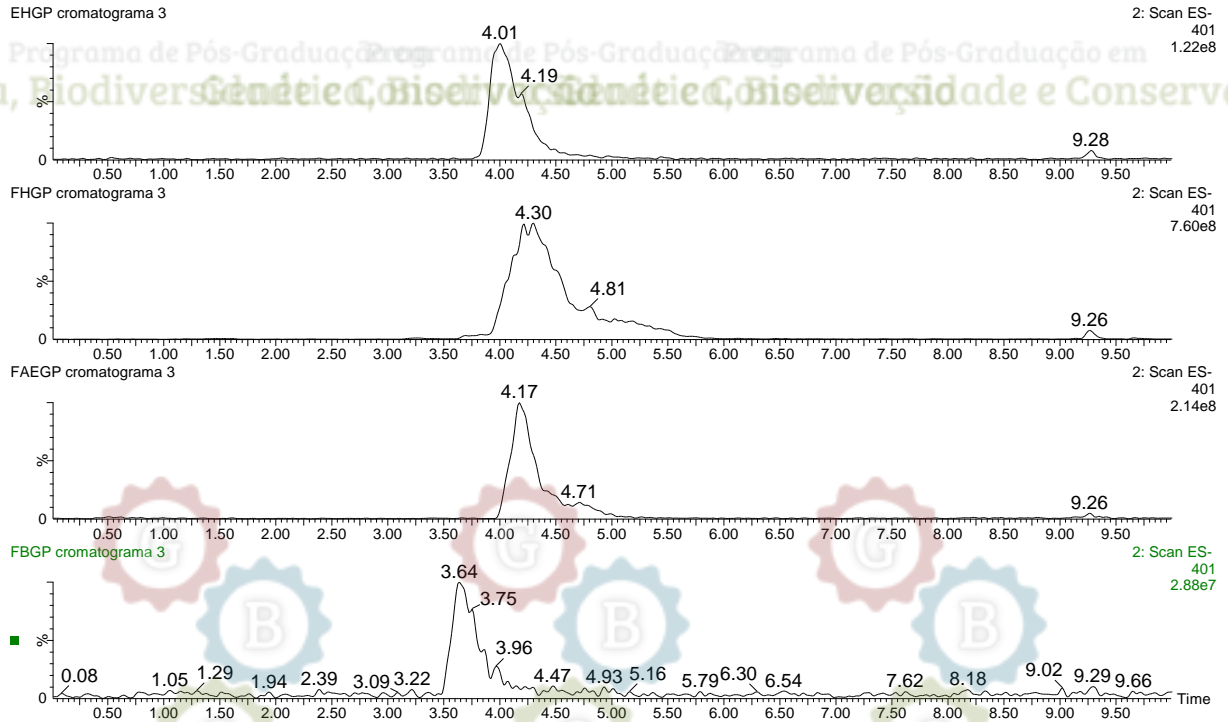
“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDO DO ÍON m/z 373”



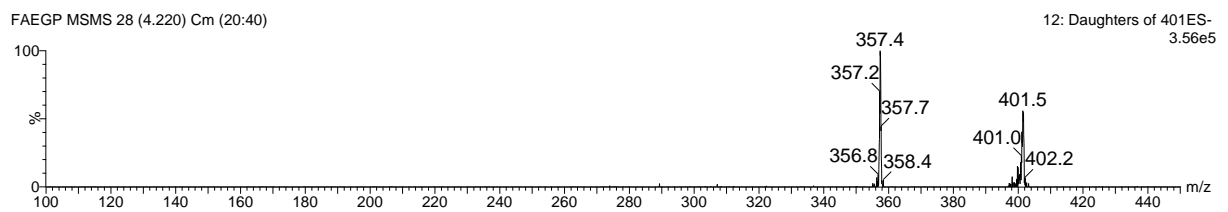
“ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”



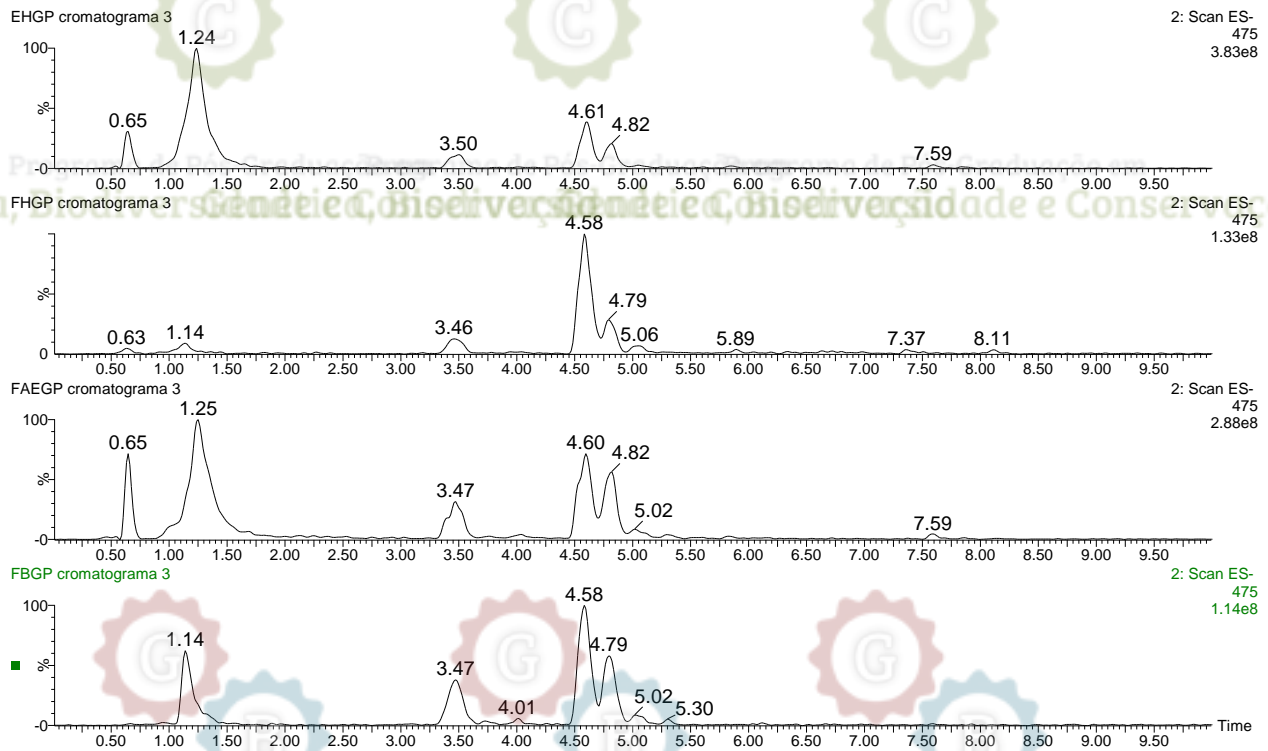
“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDO DO ÍON m/z 401”



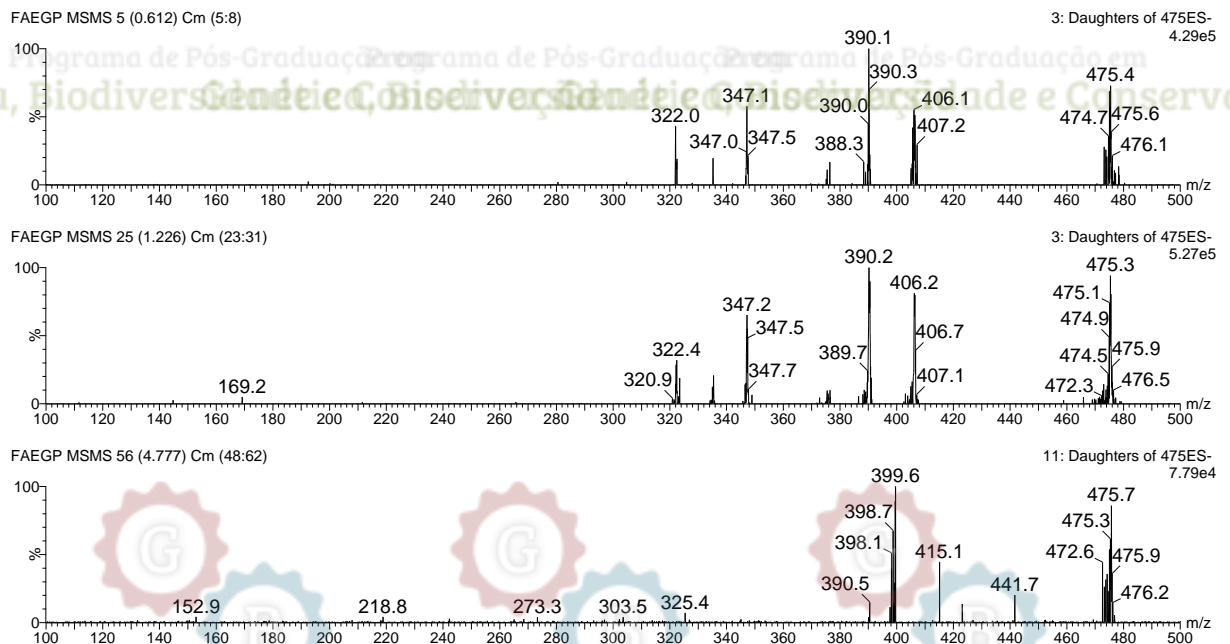
“ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”



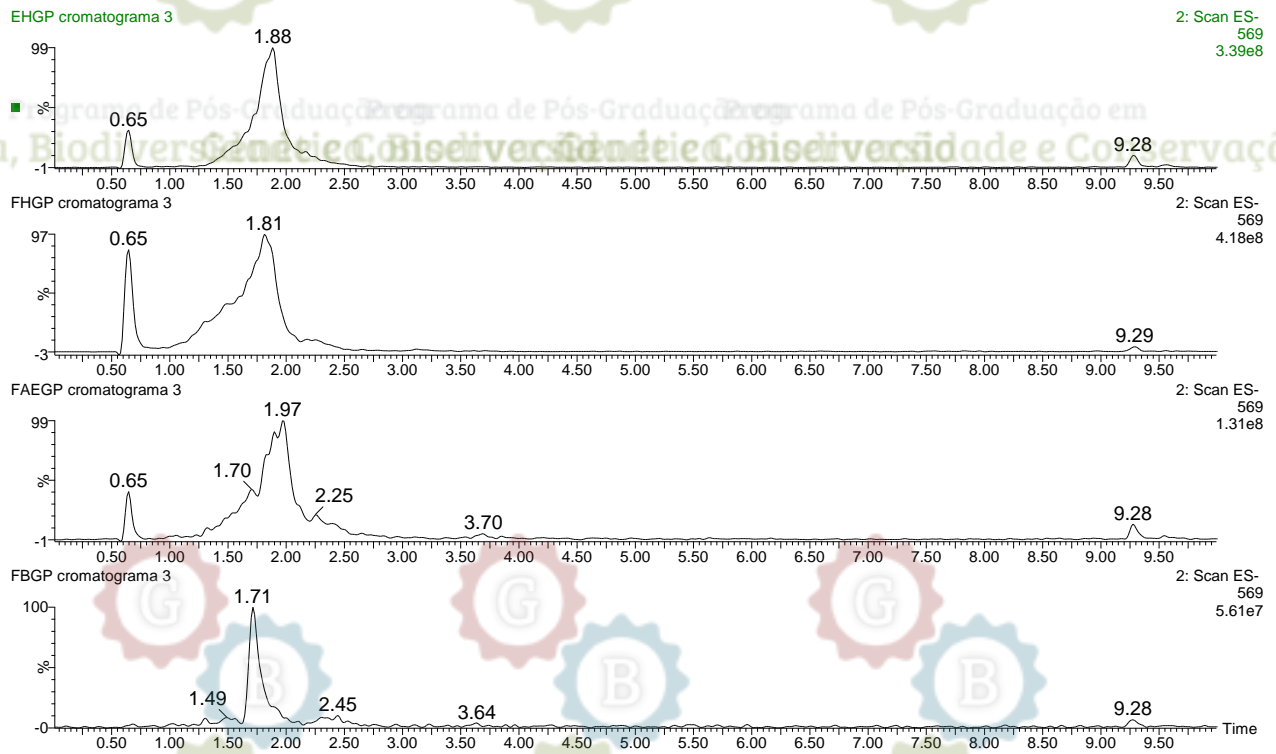
“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDOS DO ÍON m/z 475”



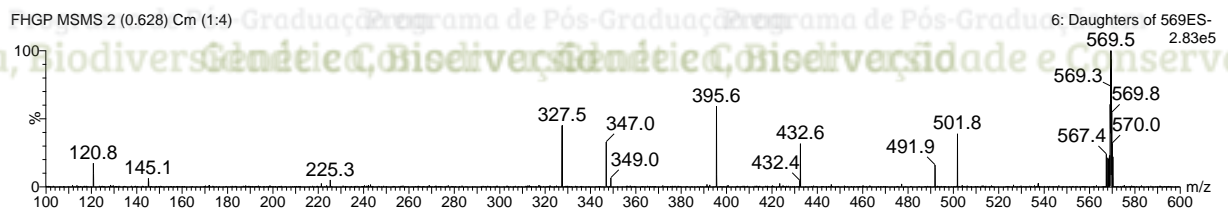
“ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”



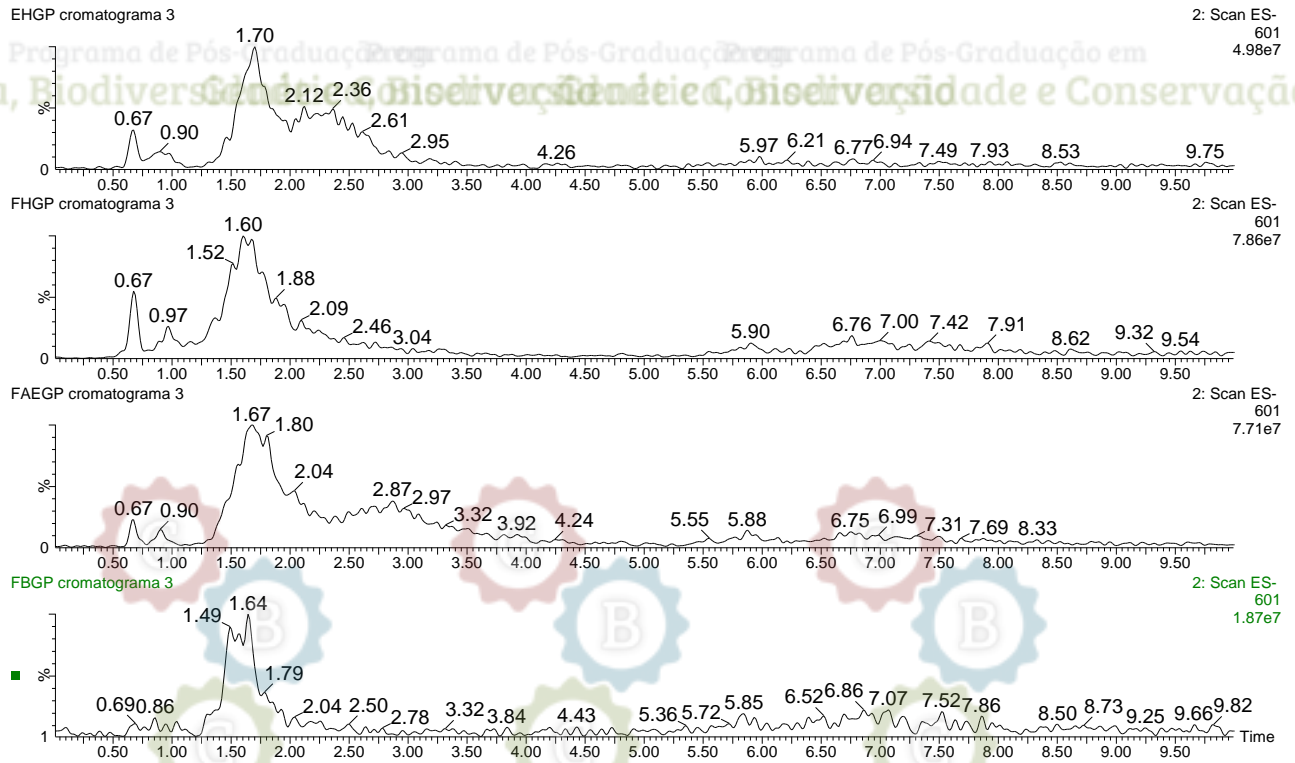
“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDO DO ÍON m/z 569”



“ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”



“CROMATOGRAMA DOS ÍONS EXTRAÍDO DO ÍON m/z 601”



“ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO ESI(-)-MS/MS”

