

**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
SUL DE MINAS GERAIS
Campus Inconfidentes

JENIFFER RAFAELA ALBANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA
MANDAGUARI (*Scaptotrigona postica*)**

INCONFIDENTES-MG

2016

JENIFFER RAFAELA ALBANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA
MANDAGUARI (*Scaptotrigona postica*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como pré-requisito para conclusão do curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidente, para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Ribeiro Corrêa

INCONFIDENTES-MG

2016

JENIFFER RAFAELA ALBANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA
MANDAGUARI (*Scaptotrigona postica*)**

Data da Aprovação 18 de outubro de 2016

**Prof. Dr. Wallace Ribeiro Corrêa
(IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes)
Professor Orientador**

**Profª Dra. Sindynara Ferreira
(IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes)
Membro 1**

**Prof. Dr. Rodrigo Palomo de Oliveira
(IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes)
Membro 2**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que mais uma etapa da minha vida esteja se concluindo, por me proteger todos os dias, pela força e coragem que sempre me proporciona, nunca me desamparando. Obrigada, Senhor, por sempre estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha mãe, que sempre me apoia em minhas decisões, sempre contribuindo e me ajudando de todas as formas, sendo elas possíveis ou até impossíveis. Mãe, obrigada por todos os sermões que me fizeram crescer e me tornar uma pessoa melhor cada dia, por todo o sacrifício que fez por mim e nossa família sendo um excelente exemplo de pessoa nos mais diversos aspectos. Meu maior orgulho é ser sua filha, obrigada!

Agradeço ao meu companheiro Weslei, que sempre me apoiou, ajudou-me, ouviu-me em momentos de cansaço e que nunca me deixou desistir, contribuindo imensuravelmente para tudo o que realizei e tudo o que sou em todos os aspectos da vida.

Agradeço a meus irmãos Jéssica e Jhoniffer, os quais sempre estiveram presentes ajudando-me em todas as formas em que houvesse necessidade, proporcionando-me diversos momentos de descontração e por nunca me deixarem desistir. Assim como fazem tudo por mim, sempre farei tudo por vocês.

Obrigada ao meu professor orientador Wallace Ribeiro Corrêa, pela confiança em mim depositada, cedendo-me esta oportunidade. Obrigada por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional, pela paciência e dedicação em todo o decorrer deste trabalho.

Obrigada ao professor Nilton, por transmitir tanta serenidade, assim me acalmando para realização do trabalho e pela enorme contribuição em todos os aspectos de minha formação.

Agradeço aos professores Sindynara Ferreira e Rodrigo Palomo de Oliveira pelo aceite a fazerem parte da banca avaliadora do presente trabalho.

Obrigada a todos os meus colegas da turma de Biologia de 2013 e a todos os amigos que estiveram presentes durante essa jornada acadêmica, por toda diversão, conversas e apoio em meio a tanto estudo e pressão.

Agradeço ao meu melhor amigo Lucas Milani, que está sempre junto a mim, me auxiliando de todas as formas possíveis. Obrigada por todas as conversas e companheirismo que teve comigo, por todo tempo que se dedicou a me ouvir e me aconselhar, agradeço pela verdadeira amizade.

Agradeço especialmente à amigas de laboratório, Roberta Souza, Suelen, Heloína Nathaliê, Tamiris Rocha e a todas as companheiras de laboratório, pelo apoio e imensa ajuda em todas as análises, por toda a paciência e por sempre poder contar com vocês. Muito obrigada. Agradeço também a Rita Tassiana, quem me ensinou todas as técnicas de laboratório e me ajudou de diversas formas, sendo como amiga ou academicamente.

Agradeço a todos os professores do IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes, pela contribuição em minha formação profissional e pessoal.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse projeto!

RESUMO

Abelhas sem ferrão da família Meliponinae produzem um propolís característico, conhecido como geoprópolis. Este possui uma grande variedade química, o que contribui para sua atividade farmacêutica. Este trabalho teve por objetivo realizar a avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana do extrato bruto etanólico (EBE) da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*, coletada na Fazenda - Escola do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes. Para a realização da atividade antioxidante, foi empregada a técnica DPPH, que consiste no sequestro de radicais livres, e Folin- Ciocalteu, sendo realizada a análise de compostos fenólicos totais. A atividade anti-inflamatória foi verificada pela desnaturação de proteína BSA (albumina do soro bovino), e a avaliação das Concentrações Biocidas Mínimas (CBM) foi realizada por meio da técnica de microdiluição em placas de 96 poços. O extrato demonstrou considerável atividade antioxidante, obtendo $IC_{50} = 210,55 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ em DPPH, podendo correlacionar o resultado antioxidante com o conteúdo de fenólicos totais solúveis $1,76 \text{ mg GAE/g}$, determinados pelo ensaio colorimétrico Folin Ciocalteu. Apresentou atividade antimicrobiana com CBM entre 1,0 e 0,5 mg/ml frente a linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas. Apresentou ainda atividade anti-inflamatória inibindo a desnaturação da proteína com $IC_{50} = 308,6 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$. Conclui-se que o EBE da geoprópolis de *Scaptotrigona postica* apresenta atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, possivelmente relacionada à sua composição fenólica, possibilitando futuros estudos.

Palavras-chave: Meliponinae, abelha sem ferrão, DPPH, Folin, BSA.

ABSTRACT

Bees without a sting from the Meliponinae family produce a propolis characteristic, known as geopropolis. It possess a large chemical variety, which contributes to its pharmaceutical activity. The aim of the present thesis is to conduct the evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the etanolic extract brut (EBE) from the geopropolis of the *Scaptotrigona postica*, collected on the Farm - School of the Federal Institut of Educaion, Science e Tecnology of the South of Minas Gerais - Campus Inconfidentes. For the execution of the antioxidant activity, it was used the DPPH technique, which consists on the capture of free radicals and Folin-Ciocalteu, where is carried out the analysis of total phenolic content . The anti-inflammatory activity was verified through the denaturalization of the BSA protein (Albumin of the bovine serum), and the evaluations of the Minimum Biocidas Concentrations were performed through the technique of micro-dilution on planchets of 96 shafts. The extract demonstrated considerable antioxidant activity, acquiring $IC_{50}=210,55\pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, that can correlate the antioxidants results with the contend of total soluble phenolic 1,76 mg GAE/g, determined by the calometric test Folin Ciocalteau. It was also exhibited antimicrobial activity with CBM between 1,0 and 0,5 mg/mL face bacterian lineages gram-positive and gram-negative. Another characteristic was the anti-infammatory activity inhibiting the protein denaturalization with $IC_{50}= 308,6\pm 2,3 \mu\text{g/mL}$. It was concluded that the EBE from the *Scaptotrigona postica* geopropolis exhibits antioxidant, antibicrobial and anti-inflammatory activities possibly due to its folitits composition, enabling future studies.

Key words: Meliponinae, stingless bee, DPPH, Folin, BSA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	Coleta da geoprópolis	14
2.2	Preparação do extrato etanólico	14
2.3	Ensaio para a avaliação da atividade antioxidante DPPH	14
2.4	Ensaio para a avaliação da atividade antioxidante Folin	15
2.5	Ensaio para avaliação de atividade anti-inflamatória	15
2.6	Ensaio para avaliação antimicrobiana.....	16
2.7	Análise estatística	17
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1	Avaliação da atividade antioxidante	18
3.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	21
3.3	Análise da atividade antimicrobiana.....	22
4	CONCLUSÃO	25
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise atividade antioxidante pelo ensaio DPPH do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*.....19

Figura 2 - Atividade anti-inflamatória *in vitro* pelo ensaio BSA do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*.....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de fenólicos solúveis totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH do extrato etanólico de *Scaptotrigona postica*.....19

Tabela 2 - Atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica* expressa em termos de Concentração Biocida Mínima, CBM (mg/mL), determinada pela técnica de microdiluição.....23

1 INTRODUÇÃO

Meliponinae é uma das quatro grandes subfamílias pertencentes à família Apidea, compreendida pela ordem Hymenoptera. No Brasil, esta apresenta o gênero *Melipona* e a tribo Trigonini. A subfamília Meliponinae, em sua maioria, é grande e robusta, entretanto, podem haver também abelhas de pequeno a médio porte. Um aspecto marcante é a atrofia ou ausência do ferrão, sendo estas características de regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Mais de 400 espécies de abelhas nativas são conhecidas no Brasil (NOGUEIRA - NETO, 1997; KERR, 1987).

Essas abelhas além de possuírem um importante papel de manutenção no ecossistema, sendo responsáveis de 40% a 90% da polinização, algumas são capazes de produzir a geoprópolis, que funciona como uma cola constituída de resinas, pólen, cera e terra ou barro, ou seja, é uma mistura de própolis e terra, sendo esta a sua única diferença entre a própolis produzida pelas abelhas *Apis mellífera*, segundo Nogueira - Neto (1953) citado Barth *et al.*, (2009). A própolis é utilizada para vedar frestas e até mesmo embalsamar invasores mortos, o que evita que eles se decomponham e causem doenças no ninho (GHISALBERTI, 1979; KERR, 1987). Quando se trata de seu aspecto físico, a geoprópolis apresenta-se como material rígido, de cor amarronzada escura, podendo haver fragmentos de diversos tamanhos e de sabor amargo (CUNHA *et al.*, 2009).

Os meliponíneos, também chamados de meliponídeos, dependendo da cultura local (COSTA, 2015) possuem o hábito de construir seus ninhos em ocos de árvores, cupins abandonados, além de ninhos expostos; com isso, o aumento do desmatamento tem levado a uma diminuição no número de espécies. Diversos estudos estão sendo realizados para conservação dos Meliponíneos (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIANA *et al.*, 2012; SILVEIRA

et al., 2002). A visibilidade da subfamília é pequena devido ao baixo inter econômico. A abelha *Apis mellifera* produz grande quantidade de mel; ante tal fato, estudos e investimentos estão mais voltados para elas. No entanto, o conhecimento sobre o mel produzido pelas abelhas sem ferrão tem se expandido, devido à ciência empírica, que aduz sobre seu valor medicinal (LOPES *et al.*, 2005).

Antigos conhecimentos chineses e egípcios, faziam uso de recursos naturais para controle de pragas e doenças (VIEGAS Jr *et al.*, 2006), levou pesquisadores a realizar estudos sobre produtos naturais com atividade biológica. A própolis produzida pela *Apis mellifera*, conhecida popularmente como abelha africana, foi grande alvo de estudos, relevando atividades farmacológicas satisfatórias em diversas áreas, como observadas por Park *et al.* (1998), Longhini *et al.* (2007) e Franchin *et al.* (2012).

A geoprópolis ainda é pouco estudada, entretanto, apresentou diversas atividades terapêuticas nas prospecções já realizadas, e por isso tem se destacado em trabalhos da área farmacológica. Pesquisas demonstraram sua efetividade antimicrobiana, frente a cepas de *Streptococcus mutans*, a bactéria causadora da cárie dentária (DUAILIBE *et al.*, 2007). Comprovou-se também a ação antioxidante em extratos de geoprópolis de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (SILVA *et al.*, 2013), na espécie *Melipona scutellaris* os extratos apresentaram ações anti-inflamatória e antinociceptiva (FRANCHIN *et al.*, 2012), e manifestou ainda atividade antitumoral, havendo a progressão do tumor de *Erlisch* em camundongos com o extrato da geoprópolis de *Scaptotrigona aff. postica* (ARAÚJO *et al.*, 2010). Suas atividades biológicas devem-se ao fato de apresentarem em sua composição uma diversidade de constituintes químicos como componentes majoritários os compostos fenólicos, a exemplo dos flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres de ácidos fenólicos (ALVES DE SOUZA *et al.*, 2013; BANKOVA *et al.*, 1998).

Apresentar novos agentes com potenciais farmacológicos é muito importante pois a disponibilidade de agentes quimioterápicos efetivos no campo terapêutico é limitada (SOARES; CURY, 2001; BISIGNANO *et al.*, 1999; PUJOL *et al.*, 1996). Os antibióticos já estão sendo utilizados há muito tempo, devido ao seu uso indiscriminado e constantemente pelo tempo equivocado, levou à resistência bacteriana; com isso, atualmente essa medicação possui menor eficácia frente a microrganismos patógenos, sendo necessários tratamentos

prolongados e com dificuldade de cura (TURCHETTI – MAIA., 2005; BACCARO *et al.*, 2002).

Aliados ao uso dos antibióticos estão os anti-inflamatórios, medicações capazes de neutralizar os efeitos de uma infecção como, por exemplo, a febre, que é uma resposta do corpo à ação dos microrganismos. No entanto, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) causam reações adversas à população, como complicações gastrointestinais, insuficiência renal e cardíaca, hipertensão arterial e acidente vascular cerebral (BATLOUNI, 2010).

Infecções e diversas complicações à saúde, como o câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras enfermidades, têm sido relacionadas ao estresse oxidativo. Condições essas, as quais a população é exposta diariamente, como a má alimentação, falta de exercícios, exposição à poluição e aos raios ultravioletas (UV), contribuem para o aumento de radicais livres, naturais do organismo, porém, em excesso trazem graves consequências (SILVA; JASIULIONIS, 2014; REIS *et al.*, 2008).

Ciente do crescente aumento da utilização de produtos naturais como adjuvantes terapêuticos, busca-se cada vez mais agentes naturais com tais propriedades. Com isso, o presente trabalho visa avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato da geoprópolis da *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), popularmente conhecida como Mandaguari.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DA GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis *in natura* foi coletada na Fazenda - Escola do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes, Inconfidentes/MG, em maio do ano de 2015. O material foi acondicionado em um recipiente térmico, e em seguida foi encaminhado ao laboratório de Biociências do IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes para preparação do extrato e análises.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

A geoprópolis foi macerada, pesada e acondicionada em *erlenmeyer*. Em seguida, foi submetida ao processo de maceração com solvente orgânico, etanol, na proporção massa de pó/solvente 1:20 (massa/volume). O solvente foi removido em evaporador rotatório sobre pressão reduzida para eliminação do solvente, assim obtendo o extrato bruto em etanol (EBE).

2.3 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é estável, de coloração púrpura e, quando reduzido, passa a ter coloração amarela. Neste ensaio, foi avaliada a capacidade das amostras-teste (EBE da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*) e amostra-padrão (EBE

própolis verde) de reduzir o radical DPPH. Para tanto, 2,6 mg da amostra foi dissolvida em etanol (um ml), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas, 6,25 a 200 ppm (partes por milhão), em etanol, e para cada amostra (10 µL) foram adicionados 50 µL de solução de DPPH (10 mg/ml). Decorridos 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, por comprimento de onda (λ) igual a 517 nm (nanômetro) e a porcentagem de atividade antirradical calculada (HUANG *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 1997). Como controle positivo, utilizou-se o flavonoide quercetina (40 ppm) e como controle negativo, o diluente (etanol). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FOLIN-CIOCALTEAU

A amostra foi analisada quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis, utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (PICCINELLI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004). Para tanto, foi pesado 2,6g de extrato e então solubilizado em etanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 6,25 e 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico) foi elaborada a curva analítica na concentração de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 ppm. A absorbância da amostra-teste e da amostra-padrão foi medida em espectrofotômetro ($\lambda = 730$ nm), e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de GAE/g). Como controle positivo, foi utilizado o flavonoide quercetina (40 ppm) e como controle negativo, o diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

No Laboratório de Biociências, a atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato bruto foi realizada utilizando-se a técnica de desnaturação de albumina BSA de acordo com Mizushima e Kobayashi (1968), com modificação. O ensaio baseia-se na capacidade de o extrato inibir a desnaturação da proteína (BSA), sendo a desnaturação de proteínas de tecido

uma das causas fortemente documentadas de doenças inflamatórias e artríticas (CHOPAIDE *et al.*, 2012).

Para tanto, 1,0 mg dos extratos foi dissolvido em 20 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) e 980 µL de tampão fosfato (pH 7,0), sendo obtida uma solução a 1 mg/ml. A solução estoque de BSA 10% foi obtida adicionando 10 µg de BSA em 100 mL de tampão fosfato (pH 7,0). Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços, onde as amostras-teste foram analisadas nas concentrações finais de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. O controle negativo foi obtido utilizando-se 20 µL de água destilada adicionado a 180 µL de solução BSA a 10%. O controle positivo foi obtido utilizando-se 1 mg de diclofenaco dissolvido em 1000 µL de tampão fosfato (pH 7,0) e fracionado em várias concentrações. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Após a montagem, a placa contendo as amostras-teste foi incubada a 37 °C por 15 minutos em uma estufa BOD; após, a desnaturação do BSA foi obtida mantendo a placa de microtitulação a 60 °C em um banho-maria durante 10 minutos. Após cinco minutos de resfriamento, procedeu-se à leitura em leitor de placas de 96 poços (absorbância no comprimento de onda de 660 nm). A percentagem de inibição da desnaturação proteica foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de inibição de desnaturação do BSA} = \frac{[(\text{Média de absorção do composto teste}) - 1] \times 100}{\text{Média de absorção do controle}}$$

2.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

O ensaio biológico *in vitro* frente a bactérias (gram-positivas e gram-negativas) foi determinado pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, seguindo a adequação de metodologia como descrita por Salvador (2005).

Para a execução dos ensaios, foram utilizadas como indicadoras bactérias, cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) e de campo; sendo: bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC35218), *Salmonella typhimurium* (St) – cepa de campo, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); gram-positivas *Staphylococcus*

aureus (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8-), *Staphylococcus aureus* (+7), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Bacillus subtilis* (Ct) – cepa de campo, cultivadas por 24 horas a 37⁰C em ágar *Müller Hinton* (MH). As cepas das indicadoras foram mantidas como culturas puras no laboratório de Biociências do IFSULDEMINAS – Campus Inconfidentes.

No método de microdiluição, utilizou-se em cada poço 50 µL de meio TSB (Tryptone Soya Broth), 50 µL de amostras-teste preparadas em propilenoglicol/água esterilizada (1:19, v/v) nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, ou dos controles experimentais e mais 10 µL de inóculo (suspensão de microrganismos em solução fisiológica a 0,9% esterilizada, numa concentração de 5.10⁶ UFC/mL). Os controles do inóculo e do meio também foram previstos.

Decorrido o período de incubação de 24 horas para bactérias, cada poço recebeu um inóculo de 20 µL de tetrazólio. Após um novo período de incubação a 37° C por cerca de 24 horas, a leitura foi realizada visualmente, comparando as amostras com os controles. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada cepa indicadora utilizada.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média das repetições, desvio-padrão da média e coeficiente de variação. Os dados obtidos foram analisados por meio do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software,1999) e Microsoft® Office Excel (Microsoft Corporation, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversas doenças crescentes na população como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e até mesmo doenças degenerativas como mal de Parkinson e mal de Alzheimer, vêm sendo relacionadas ao estresse oxidativo. Este é estabelecido como um distúrbio na produção de radicais livres em que sua desintoxicação é prejudicada, fazendo com que o corpo acumule esses radicais em suas células (SAYRE *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2008; HALLIWELL, 2007).

Passos (2010) afirmou que a utilização de antioxidantes naturais presentes em alimentos leva à redução dos processos de deterioração oxidativa, assim prevenindo doenças como câncer e envelhecimento precoce. Com isso, a busca de agentes naturais com potencialidade antioxidativa é crescente. A própolis constantemente vem apresentando resultados promissores em sua ação antioxidante que, segundo Bogdanov (2011), deve-se ao fato de possuírem em sua composição altas concentrações de compostos fenólicos.

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*, duas técnicas foram empregadas: Folin-Ciocalteu, que consiste na análise dos compostos fenólicos totais, e DPPH, que é um radical estável de cor púrpura, mas quando reduzido torna-se amarelado (HUANG *et al.*, 2005; PICCINELLI *et al.*, 2004).

O extrato etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica* apresentou atividade antioxidante, avaliado pelo ensaio indireto DPPH (Figura 1).

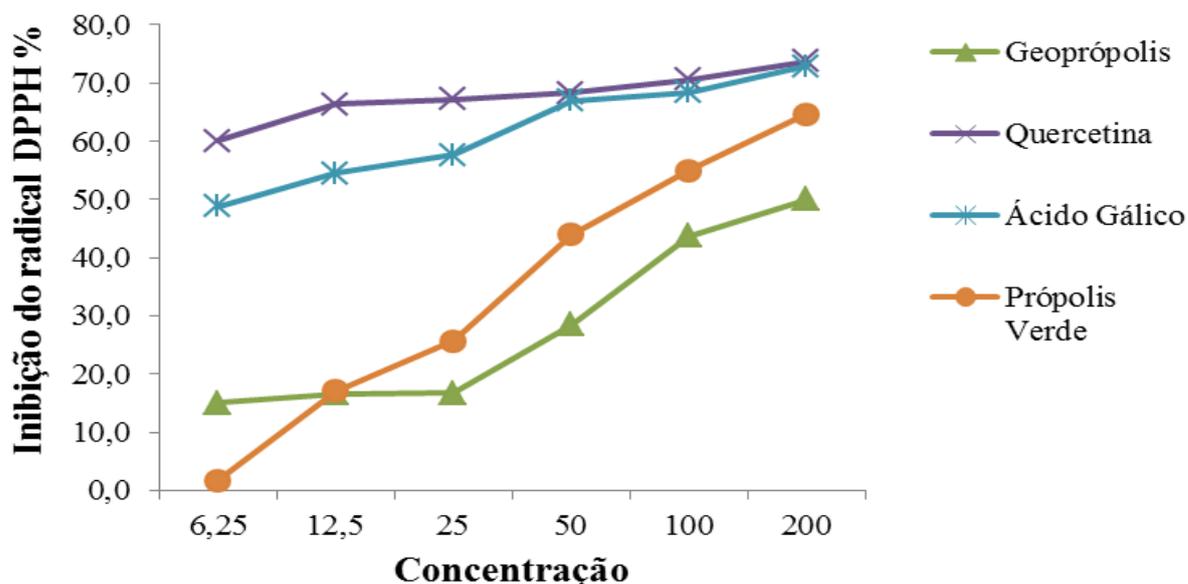


Figura 1– Análise da atividade antioxidante pelo ensaio DPPH do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*. IFSULDEMINAS – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG, 2016.

Foi determinado o IC_{50} (concentração que reduz em 50% o radical DPPH) do extrato, obtendo-se $IC_{50} = 210,55 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, possibilitando correlacionar o resultado antioxidante com o conteúdo de fenólicos totais solúveis $1,76 \text{ mg GAE/g}$, indicados pelo ensaio colorimétrico Folin Ciocalteau (Tabela 1).

Tabela 1 – Conteúdo de fenólicos solúveis totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH do extrato etanólico de *Scaptotrigona postica*.

Amostras	Conteúdo fenólico (mg GAE/g) ^b	Ensaio DPPH IC_{50} ^a ($\mu\text{g/mL}$) ^c
EBE Geoprópolis	1,76	210,55
Própolis verde	-	38,98

^aMédia (RSD%, desvio padrão relativo) de ensaios triplicata. ^bConteúdo de fenólicos solúveis totais expresso em miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de extrato (mg de GAE/g). ^cDados do ensaio DPPH expresso como IC_{50} (concentração que inibe 50% do radical DPPH) em microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$).

Pode-se destacar ainda que, quando comparado o extrato da geoprópolis ($IC_{50} = 210,55 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$) com o controle da própolis verde, observa-se um melhor desempenho antioxidante ($IC_{50} = 38,98 \mu\text{g/mL}$) da própolis verde.

Batista *et al.* (2016) apresentaram como altos os resultados antioxidantes em extratos de *Melipona fasciculata* de duas regiões do Estado do Maranhão. Relacionando as técnicas utilizadas DPPH e FRAP, foi possível concluir que os fenóis totais foram os responsáveis por sua ação antioxidante.

Em um estudo realizado por Costa (2015) empregando-se a técnica de transferência de hidrogênio $ORAC_{FL}$ para avaliação antioxidante, verificou que o extrato bruto etanólico (EBE) da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, obteve resultados promissores com a espécie por apresentarem satisfatórios valores de redução do radical.

Em resultados obtidos por Silva *et al.* (2013) ao analisar as atividades antioxidantes pelo sequestro de radicais livres DPPH de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra*, observaram que as amostras de *Melipona interrupta* apresentaram maior atividade antioxidante se comparadas ao extrato de *Melipona seminigra*, relacionando diretamente com as espécies vegetais visitadas por essas abelhas. Provavelmente, as espécies vegetais visitadas por elas apresentaram substâncias com atividade antioxidante. Tal fato vem a corroborar a afirmação de Bankova (2009) que a composição da própolis dependerá da flora local.

Souza (2016) buscando avaliar as atividades antinoceptiva e antifúngica, bem como o potencial antioxidante da geoprópolis de *Melipona subnitida*, conhecida popularmente como Jandaíra, empregando técnicas antioxidantes DPPH e Folin-Ciocalteu. Verificou que a atividade antioxidante foi diretamente relacionada com o conteúdo de fenólicos totais determinado pela técnica Folin-Ciocalteu.

Antioxidantes são importantes para a manutenção e prevenção de doenças, justificando assim a utilização da geoprópolis na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. A capacidade antioxidante dos produtos naturais está relacionada às substâncias de natureza polifenólicas (PICCINELLI *et al.*, 2004), questão evidenciada neste trabalho pela técnica de Folin Ciocalteu (fenólicos totais).

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

O método utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* consiste em analisar a porcentagem de inibição da desnaturação da proteína. Segundo Motta (2007) a desnaturação da proteína ocorre devido a fatores como aumento de temperatura, estresse mecânico, entre outros. Com isso, a proteína perde sua estrutura tridimensional, podendo ser secundária, terciária ou quaternária, mantendo somente as ligações peptídicas (estrutura primária). No entanto, proteínas necessitam de sua estrutura tridimensional para realização de suas funções, e as alterações ocasionadas pela desnaturação leva-as à perda parcial ou completa de sua função biológica. Quando o fator desnaturante é removido, as condições biológicas da proteína tendem a ser recuperadas. A desnaturação proteica de tecidos é uma causa documentada diante da ação inflamatória em doenças (CHOPADE *et al.*, 2012; BHASKAR; MOHITE, 2010).

Os resultados obtidos demonstraram que a geoprópolis de *Scaptotrigona postica* apresentou ação inibitória da desnaturação da proteína (BSA) em 57,08% em sua maior concentração 400 µg/mL, revelando assim potencial anti-inflamatório satisfatório, que, segundo Correa (2014) é atingido em valores acima de 50% de inibição (Figura 2). Foi determinado ainda o IC₅₀, estimando-se a concentração que reduz em 50% a desnaturação proteica. A amostra apresentou atividade inibitória com IC₅₀ de 308,6±2,3 µg/mL.

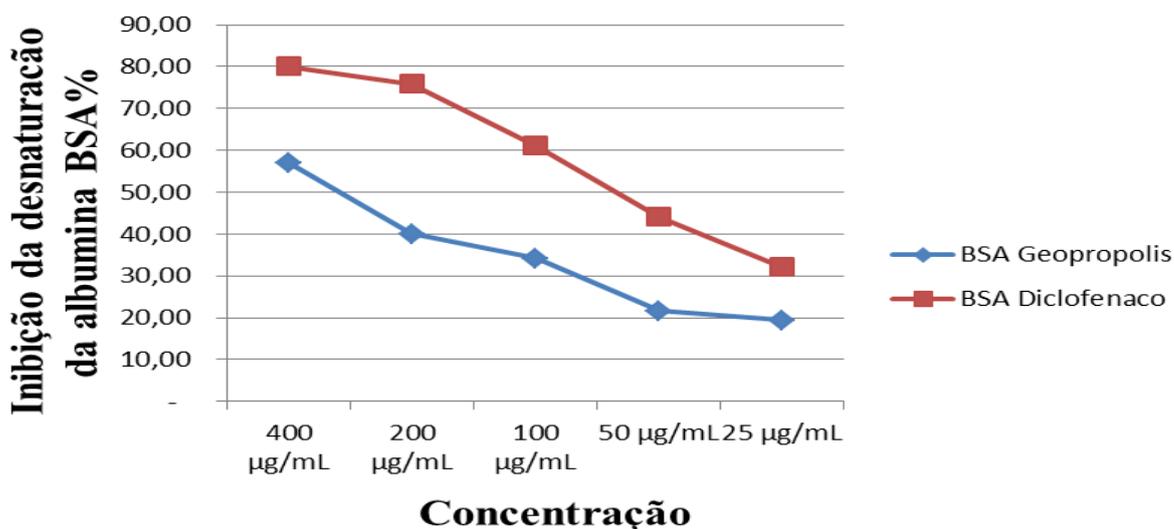


Figura 2 - Atividade anti-inflamatória *in vitro* pelo ensaio BSA do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*. IFSULDEMINAS – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG, 2016.

Reis *et al.* (2000) obtiveram resultados anti-inflamatórios empregando doses de extrato etanólico de própolis (EEP) em edemas provocados por carragenina em grupos de ratos. O estudo apresentou resultado positivo no experimento.

Costa (2015) objetivou avaliar as atividades antioxidante pela técnica ORAC, anti-inflamatória pela desnaturação da proteína, antimicrobiana pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços e o perfil ESI-MS da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, e verificou-se que o EBE apresentou 50% de inibição da desnaturação, corroborando a presente análise, onde o EBE da geoprópolis de *Scaptotrigona postica* também inibiu a desnaturação com valores acima de 50%. Estudos anti-inflamatórios com geoprópolis são extremamente escassos; com isso, os resultados aqui apresentados demonstram-se promissores.

3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As doenças bacterianas mais persistentes estão diretamente relacionadas a microrganismos com maior resistência. A partir dessa afirmação, faz-se necessário empregar medicamentos mais fortes e por tempo prolongado, pois sua eficácia foi comprometida com o passar dos anos. Portanto, é necessário buscar medicamentos e tratamentos alternativos, mencionando haver uma limitação de agentes quimioterápicos efetivos disponíveis (SOARES; CURY, 2001; BISIGNANO *et al.*, 1999).

Os produtos naturais constituem um importante papel na busca por novos agentes capazes de combater microrganismos patógenos, pois a utilização indiscriminada de antibióticos levou à criação de novos agentes patógenos, tornando-os mais resistentes aos diversos antibióticos existentes (GONÇALVES *et al.*, 2005).

A avaliação da atividade antimicrobiana da geoprópolis de *Scaptotrigona postica* foi realizada a partir da análise do método de microdiluição em placa de 96 poços, visando determinar a concentração biocida mínima (CBM). Referida análise foi realizada em duas concentrações: 1 mg/mL e 0,5 mg/mL, houve atividade em todas as bactérias testadas na maior concentração (1 mg/mL) e em 4 delas, na menor concentração (0,5 mg/mL), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Scaptotrigona postica*, expressa em termos de Concentração Biocida Mínima, CBM (mg/mL), determinada pela técnica de microdiluição.

Microrganismos	Extrato Etanólico da Geoprópolis CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC14458) ^a	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) ^a	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 8-) ^a	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (+7)	1,0
<i>Salmonella typhimurium</i> (Ct) ^b	0,5
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) ^a	1,0
<i>Bacillus subtilis</i> (Ct) ^b	1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) ^a	1,0
<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341) ^a	1,0

a: cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC); b: cepa de campo; -: ausência de inibição; CBM: Concentração Biocida Mínima (mg/mL) = concentração que inibe em 100% o desenvolvimento microbiano.

Gonçalves *et al.* (2005) ao analisarem a atividade antimicrobiana do mel produzido pela *Nannotrigona testaceicornis* em bactérias patogênicas humanas, utilizando método de difusão em ágar, obtiveram resultados de sensibilidade das bactérias *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus pyogene*. Fernandes Jr *et al.* (2001) procederam a um estudo buscando avaliar a atividade antimicrobiana da própolis de *Apis mellífera* e de algumas espécies de abelhas sem ferrão. Utilizando extratos etanólicos, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi mensurada utilizando a técnica de difusão em ágar, com bactérias de cepas gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* e gram-negativa *Escherichia coli*. As bactérias gram-positivas demonstraram-se mais suscetíveis aos extratos etanólicos ante a gram-negativa, constatando também que a própolis de cada abelha pode apresentar diferentes níveis de atividades. Este estudo confirma os dados encontrados neste, em que foi observada certa resistência da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, pois necessitou da maior CBM (1,0 mg/mL) para inibição da mesma.

Gonsales *et al.* (2006) analisaram a própolis de *Apis mellífera* de varias regiões do Brasil, como São Paulo, Goiás e Paraná, buscando avaliar a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos, utilizando a técnica de difusão em disco frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Obtiveram inibição do crescimento somente de *Staphylococcus aureus*; a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* demonstrou-se resistente aos extratos, não havendo inibição da mesma, contrapondo-se ao presente trabalho, no qual houve inibição de ambas as cepas.

A eficácia antimicrobiana dos extratos de própolis frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas é divergente. As gram-positivas demonstram-se mais suscetíveis às amostras aplicadas. Essas ações podem estar diretamente relacionadas à sua composição química, rica em flavonoides e ácidos fenólicos. É possível que esses compostos fenólicos ativem ou aumentem uma enzima bacteriana conhecida como lisozima sérica, capaz de desestabilizar a parede celular bacteriana. Assim, estas ações são variáveis devido à sensibilidade das cepas (SILVA *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2001).

Manrique e Santana (2008) buscaram expor as atividades antibacteriana e antioxidante das bactérias *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona* sp. do Brasil e da Venezuela, encontrando vigorosos resultados para as ações estudadas frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9.341). O presente trabalho também apresentou inibição das cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC14458)^a, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)^a, *Staphylococcus aureus* (ATCC 8-) e *Staphylococcus aureus* (+7) em concentrações de 0,5 a 1,0 mg/mL. Orsi *et al.* (2005) coletaram própolis de *Apis mellífera* em duas regiões brasileiras (Urubici - Santa Catarina, Região Sul do Brasil, e Mossoró - Rio Grande do Norte, Região Nordeste), obtendo resultados satisfatórios, pois combateu a bactéria *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. A amostra de própolis coletada em Mossoró apresentou-se mais eficiente, entretanto, ambas as amostras manifestaram-se fortes bactericidas, corroborando ao presente estudo, em que se obteve efetiva ação contra *Salmonella typhimurium* (Ct) em menor concentração (0,5 mg/mL).

A identificação de agentes com atividades farmacológicas possui grande relevância, e a geoprópolis de meliponíneos tem apresentado promissores resultados em diversas atividades testadas.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou concluir que o extrato bruto etanólico da geoprópolis da abelha nativa *Scaptotrigona postica* apresenta:

- Atividades antioxidante frente as técnicas de redução do radical DPPH e análise de fenólicos totais solúveis Folin-Ciocalteu.
- Atividade anti-inflamatória, determinado pelo método *in vitro* BSA.
- Atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.
- Dessa forma, os resultados obtidos no estudo em questão propõem que a geoprópolis de *Scaptotrigona postica* apresenta alto potencial para futuras prospecções biológicas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES DE SOUZA, S.; CAMARA, C. A.; MONICA SARMENTO SILVA, E.; SILVA, T. M. S. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- ARAÚJO, M. J. A.; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K.; LIBÉRIO, S. A.; NASCIMENTO, F. R. Effect of propolis of *Scaptotrigona aff. postica* on the development of the tumor of Ehrlich in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580-587, 2010.
- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A. J. P. CALDERARO, F.F. Resistência Antimicrobiana de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Fezes de Leitões com Diarreia. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, abr./jun., 2002.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds, **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v.1, n.2, p. 23–28, 2009.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung. C**, 53, n. 5-6, p. 402-406, 1998.
- BARTH, M. O.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico**, Belo Horizonte, v.19, n.1, p.277-290, 2009.
- BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M.; L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S. Composição química e atividade antioxidante de geoprópolis produzidos por *Melipona fasciculata* (Meliponinae) em áreas alagadas e áreas de cerrado do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil. **Acta Amaz**, Manaus, v. 46, n. 3, p. 315-322, 2016.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

- BHASKAR, V. H.; MOHITE, P. B. Design, synthesis, characterization and biological evaluation of some novel 1, 5 disubstituted tetrazole as potential anti-inflammatory agents. **J Opt Adv M**, v. 2, p. 231-237, 2010.
- BISIGNANO, G.; TOMAINO, A.; CASCIO, R. L.; CRISAF, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 8, p. 971-974, 1999.
- BOGDANOV, S. "Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review," **Bee Product Science**, 2011. Acesso em: 20 fev 2016. Online. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>>.
- CHOPADE, A. R.; SOMADE, P. M.; SAYYAD, F. J. Membrane Stabilizing Activity and Protein Denaturation: A Possible Mechanism of Action for the Anti-Inflammatory Activity of *Phyllanthus amarus*. **Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University**, v. 1, n. 1, p. 67-72, 2012.
- CORREA, W.R. **Prospecção de substâncias bioativas em *Pfaffia townsendii* e *Pfaffia tuberosa* (Gomphreneae, Amaranthaceae)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências - Área Fármacos e Medicamentos). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Campinas.
- COSTA, R. T. **Perfil esi-ms e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides***. 2015. 48p. TCC (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sul de Minas – IFSULDEMINAS- Campus Inconfidentes.
- CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, n. 4, p. 1144-1152, 1997.
- CUNHA, M. S.; DUTRAS, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba). **Cad Pesq.**, São Luís, v.16, n.3, p.31-38, ago./dez. 2009.
- DUAILIBE, S. A. C.; GONCALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **J. Appl. Oral Sci**, vol.15, n.5, pp. 420-423, 2007.
- FERNANDES Jr, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.2, Botucatu Dec. 2001.
- FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMONGA, M. H.; CUNHA, T. M.; BUENO SILVA, B.; LUIZ ROSALEN, P. Bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis decreases neutrophils migration in inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012
- GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review**. *Bee Worl*, v. 60, p. 59-84, 1979.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade Antimicrobiana Do Mel Da Abelha Nativa Sem Ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, out./dez., 2005.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.12, n.2, p.276-284, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

KERR, W. E. **Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera.** Informe Agropecuario, v. 13, p. 15-22, 1987.

LONGHINI R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições de avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev Bras Farmacogn** 17: 388-395, 2007.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. dos. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v.2, n.4, p.7-9, dezembro de 2005.

MANRIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Trop.**, v.26, n.2, p.157-166, 2008.

Microsoft® Office Excel (Microsoft Corporation, 2010)

MIZUSHIMA, Y.; KOBAYASHI, M. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 169-173, 1968.

MOTTA, V. T. **Bioquímica básica.** Laboratório autolab Ltda, p.374, 2007.

NOGUEIRA NETO, P. **Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão.** Ed. Nogueirapis, São Paulo, p.368, 1997.

Origin® 6.0 Professional (Microcal Software,1999)

ORSI, R. O.; SFORCIN J. M.; FUNARI, S. R. C.; GOMES, J. C. Efeito de extrato de própolis sobre os mastócitos de pulmão de cobaia. **J. Veneno. Anim. Toxinas incl. Trop. Dis.**, v. 11, p. 76-83, 2005.

PARK Y.K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. I. Antimicrobial activity of própolis on oral microorganisms. **Cur Microbial** 34: 24-28, 1998.

PASSOS, L. S. C. **Avaliação da atividade antioxidante e perfil cromatográfico de extratos do falso jaborandi (*Piper aduncum*).** 2010. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Imunopatologia das doenças infecciosas e parasitárias). Faculdade de Ciências da Saúde da Univale.

- PICCINELLI, A. L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina leaves* (burrito), a folk Paraguayan tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5863-5868, 2004.
- PUJOL, I.; GUARRO, J.; LLOP, C.; SOLER, L.; FERNANDEZ BALLART, J. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2106-2110, 1996.
- REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA MACHADO, J. A. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol.52, n.7, pp. 1096-1105, 2008.
- REIS, C.M.F.; CARVALHO, J.C.T.; CAPUTO, L.R.G.; PATRICIO, K.C.M.; BARBOSA, M.V.J.; CSHIEFF, A.L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e Toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Rev. bras. Farmacogn**, vol.9-10, n.1, pp.43-52, 2000.
- SALVADOR, M.J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenela* (Gomphreneae, Amaranthaceae)**. 2005. 410p. Tese (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- SAYRE, L.M.; PERRY, G; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, 2007.
- SILVA, A. C. C.; RICARTE, F. S.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v.5, n.1, p. 07-13, Jan-Dez, 2015.
- SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult**, vol.66, n.1, pp. 38-42, 2014.
- SILVA, E. C. C. da; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. de C. S.; NUNOMURA, S. M.; ZILSE, G. A. C. Constituintes Fenólicos E Atividade Antioxidante Da Geoprópolis De Duas Espécies De Abelhas Sem Ferrão Amazônicas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 5, 628-633, 2013.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras - Sistemática e identificação**. Belo Horizonte - MG, Editora Composição e Arte, p.253. 2002.
- SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 130-134, 2001.
- SOUZA, S. A. **Estudo químico, atividade antinoceptiva, antifúngica e potencial antioxidante da geoprópolis produzida pela Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. 2016. 128p. Tese submetida ao programa de pós-graduação (Biociência animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- TURCHETTI - MAIA, R. M. M. Introdução à Antibioticoterapia. *In*: FRANCISCHI, J. N.; **A farmacologia em nossa vida**, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. Cap.8, p.101-107.

VIANA, J. L.; FRANCISCO, A. K.; CARVALHO, C. A. L.; WALDSCHMIDT, A. M. Genetic variability in *Melipona scutellaris* from Reconcavo, Bahia, Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 12, n. 3, p. 3444-3454, 2012.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.