



RITA TASSIANA DA COSTA

**PERFIL ESI-MS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides***

**INCONFIDENTES - MG
2015**

RITA TASSIANA DA COSTA

**PERFIL ESI-MS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides***

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

Orientador: Prof. DSc. Wallace Ribeiro Corrêa

**INCONFIDENTES - MG
2015**

RITA TASSIANA DA COSTA

**PERFIL ESI-MS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides***

Data de aprovação: 11 de Novembro de 2015

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

**Prof^a Ms. Verônica Soares de Paula Morais
(IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes)
Membro 1**

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

How could we not talk about family

When family's all that we got?

À minha mãe, Fátima Constantino, que esteve sempre comigo.

À minha família que compreendeu minha ausência nos momentos de estudo.

Eu Dedico

Agradecimentos

Acima de tudo agradeço a Deus, que me possibilitou estar concluindo mais uma etapa da minha vida, obrigada, meu Senhor, por nunca desistir de mim, por me dar forças nos momentos de fraqueza, por me dar esperança nos momentos difíceis e pelo simples fato de estar ao meu lado mesmo quando não mereço.

Mãe, obrigada por me dar suporte e total apoio, por brigar comigo, isso fez com que eu sempre desse o melhor de mim e aprendesse a nunca desistir no primeiro obstáculo, obrigada! Simplesmente obrigada por existir na minha vida, por ser minha mãe, por sempre fazer o possível e também o impossível por mim, em entregar a sua felicidade em nome da minha, tenho muito orgulho da pessoa que você é. Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente à minha família que compreendeu minha ausência nos momentos de estudo e sempre me ajudou no que pode. Por tornar meus finais de semanas mais divertidos, pelo pequeno anjo que nós recebemos este ano deixando tudo mais alegre e iluminado. “How could we not talk about family when family's all that we got?” (See You Again), obrigada por tudo, vocês são o suporte de toda uma vida!

Obrigada ao professor orientador, e amigo, posso assim chamá-lo, Wallace Côrrea, por me dar a oportunidade de desenvolvimento desse projeto e de aprender várias coisas, obrigada pela paciência e pelo suporte, e o principal, pela confiança a mim direcionada. Obrigada ao professor Nilton que deu um enorme apoio para a realização desse projeto, mantendo sempre a calma nos meus momentos de desespero.

Obrigada a todos os meu amigos e colegas de faculdade que tornaram essa jornada menos densa, merecendo um agradecimento especial: Regiane, Washington, Gustavo, Rafael, Samuel, Ana Maria, Márcia e a Fran, obrigada por tornarem minhas noites mais alegres.

Um agradecimento mais que especial à Sheila, minha irmã-amiga, obrigada por ter a enorme paciência de me ensinar tantas coisas no laboratório, de me aguentar toda manhã, durante sua graduação, por manter nossa amizade intacta mesmo depois de você já ter se formado, ajudando a diminuir a intensidade desta carga, de realmente tornar a ideia deste trabalho concreta, que Deus ilumine seus passos sempre. Obrigada por sempre permanecer ao

meu lado! Obrigada também à Roberta Souza, por deixar tudo mais leve neste último ano de faculdade, tirando risadas nos momentos mais difíceis, dividindo as tarefas do laboratório, conte sempre comigo. Agradeço à Raíssa, com toda essa sua positividade e bom humor invejável, manteve-se ao meu lado dividindo este momento. Agradeço também à Letícia Prado, nosso tempo de convívio foi curto, mas garanto que foi muito significativo, tanto pessoal como profissionalmente.

Agradeço a minha grande amiga Gislaine pelas sábias palavras, pela companhia e pela amizade nestes anos de faculdade, por dividir sonhos e o amor pelos livros, tornando tudo tão suportável, mais fácil e leve, todo sucesso do mundo a você, que Deus abençoe seu caminho, sempre levarei nossa amizade no coração!

Ao meu grande amigo Mateus Luís pelos anos de amizade, pelo enorme carinho, pela força e atenção de sempre, por tirar sorrisos de mim nos momentos difíceis, além de acreditar em mim quando ninguém mais o fazia, permanecendo sempre ao meu lado.

Agradeço aos professores do IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes que auxiliaram tanto na minha formação acadêmica como a pessoal. Um agradecimento especial à professora Verônica, pelos conselhos, pelas críticas construtivas e, principalmente pelo seu bom humor; e ao professor Rodrigo Palomo que tirou um tempinho para vir auxiliar-me nesse dia tão importante, obrigada pelo conselhos e sugestões!

Agradeço também ao IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes que financiou este projeto e a UNICAMP e em especial, ao professor Marcos José Salvador.

E a todos que, de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, Obrigada!

" A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós."

- Marcel Proust

RESUMO

A própolis especial que é fabricada pelas abelhas sem ferrão pertencentes a subfamília Meliponinae é chamado de geoprópolis que apresenta em sua composição uma elevada quantidade de constituintes químicos, substâncias estas responsáveis por diversas atividades farmacológicas como antimicrobiana, antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e antitumoral. O presente estudo apresentou como objetivo identificar possíveis compostos existentes, realizar a avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, que foi coletada na Fazenda - Escola do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes, onde os possíveis compostos foram identificados utilizando-se a metodologia de ESI(-)-MS/MS. As Concentrações Biocidas Mínimas (CBM) foram determinadas pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, a avaliação antioxidante fazendo uso do ensaio ORAC_{FL} e a avaliação da atividade anti-inflamatória foi feita utilizando-se o método da desnaturação da albumina do soro bovino. Como resultado, por meio da ESI(-)-MS/MS foi possível identificar 4 ácidos fenólicos e 1 flavonoide, além do extrato apresentar atividade antimicrobiana com CBM entre 1,000 e 0,250 mg/ml, atividade antioxidante com valor 1425 $\mu\text{mol TE/g}$ e uma considerável atividade anti-inflamatória. Frente a estes significativos resultados, conclui-se que o extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta compostos fenólicos e flavonoides, substâncias estas possivelmente responsáveis pelas atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, fato que possibilita futuras prospecções biológicas.

Palavras - chave: Geoprópolis, Compostos, Atividade Antimicrobiana, Atividade Antioxidante, Atividade Anti-inflamatória, *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

ABSTRACT

The special propolis, which is produced by stingless bees, belongs to the Meliponinae subfamily is called “Geopropolis” which presents in its compounds a high quantity of chemical constituents. These substances are responsible for various pharmacological activities such as antimicrobial, antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory and antitumoral. This study has presented the aim of identifying possible existent compounds, making an evaluation of antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the ethanolic gross extract of geopropolis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* which was collected at the Farm-School of the Federal Institute of Education, Science and Technology South of Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Possible compounds were identified by applying the methodology of ESI(-)-MS/MS. The minimum biocidal concentrations (MBC) were determined by the microdilution method in 96-well plates. The evaluation of antioxidant by applying the essay ORAC_{FL}, and the evaluation of anti-inflammatory activity was carried out by applying the method of the denaturation of the albumin in the bovine serum. As a result, through ESI(-)-MS/MS, it was possible to identify 4 (four) phenolic acids and 1 (one) flavonoid, besides the extract presents antimicrobial activities with CBM within 1,000 and 0,250 mg/ml, antioxidant activity with value 1425 umol TE/g and a considerable anti-inflammatory activity. According to these significant results, it was concluded that the ethanolic gross extract of geoprópolis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* presents flavonoid and phenolic compounds. These substances are possibly responsible for the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities; therefore, it makes possible the biological prospectations.

Keywords: Geopropolis, Compounds, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, Anti-inflammatory Activity, *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bandas terçais de abelhas mandaçaia	17
Figura 2 - Flavonoides isolados do geoprópolis de abelhas sem ferrão Jandaíra.....	19
Figura 3 - <i>Fingerprint</i> que foi obtido por meio da ESI - MS, estando em modo negativo, do extrato bruto etanólico da geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	30
Figura 4 - Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> pelo ensaio BSA do extrato bruto etanólico da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies adaptadas a cada microrregião do país	16
Tabela 2 - Compostos identificados na geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> ...	31
Tabela 3 - Atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico da geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	31
Tabela 4 - Capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC _{FL} do extrato bruto etanólico da geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> ..	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 MELIPONÍNEOS.....	15
2.2 GEOPRÓPOLIS.....	19
2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	21
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	22
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 COLETA DA GEOPRÓPOLIS.....	26
3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	26
3.3 ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO: ANÁLISE PRELIMINAR DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM INJEÇÃO DIRETA E IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS).....	26
3.4 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	27
3.5 ENSAIOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
3.5.1 Ensaio ORAC _{FL}	28
3.6 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i> – ENSAIO BSA.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM INJEÇÃO DIRETA E IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS).....	30
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	31
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	33
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Historicamente pode-se constatar o uso de recursos naturais por várias civilizações. Talvez, uma das primeiras formas de uso tenha sido através da ingestão de folhas e ervas na busca pela cura e alívio de doenças. A civilização Greco-romana, Chinesa e Egípcia merecem destaque por utilizarem no controle de praga e na medicina os recursos naturais. Atualmente, na medicina tradicional chinesa, muitas espécies e preparados vegetais medicinais estão sendo estudados com o intuito de isolar os princípios, assim possibilitando uma maior compreensão dos mesmos (VIEGAS Jr *et al.*, 2006).

Segundo Malvezzi (2010), a biodiversidade tem uma importância incontestável tanto econômica, quanto científica ou ecológica. O uso destes pelo homem vai desde fitoterápicos, inovação na área de cosméticos, suplementos alimentares e fármacos, além de se serem empregados na alimentação, em práticas religiosas, no folclore e na medicina.

Produtos naturais como, por exemplo, as plantas medicinais apresentam uma enorme importância devido à sua utilização por boa parte da população como única fonte de tratamento. Além de apresentarem variados constituintes químicos de estruturas únicas e complexas, o que aumenta o interesse das áreas farmacêuticas, pois há a possibilidade de produção de novos fármacos, devido a sua possível atividade farmacológica (MATOS, 2011).

Os produtos naturais podem apresentar além da atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, o que fomenta a busca por antioxidantes naturais para serem utilizados como tratamento de diversas doenças, como por exemplo, o câncer, a artrite e as cardiopatias, que apresentam relação com o uso sem distinção de antioxidantes sintéticos, que são muitas vezes empregados na indústria alimentícia (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As pesquisas envolvendo produtos naturais que tem suas atividades biológicas comprovadas vem sendo cada vez mais estimuladas, devido ao aumento da resistência que os microrganismos vem apresentando a grande parte dos fármacos que são utilizados para o

tratamento de doenças (PRADO, 2014). Essa crescente busca por produtos naturais, especialmente os vegetais, é fomentada graças aos efeitos colaterais da medicina convencional, o uso incorreto ou excessivo dos medicamentos sintéticos, entre outros, além do fato de que a grande parte da população não apresenta acesso aos medicamentos (RATES, 2001).

Estima-se que nos países industrializados cerca de 25% dos medicamentos que são registrados e prescritos, apresentam constituintes ativos que são derivados de produtos naturais (NETTO, 2008). Tais pesquisas buscam mostrar alternativas terapêuticas que apresentem baixo custo e segurança, e que em alguns casos possam apresentar um valor agregado científico a um produto que era então desconhecido, podendo se tornar uma fonte de cura, prevenção de doenças, servindo, inclusive de subsistência de comunidades carentes que dependem de sua produção (DA CUNHA, 2012).

As abelhas sem ferrão apresentam um ferrão atrofiado e são reconhecidas pela sua produção de mel e pelo papel que desenvolvem na manutenção do ecossistema, além da produção da geoprópolis, como é o caso da (mandaçaia) *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier, 1836). A geoprópolis é um tipo especial de própolis, ou cola de abelha, que é preparado por abelhas pertencentes à subfamília Meliponinae e a tribo Meliponini, e que são vastamente encontradas na região tropical e em áreas subtropicais do mundo. A geoprópolis apresenta uma mistura de resinas vegetais, óleos essenciais, pólen, ceras e terra (BARTH & PINTO DA LUZ, 2003; CARVALHO-ZILSE & NUNES - SILVA, 2012; CORTOPASSI - LAURINO *et al.*, 2006; KERR, 1987; NOGUEIRA - NETO, 1997).

Se comparado com os elevados números de trabalhos desenvolvidos com o objetivo de estudar as atividades biológicas da própolis que é produzida pela *Apis mellífera*, há poucos trabalhos que investiguem as atividades farmacológicas da geoprópolis. No entanto, a geoprópolis apresenta um potencial promissor para pesquisas futuras, já que ensaios prévios demonstraram que esta apresenta atividade antimicrobiana (DA CUNHA *et al.*, 2013, DUAİLIBE *et al.*, 2007; LIBERIO *et al.*, 2011), antioxidante (ALVES DE SOUZA, *et al.*, 2013), antiproliferativa (DA CUNHA *et al.*, 2013), antinociceptiva (FRANCHIN *et al.*, 2013), antitumoral (CINEGAGLIA *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2012).

Assim, este estudo teve como objetivo verificar o perfil ESI-MS e avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MELIPONÍNEOS

A ordem dos Hymenoptera compreende além das vespas e formigas, as abelhas que são reunidas na superfamília Apoidea, que contém aproximadamente 20.000 espécies que apresentam em sua constituição várias famílias, porém, a família Apoidea apresenta os hábitos sociais mais avançados, além de possuir quatro subfamílias: Meliponinae, Euglossinae, Apinae, e dos Bombinae. Por sua vez, os Meliponinae são divididos em duas tribos: Meliponini, que apresenta apenas o gênero *Melipona*, e a tribo Trigonini com vários gêneros. Dentro da subfamília Meliponinae são encontrados 52 gêneros, tendo um total de aproximadamente 300 espécies que estão espalhadas por todo o mundo, desde o Rio Grande do Sul até o Centro do México além da África, Malásia, Indonésia, Austrália e Índia. (NOGUEIRA - NETO, 1997; KERR *et al.*, 1996).

O gênero *Melipona* ocorre em toda a região neotropical, porém é mais diversificada na bacia amazônica, além de possuir o maior número de espécies. Os meliponíneos, ou também chamados de meliponídeos, sendo esta diferença apenas uma variação de escrita cultural, apresentam um tamanho minúsculo a médio, porém geralmente são abelhas robustas. Todas suas espécies são eussociais, porém, algumas delas roubam alimentos de colônias de outras espécies para sua sobrevivência. Os seus ninhos são construídos, em geral, em cavidades já existentes, como ninhos de cupins ou formigas que foram abandonados, ocos de árvores, entre outros, entretanto, há também espécies que constroem ninhos que são mais expostos (SILVEIRA *et al.*, 2002). A Tabela 1 sugere espécies que estão adaptadas a cada microrregião do país.

Tabela 1 - Espécies adaptadas a cada microrregião do país.

Região	Espécie Sugerida
Rio Grande do Sul	<i>Melipona quadrifasciata, Scaptotrigona sp</i>
Santa Catarina	<i>M. quadrifasciata, M. marginata, Scaptotrigona, Mourella</i>
Paraná	<i>M. quadrifasciata, M. bicolor, Cephalotrigona, Scaptotrigona, Tetragonisca jati</i>
São Paulo e Rio de Janeiro	<i>M. quadrifasciata, M. bicolor, Cephalotrigona, Scaptotrigona, Tetragonisca jati e M. rufiventris</i>
Minas Gerais (Triângulo e Sul)	<i>M. quadrifasciata, M. bicolor, Cephalotrigona, Scaptotrigona, Tetragonisca jati e M. rufiventris</i>
Espírito Santo	<i>M. capixaba, M. quadrifasciata, M. marginata, M. rufiventris</i>
Mato Grosso do Sul	<i>Melipona favosa, M. marginata</i>
Rondônia	<i>Melipona seminigra</i>
Mato Grosso	<i>M. seminigra, M. rufiventris</i>
Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Paraíba	<i>M. scutellaris, M. marginata, M. asilvae, Scaptotrigona</i>
Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará	<i>Melipona subnitida</i>
Piauí, Maranhão	<i>M. compressipes, M. subnitida, Scaptotrigona</i>
Pará	<i>M. seminigra, M. melanoventer, M. amazonica</i>
Amazonas	<i>M. seminigra, M. crinita, M. rufiventris</i>

Fonte: (KERR *et al.*, 1996)

A espécie *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, popularmente conhecida como mandaçaia, apresenta duas subespécies: a *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier e a *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier. As duas subespécies se diferem morfológicamente pelo padrão de faixas amarelas no dorso do abdômen, ou também chamadas de bandas terciais, amarelas e contínuas do 3° ao 6° segmento (de 3 a 5 bandas) em machos e operárias de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier e bandas interrompidas (de 2 a 5 bandas) em *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Figura 1) (AIDAR, 1996; CALASANS, 2012; OBIOLS, 2008; SCHWARZ, 1948).

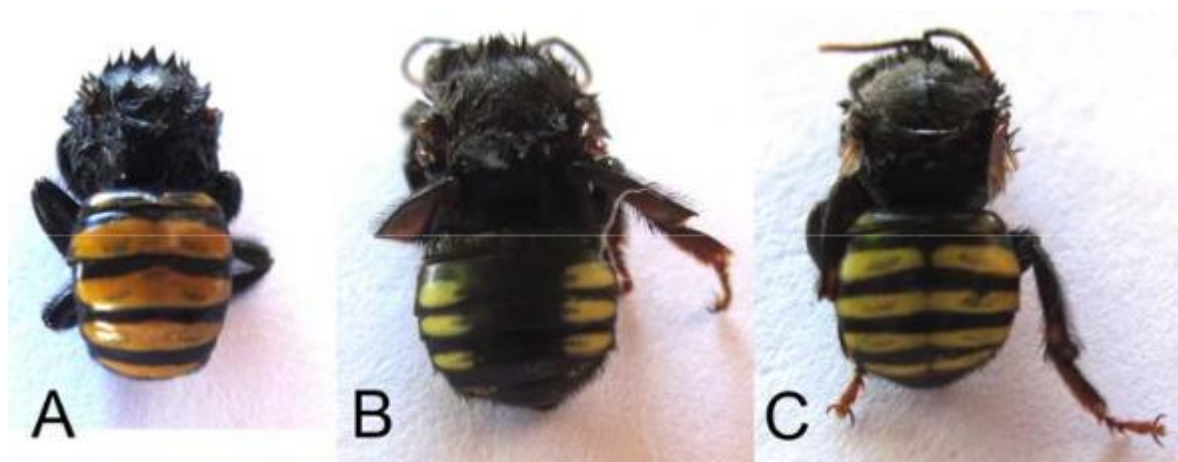


Figura 1 - Bandas terciais de abelhas Mandaçaia. A - *Melipona mandaçaia*; B - *Melipona quadrifasciata anthidioides*; C - *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*.

Fonte: (CALASANS, 2012)

Abelhas sem ferrão são responsáveis por cerca de 40% a 90% da polinização de árvores nativas, conforme o ecossistema (KERR *et al.*, 1996). Porém, devido ao desmatamento de florestas nativas, o ambiente preferencial das abelhas sem ferrão, elas se encontram em um rápido processo de desaparecimento. A *Apis mellífera* produz uma maior quantidade de mel do que as abelhas sem ferrão, devido a este fato, os produtores de mel não têm interesse pelo seu manejo (meliponicultura). Por isso a oferta deste produto no mercado é tão baixa. Em determinadas regiões, como Sul e Sudeste, são poucos os que conhecem o sabor do mel dessas abelhas nativas, tornando este produto uma iguaria, as pessoas mais velhas sabem do seu enorme valor medicinal (LOPES *et al.*, 2005).

Os meliponíneos ocupam uma grande parte das regiões de clima tropical do planeta, além de algumas regiões de clima subtropical e temperado, por isso, são encontradas na maior parte do território neotropical. No Brasil, são conhecidas mais de 400 espécies de abelhas

nativas (KERR, 1987). São abelhas indígenas, que apresentam um ferrão atrofiado, devido a este fato, são também chamadas de abelhas sem ferrão ou "*stingless bees*" (NOGUEIRA - NETO, 1997; PRONI, 2000).

O mel que é produzido pelas abelhas sem ferrão é bastante procurado pelos seus consumidores, pois apresenta atividade antimicrobiana, por exemplo, assim, apresentam um elevado potencial terapêutico, o que fortalece a medicina popular, analisando os conhecimentos (GONÇALVES *et al.*, 2005; PERALTA, 2010; SODRÉ *et al.*, 2008).

No grupo formado pelos meliponíneos, os indivíduos dependem quase diretamente dos fatores ambientais e das características florísticas de cada região. Devido a isso, estudos que busquem conhecer como é a biodiversidade destas abelhas poderão servir de auxílio para o manejo e conservação dos ecossistemas atuais, além de auxiliar no equilíbrio do fluxo de energia das cadeias tróficas (PRONI, 2000).

A importância representada pelos meliponíneos não interfere apenas em aspectos econômicos e sociais, interfere principalmente, em processos ecológicos ecossistêmicos. Devido a isso, há uma extrema necessidade de sensibilização, o qual apresenta como principal ponto a participação da sociedade através da Educação Ambiental em escolas e organizações. A manutenção da diversidade da flora nativa e vegetal ocorre devido ao serviço ecológico das abelhas sem ferrão, incluindo, é claro, os demais grupos de abelhas. Com isso, um aumento da oferta de sítios para a nidificação de abelhas sem ferrão apresenta contribuição direta com a conservação da flora e da fauna, que relacionada com outros seres vivos mantém o planeta em equilíbrio (SILVA & PAZ, 2012).

Os meliponíneos são o grupo mais especializado e isolado já que seus indivíduos dependem das características florísticas e climáticas de suas regiões de origem. Geralmente os meliponíneos apresentam as mesmas características que são descritas para os demais insetos e artrópodes em geral. Nestes animais, devido ao exoesqueleto rígido constituído de quitina, é necessário apêndices e membros segmentados e articulados. Seus ninhos têm como constituição básica a cera pura ou cerume (cera, própolis e barro). A mistura de própolis e barro é chamado de batume ou também conhecido como geoprópolis, que é utilizada na delimitação da morada (KERR *et al.*, 1996).

2.2 GEOPRÓPOLIS

Algumas espécies de meliponíneos utilizam barro para a construção da entrada de seus ninhos, porém é o principal material constituinte da geoprópolis. Geoprópolis nada mais é do que uma mistura de barro e própolis. Basicamente, sua função é similar a de um cimento, já que as abelhas a utilizam para vedar frestas, mas algumas espécies o utilizam na constituição de batumes. Sua coloração varia de acordo com os materiais que fazem parte da sua constituição. A característica marcante deste produto é a terra porém, as resinas vegetais são a principal matéria-prima. Há estudos que mostraram que há mais de 50 compostos individuais identificados na própolis dos Meliponinae (ARAÚJO, 2013; VELIKOVA *et al.*, 2000; VILLAS - BÔAS, 2012).

A composição química da geoprópolis ou mesmo da própolis depende da flora e do local de coleta. O estudo que envolve a cola de abelha e as plantas que são utilizadas na sua produção apresenta um potencial para a descoberta de novos compostos que apresentam efeitos farmacológicos de grande importância, como por exemplo: substâncias antioxidantes, anticancerígenas e antibacterianas. Devido a isso, novos tipos de própolis de regiões que ainda são inexploradas sempre atrairão novos pesquisadores (BANKOVA, 2009).

Estudos químicos comprovaram que o extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi* apresenta em sua composição química: ácidos aromáticos, compostos fenólicos, álcoois, terpenos e açúcares (CAMPOS *et al.*, 2014).

Foi possível isolar, pela primeira vez, da geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke, popularmente conhecida como Jandaíra, três compostos, sendo eles os flavonoides: 5-metoxi-kanferol, 3-metoxi-quercetina e 5-metoxi-aromadendrina (SOUZA *et al.*, 2012). (Figura 2)

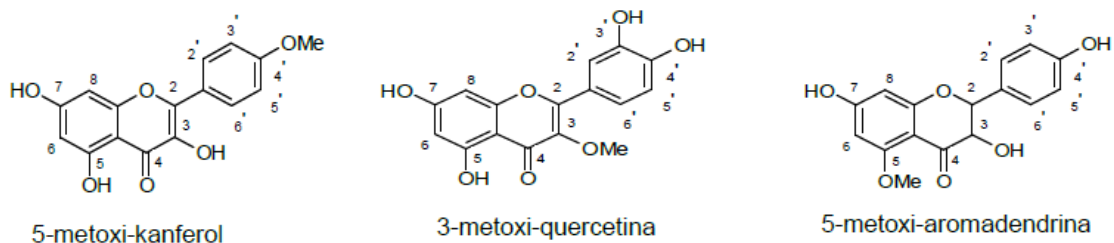


Figura 2 - Flavonoides isolados da geoprópolis de abelha sem ferrão Jandaíra.

Fonte: (SOUZA *et al.*, 2012)

São escassos os estudos que mostram a ação farmacológica e composição química da geoprópolis tropical (DUTRA *et al.*, 2008). No entanto, foi identificado mais de cinquenta compostos, e o principal foi o fenólico e terpênicos presentes na geoprópolis brasileira, que é produzida pela *Tetragona clavipes*, *Melipona compressipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (BANKOVA *et al.*, 1998). Além de já ter sido descrito compostos fenólicos de cinco espécies de abelhas que estão presentes na Venezuela (TOMÁS - BARBERÁN *et al.*, 1993).

Segundo Barth *et al.*, (2009), foi Nogueira - Neto (1953) que definiu o termo geoprópolis sendo nada mais do que a própolis elaborada por abelhas sem ferrão, pertencentes a subfamília Meliponinae. Sua própolis se difere da produzida pela *Apis mellífera*, abelhas introduzidas ou europeias, pois na elaboração há a utilização de terra e/ou barro, além de ceras e resinas de plantas.

É de elevada importância o conhecimento das atividades biológicas e químicas da geoprópolis, para que haja controle de qualidade deste produto, assim podendo valorizar os produtos que estão presentes em nossa biodiversidade, além de servir para conscientizar a população, alertando-a sobre a importância de conservar abelhas nativas (ARAÚJO, 2013).

Há abelhas indígenas na Venezuela e em outros países tropicais da América do Sul, que após recolher o material resinoso das plantas o misturam com cera de abelha e terra para assim formar a geoprópolis (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Geralmente as amostras de geoprópolis são fragmentos rígidos e apresentam tamanhos diferenciados, além de ter grânulos com consistência heterogênea, são inodoros, apresentam uma coloração marrom escuro e um sabor amargo (CUNHA *et al.*, 2009).

A própolis além de servir como material de construção apresenta um enorme potencial químico, uma "arma química" das abelhas, contra microrganismos patógenos sendo utilizadas pelo ser humano como antibiótico natural desde os tempos antigos (BANKOVA, 2005a) .

Modernos herbalistas recomendam a própolis por sua ação antiviral, antifúngica, propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana, para o aumento da resistência natural do corpo à infecções e também no tratamento de úlceras gastroduodenais, além de ser benéfico contra doenças inflamatórias. Quando aplicado externamente, é útil no alívio de dermatites que são causadas por fungos e bactérias. No entanto, hoje a própolis é utilizada como remédio popular e está disponível no mercado em diversas maneiras: pastilhas para garganta, cremes, cápsulas e em pó, entre outras (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (EM), pelo trabalho de J. J. Thomson teve surgimento em 1897, e a partir daí vem auxiliando nas mais diversas áreas: química, física, e nas áreas mais recentes como são as ciências dos alimentos, dos materiais, biologia, medicina entre outras. A EM vem se tornando uma ferramenta essencial para tais áreas do conhecimento, devido a sua ampla perspectiva e novos horizontes. Fornece também um papel de destaque desde as pesquisas mais fundamentais até as mais aplicadas (DINIZ, 2011).

Geralmente essa técnica analítica é bem poderosa e é utilizada para elucidar propriedades químicas e estruturais de moléculas, identificar compostos antes desconhecidos e quantificar materiais já conhecidos, gerando informações importantes a variados profissionais, entre eles: biólogos, químicos, físicos, etc. Essa técnica pode ser feita em concentrações bem baixas em misturas quimicamente complexas e em quantidades pequenas. É utilizada para identificar estruturas de biomoléculas, como por exemplo os carboidratos, para análise de poluentes ambientais, para quantificar e identificar componentes de misturas orgânicas complexas, entre outros (AZEVEDO, 2004).

A funcionalidade básica para um espectrômetro de massa é como se fosse um instrumento que contém uma fonte de íons, um filtro de massas ou um separador, que na realidade é a massa/carga (m/z), e por último um detector. Há várias estratégias de detecção e separação, no entanto a etapa de ionização é a que apresenta maior variedade de estratégias diferentes, devido a variedade de espécies e amostras de interesse. Já com os íons gerados, de acordo com as características comuns ou não, os processos de detecção e separação podem ser escolhidos, surgindo, então, a ionização por “eletrospray”, sendo um modo alternativo que gera íons tendo como base espécies pouco voláteis que são encontradas em fase líquida, que nada mais é do que a transferência de íons pré - existentes para a fase gasosa de uma solução, ou seja, permite que íons sejam transferidos para a fase gasosa de uma solução para que ocorra a análise por espectrometria de massas (MORAES & LAGO, 2003).

Uma peça importante na área de pesquisa em química de compostos orgânicos e inorgânicos é a espectrometria de massas que surgiu na primeira metade do século passado. Mas, foi apenas na última década que se tornou uma importante técnica para as pesquisas biológicas (PIMENTA, 2003).

A espectrometria de massas é uma das técnicas de maior importância, pois permite a quantificação de moléculas em misturas complexas que são conhecidas e a elucidação de estruturas químicas de compostos que são desconhecidos. Moléculas ou átomos de uma determinada amostra são ionizadas na fonte, na espectrometria de massas (MS), e o analisador determina a razão massa-carga (m/z) de cada íon. Os sinais elétricos registrados em formato de um espectro de massa são gerados quando os íons atingem o detector. Com o valor de m/z de um íon é possível aproximar-se do valor exato da massa nominal da molécula. Boa parte das substâncias podem ser analisadas por espectrometria de massas, devido ao fato de existir variadas fontes analisadores de massas e detectores e de ionização (ALVES, 2010).

Para o estudo da composição química da própolis as mais variadas metodologias já foram empregadas, merecendo destaque a espectrometria de massas. Para realizar a análise dos componentes da própolis, voláteis e semi-voláteis, a que vem sendo utilizada é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), no entanto os compostos da própolis são de alta polaridade e baixa volatilidade não sendo analisados de maneira correta pela GC/MS. Devido a isso, é de extrema importância a utilização das técnicas mais modernas, como a ionização por electrospray acopladas à espectrometria de massas (ESI-MS). Para separar os compostos, além de ser acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ESI-MS) a ESI-MS é também utilizada com inserção direta obtendo um *fingerprint* que é um perfil de amostra. A seleção dos compostos é feita por massa, mas geralmente são identificadas pelos seus padrões de fragmentação (MS/MS) que são obtidos através da dissociação induzida por colisão (CID) (SAWAYA, 2006).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A frequente ocorrência da infecção hospitalar, entre outros aspectos estão relacionadas ao aumento do número de bactérias resistentes. O uso constante e indiscriminado de antibióticos utilizados na medicina humana faz aumentar a resistência bacteriana. Portanto, o desenvolvimento de mecanismos de resistência e alterações genéticas, acabam ocorrendo devido a utilização incorreta dos antibióticos, seja utilização do tempo incorreto, por um período reduzido ou prolongado, doses inadequadas ou sem a devida prescrição médica, ou simplesmente por essa droga ter se tornado uma prática comum para o tratamento de qualquer

infecção, porém, os benefícios que os antibióticos trouxeram a população são inquestionáveis, possibilitando a cura de doenças que levavam a óbito muitas pessoas, ajudando no controle de doenças infecciosas, mas principalmente as de origem bacteriana, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida das populações e a saúde pública. (BACCARO *et al.*, 2002; DEPIZZOL, 2006; OLIVEIRA, 2006).

Turchetti - Maia, (2005) comenta que várias doenças infecciosas que causaram a morte de um elevado número de pessoas, durante vários anos, somente receberam tratamento adequado quando houve a descoberta de substâncias antibióticas, na primeira metade do século XX, juntamente com melhores condições sanitárias e com o desenvolvimento de novos fármacos. A troca de material genético com outras bactérias e mutações cromossômicas ocorrem devido à falta de conhecimento na utilização dessas drogas, o que resulta na seleção de microrganismos resistentes.

Mesmo com a rica biodiversidade brasileira, poucos dados na literatura sobre a pesquisa envolvendo espécies exóticas e nativas que apresentem atividade antimicrobiana são encontrados, isso pode ser relacionado a restrição da publicação de resultados em eventos científicos regionais ou locais. No entanto, um aumento de pesquisas envolvendo produtos naturais que apresentam atividade antimicrobiana foi constatada nos últimos anos (DUARTE, 2006).

Há séculos, propriedades antimicrobianas que se encontram presentes em óleos essenciais e vegetais que são produzidos pelas plantas, estão sendo reconhecidas (JANSEN *et al.*, 1987). Vários estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais, comprovaram o elevado potencial de plantas nativas distribuídas em várias regiões do mundo. Como já citado, o Brasil possui uma rica biodiversidade pouco pesquisada, o que enfatiza a importância destes estudos. Várias plantas medicinais são usadas como forma alternativa de tratamento em diversas áreas da saúde, já que apresentam um menor custo quando comparado com o tratamento que fazem uso dos medicamentos industrializados (DUARTE *et al.*, 2004).

O aumento de microrganismos multirresistentes é o que fomenta a busca por novas substâncias antimicrobianas (ROZATTO, 2012). As principais indústrias farmacêuticas do mundo realizam pesquisas com plantas, hoje visto que no decorrer dos anos, os Estados Unidos da América (EUA) apresenta mais de 2/3 de medicamentos que são provenientes de plantas (CASTRO, 2005). A pesquisa com produtos naturais que apresentem atividade

antimicrobiana tem sido cada vez mais estimulada, principalmente das plantas que já estão sendo utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas (MICHELIN *et al.*, 2005).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A busca por produtos naturais que apresentem atividade antioxidante vem aumentando, eles são reconhecidos por sua capacidade de sequestro de radicais livres, exercendo a função de proteção no organismo, além de que, no decorrer dos anos o estresse oxidativo vem mostrando ligação com várias doenças. A grande biodiversidade apresentada pelo Brasil é pouco conhecida, o que possibilita a crescente pesquisa relacionada à atividades biológicas. Muitas plantas, mesmo *in natura*, resíduos agroindustriais ou processadas, podem ser fontes de antioxidantes (De OLIVEIRA *et al.*, 2009; TOMEI, 2008).

Os antioxidantes vêm sendo utilizado para o tratamento de várias doenças degenerativas e crônicas que são causadas pelo estresse oxidativo. Uma dieta rica em antioxidantes é tão importante quanto evitar fontes de oxidantes, como: o álcool, estresse, cigarro, entre outros. Futuramente, poderá ser desenvolvido uma estratégia terapêutica para que a capacidade antioxidante das células seja fortificada. Porém, estudos envolvendo suplementos antioxidantes, que são utilizados para a prevenção de doenças ainda não são tão claras. Por isso, muitas pesquisas ainda são necessárias para que assim ele possa ser utilizado como uma terapia adjuvante (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

A descoberta de novos fármacos vem aumentando devido a pesquisa com produtos naturais, o que apresenta considerável importância para a área de saúde em geral, que vem sendo cada vez mais usados para as mais variadas aplicações terapêuticas, já que são fontes naturais de antioxidantes, servindo como base para os mais variados setores, como na proteção do organismo contra estresse oxidativo e na conservação de alimentos, por exemplo (VELLOSA *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo pode ser causado pelo próprio organismo ou pelo meio ambiente quando o mesmo gera radicais livres. Os componentes da membrana celular, as biomoléculas, RNA, DNA e as proteínas são os alvos de radicais livres, que poderão levar a vários problemas de saúde, que podem ser revertidos com o auxílio de agentes antioxidantes, que geralmente são encontrados em alimentos, os carotenoides (β -caroteno e licopeno), vitaminas

(C e E), compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) merecem destaque (PEREIRA *et al.*, 2009).

Radicais livres nada mais são do que fragmentos de moléculas ou moléculas instáveis que não apresentam em suas órbitas exteriores um par de elétrons. O peróxido de hidrogênio, radical hidróxilo, e o radical superóxido, incluem os radicais livres do oxigênio, que apresentam elevada radioatividade. A produção de um novo radical se dá a partir da reação de um não-radical com um radical. Processos nocivos aos tecidos podem ocorrer devido ao desencadeamento de diversas cadeias de reações (CÓRDOVA & NAVAS, 2000).

A mudança na ordem das bases nitrogenadas pode ocorrer quando a cadeia de DNA é quebrada e ela se reconecta de maneira diferente, este, é um dos processos para que ocorra uma mutação e para o acúmulo de bases danificadas podendo assim desencadear a formação de um câncer pois, como este processo ocorre em enzimas, sua atividade poderá ser alterada ou perdida. A oxidação dos lipídios, quando ocorre na membrana celular, pode levar a morte celular, pois quando há interferência no transporte normal de substâncias pela membrana ou ocasiona ruptura. A oxidação de lipídios quando ocorre no sangue pode levar a agressão de artérias e veias, o que influenciará no acúmulo de lipídios, acarretando a uma aterosclerose, podendo causar um infarto, acidente vascular cerebral ou trombose (BARREIROS *et al.*, 2006).

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA DA GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis, *in natura*, foi coletada na Fazenda - Escola do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes, localizado no município de Inconfidentes/MG, no dia 12 Agosto de 2013. Em seguida foi acondicionada em recipiente térmico e encaminhada ao Laboratório de Biociências, do próprio Campus, para processamento.

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

A geoprópolis foi pulverizada, e seu pó foi pesado, obtendo-se a massa de 371,09 g, em seguida o pó foi acondicionado em *Erlenmeyer* e submetido ao processo de maceração com solvente orgânico, etanol, na proporção massa de pó/solvente 1:20 (massa/volume), obtendo-se assim o extrato bruto em etanol. O solvente foi removido em evaporador rotatório, assim, obtendo-se 56,57 g de extrato bruto etanólico.

3.3 ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO: ANÁLISE PRELIMINAR DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM INJEÇÃO DIRETA E IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS)

No Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, as análises preliminares por ESI-MS foram realizadas com o extrato etanólico bruto da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em estudo de desrepliação. A amostra foi diluída em uma solução contendo 50% (v/v) de metanol grau cromatográfico e 50% (v/v)

de uma solução de água deionizada e 0,5% de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises ESI-MS foram realizadas por injeção direta no espectrômetro de massas quadrupolar – Micromass da Waters, por eletrospray em modo negativo e as condições gerais foram: temperatura da fonte de 100 °C, a tensão capilar de 3,0 kV e a tensão do cone de 30 V. A análise estrutural de íons no espectro de massa de extrato e frações foram realizadas pela avaliação dos fragmentos gerados após a colisão com um gás inerte (ESI-MS/MS). Os íons com relação massa/carga (m/z) de interesse foram selecionados e submetidos a colisões com argônio. A energia de colisão foi otimizada para a produção de fragmentação extensa do íon sob investigação. Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de fragmentação, ESI-MS/MS com espectro de amostras-padrão autênticas do banco de substâncias padrão do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia, Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do IB-Unicamp e com dados da literatura (SALVADOR *et al.*, 2011).

3.4 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

No laboratório de Biociências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais- Campus Inconfidentes, Inconfidentes/MG, foram feitos ensaios para ação antimicrobiana, que foi determinada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, assim, determinando as Concentrações Biocidas Mínimas (CBM), seguindo a adequação de metodologia descrita por Salvador, (2005). Para a execução dos ensaios foram utilizadas bactérias padrão, gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 10799)^a, *Enterococcus faecalis* (ATCC 10100)^a, *Proteus vulgaris* (Pv)^b e gram-positivas: *Bacillus subtilis* (Bs)^b, *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341)^a, *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458)^a, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)^a, *Staphylococcus 8-*, *Staphylococcus epidermidis* (6ep)^b, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)^a.

As bactérias foram cultivadas em meio *Müller Hinton* (MH) em placas de 20 x 150 mm, 24 horas antes da inoculação nas placas. Para a montagem foi utilizado 50 µL de meio *Tryptone Soya Broth* (TSB) em todos os poços, 50 µL da droga teste preparadas em propilenoglicol (1:19) nas concentrações de 0,125, 0,250, 0,500 e 1,000 mg/mL. Cada poço recebeu um inóculo de 10 µL de suspensão de microrganismos, numa concentração de (5.10⁶

ufc/mL). Como controle positivo utilizou-se a bacitracina 2,7 mg/ml e como controle negativo propilenoglicol/TSB (1:19).

As placas-teste foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de 2 horas e depois incubadas a 37° C por cerca de 24 horas. Decorrido o período de incubação 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 feita visualmente, comparando as amostras com os controles. Os experimentos foram realizados em duplicata, para cada cepa indicadora utilizada.

3.5 ENSAIOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Ensaio ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante do extrato foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (2,2'-Azobis (2-amidopropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre, e foi realizada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Prior *et al.*, (2003) e Ou *et al.*, (2001), com modificações de Salvador *et al.*, (2006). Com isso, foram preparadas soluções estoques dos extratos (50 mg/mL) e fases de partição (5 mg/mL) em tampão fosfato/DMSO (99:1, v/v) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda = 485$ nm e emissão $\lambda = 528$ nm) em leitor de microplaca monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (temperatura = 37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca (µM de TE/g). Como controle positivo utilizou-se a quercetina, ácido cafeíco, e extrato bruto etanólico de própolis verde e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* – ENSAIO BSA

No Laboratório de Biociências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes, Inconfidentes/MG, a atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato bruto etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*, foi realizada utilizando a técnica de desnaturação de albumina BSA (Albumina do Soro Bovino) de acordo com Mizushima & Kobayashi, (1968) com modificação. Para tanto 1,0 mg dos extratos foram dissolvidos em 20 µL de DMSO e 980 µL de tampão fosfato (pH 7,0), obtendo-se uma solução a 1 mg/mL. A solução estoque de BSA foi obtida adicionando 20 µg de BSA em 20 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 e 50 µg/mL. O controle negativo foi obtido utilizando-se 40 µL de água destilada adicionado a 160 µL de solução BSA (Difco Bovine Albumin). O controle positivo foi obtido utilizando-se 2 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 incubadora e depois a desnaturação do BSA foi obtida, mantendo a placa de microtitulação a 60 °C em um banho-maria durante 5 minutos. Após um tempo de cinco minutos de resfriamento procedeu-se a leitura em leitor de placas de 96 poços (absorbância no comprimento de onda de 650 nm). A percentagem de inibição da desnaturação proteica foi calculada utilizando a fórmula:

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

Média de absorção do controle

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM INJEÇÃO DIRETA E IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS)

A análise dos espectros obtidos por ESI-MS forneceu informações importantes para a visualização de vários sinais ionizáveis (Figura 3) identificadas como as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas. Através das análises em modo negativo foi possível identificar os íons desprotonados das moléculas que apresentaram 1 u.m.a. a menos em seu peso molecular.

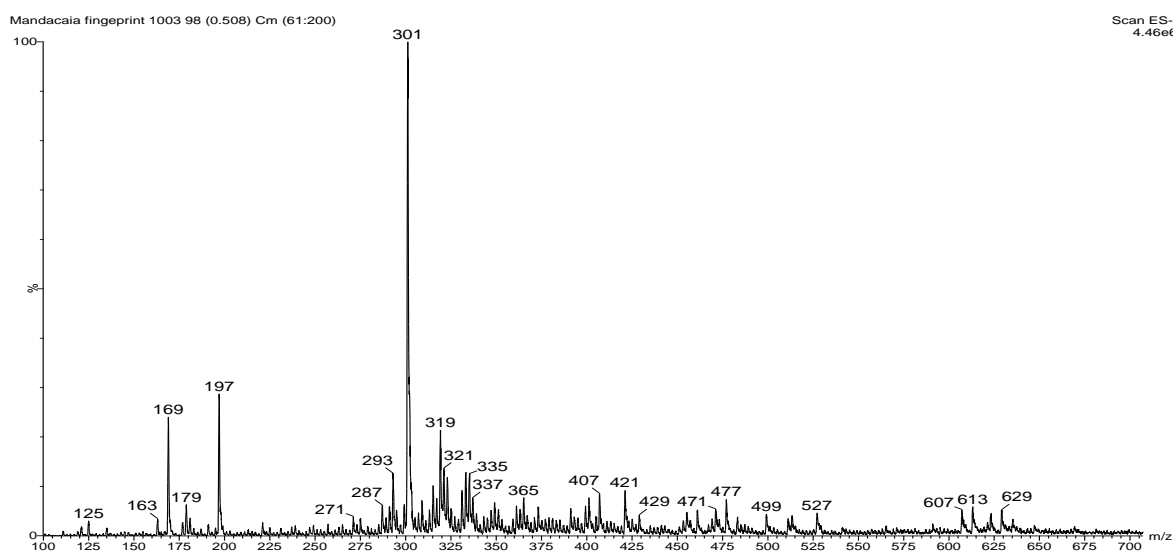


Figura 3 - *Fingerprint* que foi obtido por meio da ESI - MS, estando em modo negativo, do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Por meio da ESI (-) -MS/MS foi possível sugerir a identificação de 4 ácidos fenólicos e 1 flavonoide presentes na geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Tabela 2 – Compostos identificados na geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

ESI (-) - MS/MS	Possível Composto	Principais Fragmentos
163	Ácido – <i>p</i> – cumárico	163, 119, 93
169	Ácido Gálico	169, 125
179	Ácido Cafeico	179, 135, 107
197	Galato de Etilo	197, 153
301	Quercetina	301

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, visando determinar a concentração biocida mínima (CBM). Os resultados (Tabela 3) confirmam a atividade antibacteriana do extrato com valores de CBM entre 0,125 a 1,0 mg/mL, com exceção às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 10799)^a e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)^a que não apresentaram sensibilidade ao extrato até a maior concentração estudada.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Mandaçaia) expressa em termos de Concentração Biocida Mínima, CBM (mg/mL), determinada pela técnica de microdiluição.

Microrganismos	Extrato Etanólico da Geoprópolis CBM (mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs) ^b	0,500
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 10100) ^a	0,125
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10799) ^a	-

<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341) ^a	0,125
<i>Proteus vulgaris</i> (Pv) ^b	1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458) ^a	0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) ^a	0,250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6ep) ^b	0,250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	-
<i>Staphylococcus</i> 8-	0,500

^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.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante do extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, foi avaliada empregando ensaio direto, mediado por transferência de hidrogênio ORAC_{FL}. (Ensaio envolvendo estudo cinético, com fluoresceína como sonda fluorescente, avaliando a capacidade dos extratos em sequestrar radicais peroxil gerados pela fonte radicalar AAPH).

Tabela 4 – Capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC_{FL} do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Amostra	^a Ensaio ORAC ($\mu\text{mol de TE/g}$) ^b
EBE - Mandaçaia	1425 (0,31)
EBE - Própolis Verde*	2726,18 (0,80)
Quercetina*	5,65 (0,89) ^c
Caffeic acid*	2.9 (2.0) ^c

^aDados expressos como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; ^bEnsaio ORAC_{FL} com resultados expressos como micromols de Trolox equivalente por grama de extrato ou fração em base seca. ^cEnsaio ORAC com resultados estão expressos em Trolox Equivalente (TE) Relativo. *: Controle positivo.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

A avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* foi realizada empregando-se o ensaio da desnaturação da albumina de soro bovino (BSA), um ensaio que avalia a capacidade do extrato inibir a desnaturação da proteína (BSA), sendo a desnaturação de proteínas de tecido uma das causas bem documentadas de doenças inflamatórias e artríticas (CHOPADE *et al.*, 2012; BHASKAR & MOHITE, 2010).

Os resultados demonstraram atividade inibidora de desnaturação proteica dependente da concentração no intervalo de 50 a 400 µg/mL. O extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresentou melhor resultado na concentração de 400 µg/mL, inibindo 54,80% da desnaturação (figura 4), valor considerado como satisfatório quando ultrapassa 50% de inibição (CORREA, 2014).

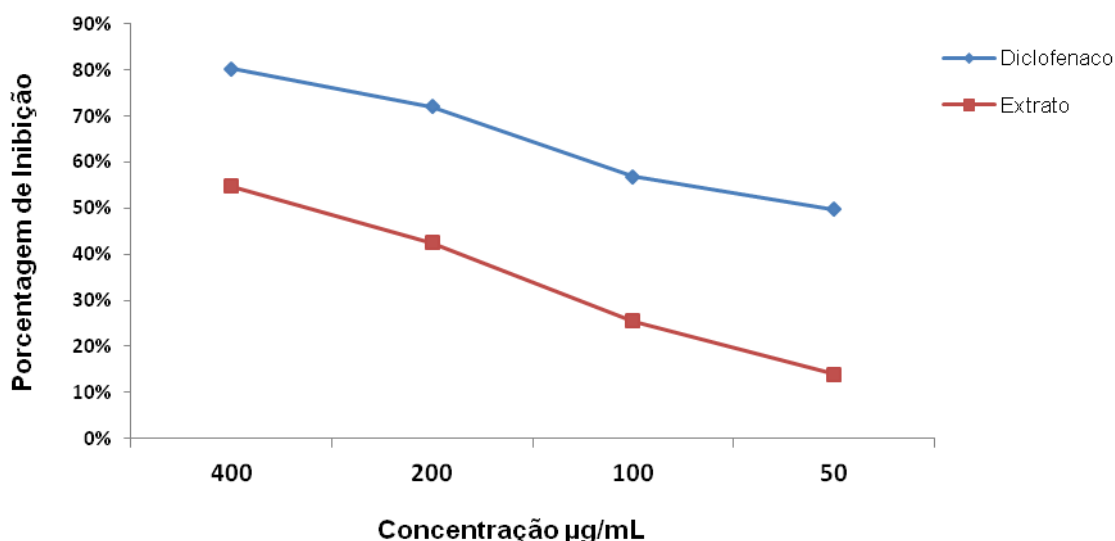


Figura 4 - Atividade anti-inflamatória *in vitro* pelo ensaio BSA do extrato bruto etanólico da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Procedeu-se ainda a determinação da IC₅₀, estimando-se a concentração que reduz em 50% a desnaturação proteica para cada amostra-teste. O valor de IC₅₀ para a amostra apresentou uma atividade inibitória com IC₅₀ de 307,98 ± 0,98 µg/mL.

5. DISCUSSÃO

Nas mais diversas patologias humanas as infecções são um sério problema de saúde pública, que em grande parte dos casos tem microrganismos como, por exemplo, bactérias, parasitas, fungos e vírus, participando do processo. O aparecimento de cepas resistentes aliados a crescente incidência de doenças microbianas, necessidade de tratamento de longa duração, baixa potência dos medicamentos que estão disponíveis e a presença dos efeitos colaterais, mostram que, no campo terapêutico, há uma limitação de agentes quimioterápicos efetivos utilizados para tratamento (SOARES & CURY, 2001; BISIGNANO *et al.*, 1999; PUJOL *et al.*, 1996). Por isso, os estudos que buscam a descoberta de novos agentes antibacterianos são de extrema importância, o que fomenta a busca de novos quimioterápicos através de produtos naturais para serem utilizados como forma alternativa de tratamento.

Muitos fármacos que são comercializados no mundo são derivados de produtos naturais, porém a porcentagem de plantas, referente ao seu potencial medicinal, que são estudadas, é pequena (ROZATTO, 2012). Além de que, os antioxidantes naturais são vias alternativas utilizadas para retardar ou minimizar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para alimentos funcionais, já que os compostos antioxidantes que estão compostos nas plantas acreditam-se, podem prevenir doenças como o câncer e o envelhecimento precoce, entre outros (PASSOS, 2010).

A atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* determinada pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços, não foram encontrados relatos na literatura, assim, verificando que o extrato apresentou atividade antimicrobiana com concentração biocida mínima entre 2,0 e 0,5 mg/mL, resultados semelhantes a outras espécies de meliponíneos que apresentaram atividades antimicrobiana (LIBERIO *et al.*, 2011; MELANI, 2009; MANRIQUE & SANTANA, 2008).

Estes resultados mostram-se promissores pois, estudos antimicrobianos com geoprópolis de meliponíneos são escassos, encontrando-se na literatura poucos trabalhos que relatam as atividades antimicrobianas da geoprópolis. Manrique & Santana (2008) buscaram mostrar a atividade antibacteriana e antioxidante da própolis de abelhas sem ferrão: *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona* sp. do Brasil e Venezuela, realizando coletas mensais desde novembro de 2003 a abril de 2004, assim, comprovando que o extrato etanólico de própolis (EEP) possui forte atividade antimicrobiana e antioxidante, frente as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9.341), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho que verificou a inibição para *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458)^a, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)^a nas concentrações de 0,250 mg/ml.

O estudo de Liberio *et al.*, (2011) mostrou que a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, apresenta um potencial que pode ser utilizado na prevenção ou no controle de doenças bucais, especialmente a candidíase e a cárie, além de poder ser utilizada para o tratamento de processos inflamatórios, já que ela apresenta atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* e *C. albicans*.

Gonçalves *et al.*, (2005), afirma que a utilização indiscriminada de antibióticos, nas últimas décadas, vem favorecendo a criação de microrganismos patogênicos, que estão desenvolvendo resistência aos mais diversificados tipos de antibióticos. Os produtos naturais têm sido a chave para a pesquisa na busca de novas classes de antibióticos, visando suas propriedades terapêuticas, entre elas, a antimicrobiana. Portanto, o presente estudo tem sua importância reforçada, já que diversas cepas bacterianas foram inibidas pela ação do extrato da geoprópolis.

Os resultados encontrados neste trabalho comprovam ação antimicrobiana do extrato bruto etanólico da geoprópolis contra *Enterococcus faecalis* (ATCC 10100)^a apresentando Concentração Biocida Mínima (CBM) de 0,125 mg/ml, resultado que converge com os estudos de Melani, (2009), que utilizando também a técnica de microdiluição, com o extrato etanólico de própolis (*Apis mellífera*) obteve uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 4,23 mg/mL, frente a *Enterococcus faecalis*, demonstrando a eficiência da técnica .

Na técnica de microdiluição, seus resultados apresentam elevado nível de confiabilidade, além de ser bem empregada para a determinação da atividade antimicrobiana, devido ao fato de ser mais sensível do que as demais técnicas utilizadas na literatura, não

apresentando alto custo, e utilizando pequenas quantidades de amostra, além do seu alto rendimento (ELOFF, 1998; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Fernandes Jr *et al.*, (2001) procederam um estudo para a investigação antibacteriana da própolis de *Apis mellífera* e de algumas espécies de abelhas sem ferrão. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos extratos etanólicos, foi determinada pelo método de diluição em ágar. Os testes foram realizados frente às cepas gram-positivas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp e gram-negativa *Escherichia coli*. Onde as bactérias gram-positivas apresentaram-se mais suscetíveis do que a gram-negativa. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos da própolis de *Melipona* sp (Manduri) e *Partamona* sp (Cupira) mostraram-se superior a da *Apis mellífera*.

Gonsales *et al.*, (2006) coletou a própolis (*Apis mellífera*) de várias regiões do Brasil (São Paulo, Goiás e Paraná) com o intuito de investigar a atividade antibacteriana das amostras de diferentes localidades. Os extratos etanólicos da própolis foram testados frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por meio da metodologia de difusão em disco, mostrando inibição apenas para o crescimento de *Staphylococcus aureus*, fato que corrobora com o presente estudo, uma vez que em ambos os trabalhos não houve inibição do crescimento de *Escherichia coli*, o que converge com a do presente estudo demonstrando certo grau de resistência de *Escherichia coli* a extrato de própolis e geoprópolis.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio, uma perturbação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos, o que pode estar relacionado à patogênese de várias doenças, incluindo doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e o câncer (SAYRE *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007). Portanto, a seleção de produtos naturais com propriedades potencialmente antioxidantes parece ser de importância central, a fim de identificar os extratos ou frações que possuem a capacidade de limpeza tanto em ambos os radicais livres e cadeia de reações de iniciação ou na ligação com catalisadores das reações oxidativas (DORMAN *et al.*, 2003).

Assim, procedeu-se a avaliação antioxidante do extrato bruto etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* empregando o método ORAC_{FL}, obtendo-se bons resultados, confirmando trabalhos anteriores que expõem a geoprópolis como uma excelente fonte antioxidante (CAMPOS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013), com alto potencial utilizado na prevenção da degeneração de doenças crônicas (ALVES DE SOUZA *et al.*, 2013).

Segundo Bogdanov (2011), a atividade antioxidante da própolis é devido a sua alta concentração de compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes. Silva *et al.*, (2013) avaliou a atividade antioxidante fazendo uso do método de sequestro de radicais livres, DPPH, de suas espécies de abelhas sem ferrão Amazônica, e comprovou que o extrato de geoprópolis de *Melipona. interrupta* apresenta uma maior atividade antioxidante quando comparado ao extrato da geoprópolis da *Melipona seminigra*. Além de que, do fracionamento do extrato metanólico de *M. interrupta* foi possível isolar quatro flavonoides, compostos possivelmente responsáveis pelas atividades antioxidantes encontradas.

Campos *et al.*, (2014) tiveram como o principal objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico produzido a partir da própolis de *Melipona orbigny* que é encontrada no Mato Grosso do Sul. A atividade antioxidante foi feita pelo método de captura de radicais livres, DPPH, mostrando como resultado que o própolis de *Melipona orbigny* apresenta um elevado potencial antioxidante. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas *Escherichia coli* (ATCC8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e o fungo *Candida albicans* (ATCC10231), mostrou-se eficiente contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, fazendo uso da técnica de microdiluição. Tais resultados confirmam a resistência de *Escherichia coli*, frente à geoprópolis observada no presente estudo, bem como pode relacionar a atividade antioxidante à atividade antimicrobiana.

A avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* foi realizada pelo método da desnaturação da proteína (BSA). O ensaio baseia-se na capacidade do extrato inibir a desnaturação da albumina do soro bovino fetal (BSA). Os mecanismos de desnaturação provavelmente envolvem alterações eletrostáticas dos hidrogênios e das ligações dissulfeto (CHOPADE *et al.*, 2012; BHASKAR & MOHITE, 2010). Desta forma o extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mostra-se promissor uma vez que encontramos poucos relatos sobre a atividade anti-inflamatória de geoprópolis de meliponíneos no Brasil, sendo este o primeiro relato da atividade em ensaios anti-inflamatórios *in vitro*.

A estratégia da utilização da técnica ESI-MS/MS na desreplicação e consequente identificação de ácidos fenólicos e flavonoides se deve ao fato de que há documentado em literatura trabalhos que têm relatado a utilização da técnica ESI-MS/MS na identificação de ácidos fenólicos e flavonoides, como uma técnica útil e confiável (VAN HONG *et al.*, 2011).

Assim, procedeu-se a avaliação ESI-MS/MS na identificação de compostos presentes no extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Tabela 2) identificando 4 ácidos fenólicos e 1 flavonoide, substâncias possivelmente responsáveis pelas atividades biológicas observadas.

Falcão *et al.*, (2010) realizou estudo frente a extrato etanólico da própolis encontrada no Nordeste de Portugal, onde o extrato etanólico foi fracionado por cromatografia líquida de alto desempenho e os compostos fenólicos foram identificados por espectrometria de massa eletrospray no modo negativo. Esta técnica permitiu que fossem identificados 37 compostos fenólicos, além dos flavonoides e ácidos fenólicos comuns que são encontrados nas zonas temperadas, foram encontrados variados compostos que não haviam sido descritos na literatura.

Segundo Sawaya (2006), há vários estudos sobre a própolis obtida da *Apis mellífera* que é encontrada em regiões de clima temperado. A presente autora com o objetivo de estudar a própolis brasileira determinando suas fontes vegetais e composição química faz uso da espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), comprovou que variadas amostras de própolis de espécies de abelhas nativas que foram obtidas em varias partes do Brasil, puderam ser divididas em três grupos principais de acordo com as plantas que foram utilizadas como fontes vegetais de resinas. Segundo a autora, a técnica desenvolvida no trabalho é confiável e rápida, assim podendo haver a caracterização de amostras de própolis de várias espécies diferentes de abelhas além de poderem ser de regiões distintas. Além do mais, sua utilização é segura para comparar extratos de plantas e amostras de própolis para a identificação das fontes vegetais das amostras.

De acordo com Franchin (2012), a geoprópolis da *Melipona scutellaris* que popularmente é conhecida como uruçú e pode ser encontrado no Nordeste do Brasil tem despertado bastante interesse na área de pesquisa. Há estudos que comprovam suas atividades biológicas, como antioxidante e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Devido a isso, mais estudos envolvendo este tipo de própolis são necessários, assim, possibilitando a identificação de novas atividades biológicas, como por exemplo: a antinociceptiva e anti-inflamatória, além, também, de identificar novas substâncias químicas que tenham um potencial farmacológico, com isso mostrando o potencial da geoprópolis de meliponíneos havendo a possibilidade de tornar-se uma fonte de subsistência para comunidades carentes.

6. CONCLUSÃO

O estudo em questão possibilitou concluir que:

- O estudo fitoquímico do extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mostrou-se efetivo, sendo possível identificar 4 ácidos fenólicos e 1 flavonoide.
- O extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta atividade antimicrobiana, pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.
- O extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta atividade antioxidante, determinada pelo ensaio ORAC_{FL}.
- O extrato bruto etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta atividade anti-inflamatória, determinada pelo método *in vitro* BSA.
- Frente aos resultados encontrados no presente estudo, a geoprópolis *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta potencial para futuras prospecções biológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, D. S. **A mandaçaia - Biologia, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** n.4. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. 104p..

ALVES DE SOUZA, S.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S. da; 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.

ALVES, J. O. **Espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem.** 2010. 101p. Dissertação (Mestrado em Química - Química Analítica). Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte.

ARAÚJO, M. J. A. M.. **Geoprópolis de *Melipona fasciculata* SMITH : ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica.** 2013. 93 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina.

AZEVEDO, D. A. **Espectrometria de Massas.** LABEM – Laboratório de Espectrometria de Massas Departamento de Química Orgânica Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004. 106p..

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. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114–117, 2005a.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung**. 53c, 402-406, 1998.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p-113-123, 2006.

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.

BARTH, O. M. & PINTO DA LUZ, C. F. Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. **Grana**, v.42, n.2, p.121-127, 2003.

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.; LO CASCIO, R.; CRISAFI, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **J Pharm Pharmacol**, v.51, n.8, p.971-974, 1999.

BOGDANOV, S. "Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review," **Bee Product Science**, 2011. Acesso em: 26 dez. 2014. Online. Disponível em: <<http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>>.

CALASANS, H. C. M. **Avaliação Morfométrica e Molecular de Abelhas Mandaçaiais (*Melipona spp.*) da Região da Foz do Rio São Francisco**. 2012. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal de Sergipe.

CAMPOS, J. F.; DOS SANROS, U.P.; MACORINI, L. F. B.; MESTRINER, A. M.; BELESTIERI, J. B. P.; PAREDES GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidante and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae), **Food Chem. Toxicol.** 2014.

CARVALHO - ZILSE, G. A. & NUNES - SILVA, C. G. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. **Bees: Biology, Threats and Colonies**, p.147-168, 2012.

CASTALDO, S. & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, supplement 1, pp.S1-S6, 2002.

CASTRO, M. S. A. Farmacologia de produtos naturais. In: FRANCISCHI, J. N.; **A farmacologia em nossa vida**, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. Cap.9, p.115-116.

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*. **J Karad Inst Med Sci Univ**, v. 1, n. 1, p. 67-72, 2012.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells *In Vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CÓRDOVA, A. & NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.6, n.5, p.204-208, 2000.

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.

CORTOPASSI - LAURINO, M.; IMPERATRIZ-SONSECA, V. L.; ROUBICK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T. AGUILAR, I. B.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global Meliponiculture: challenges and opportunities. **EDP Sciences**, v.37, n.2, p.275-292, 2006.

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.

DA CUNHA, M. G. **Geoprópolis de *Melipona scutellaris*: Atividade antimicrobiana, antiproliferativa e ação sobre biofilme de *Streptococcus mutans* *in vitro***. 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) - Universidade Estadual de Campinas

DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C.; RUIZ, A. L. T. G de; CARVALHO, J. E. IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. de; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.13, n.1, p.23, 2013.

De OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais e naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da Resistência a Antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de Esgoto Hospitalar e Sanitário**. 2006. 144p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo.

DINIZ, M. E. R., **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 108p. Dissertação (Mestrado em Química - Química Analítica). Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 255-262, 2003.

DUAILIBE, S. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v.15, n.5, p.420-423, 2007.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas Medicinais e Aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**, n.7, 2006.

DUARTE, M.C.T. FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, supl. 01, p.06-08, 2004.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. de O.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculada* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p.557-562, Out./Dez. 2008.

ELOFF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

FALCÃO, S. I.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L. M.; BARROS, C., DOMINGUES, M. R. M.; CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Anal Bioanal Chem**, n.396, p.887–897, 2010.

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. Acesso em 26 dez. 2014. Online. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302001000200003>

FRANCHIN, M. **Avaliação do Potencial Anti-inflamatório e antinociceptivo da Geoprópolis de *Melipona scutellaris***. 2012. 67p. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Unicamp.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DANNY, C. NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M de; IKEGAKI, M. ROSALEN, P. L. Bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis decreases neutrophils migration in inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 2013.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DANNY, C. NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H. ALENCAR, S. M de; IKEGAKI, M. ROSALEN, P. L. "Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α ." **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.709–715, 2012.

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.

JANSEN, A. M.; SCHEFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial Activity of Essential Oils: a 1976-1986 Literature Review. Aspects of Test Methods. **Planta Medica**. Stuttgart, v. 40, p.395-398, dez. 1987.

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

KERR, W. E. CARVALHO, G. A. NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu - Biologia, Manejo e Conservação**. N. 2. Belo Horizonte, MG: Acangaú, 1996; patrocínio Fundação do Banco do Brasil. 157p..

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. J. AM.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA R. NM.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.11, n.1, p.108, 2011.

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.

MALVEZZI, C. K. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações**. 2010. 113p. Tese (Doutorado em Ciências- Área de conversão de Biomassa), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

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.

MATOS, J. A. L. **Potencial biológico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-Santa-Maria)**. 2011. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto.

MELANI, A. C. F. **Atividade Antibacteriana da Própolis de *Apis mellifera* SOBRE *Enterococcus faecalis*: estudo *in vitro* e *ex vivo***. 2009. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.** p. 316-320, 2005.

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.

MORAES, M. C. B. & LAGO, C. L. do. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p.556-563, 2003.

NETTO, C. G. As plantas e a produção de novos fármacos (Grupo desenvolve tecnologia nas áreas de fitofarmacêutica e produtos naturais). **Jornal da Unicamp**, Universidade Estadual de Campinas, v. 401, p.9, 30 de junho a 13 de julho de 2008. Acesso em 22 dez. 2014. Online. Disponível em:< http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju401pag09.pdf>

NOGUEIRA - NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Ed. Chácaras e Quintais, São Paulo, 1953. 280pp..

NOGUEIRA - NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem Ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 447p., 1997.

OBIOLS, C. L. Y. **O gênero *Melipona* ILLIGER, 1806 em Minas Gerais - Identificação, Distribuição e Estado Atual de Conservação**. 2008.116p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto De Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais.

OLIVEIRA, A. L. Resistência bacteriana a antibióticos: uma análise da conduta hospitalar. **Revista Cesumar- Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**. v. 11, n.1, p.59-69, 2006.

OLIVEIRA, R. L.; MARQUES, M. M. M.; SILVA, A. R. A.; SANTOS, S.C.C.; QUESADO JÚNIOR, S.; GUEDES, M. I.F. Bioprospecção da atividade antimicrobiana e antioxidante, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico de *Piptadenia pterosperma* Benth. **Rev. Bras. Farm.** v.92, n.4, p.362-366, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.18, n.2, p.301-307, 2008.

OU, B. ; HAMPSCH-WOODILL, M. ; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

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.

PERALTA, E. D. **Atividade Antimicrobiana E Composição Química De Méis Do Estado Da Bahia**. 2010. 267p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Feira de Santana, BA.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.** v.34, n.3, p.231-247, 2009.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International journal of Biomedical science**, v.4, n.2, p.89-96, 2008.

PIMENTA, A. M. de C. Os desafios do proteoma. **Ciências Hoje**, v.32, p. 16-22, 2003.

PRADO, S. C. **Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimicrobiana dos Extratos Brutos e Frações de *Pfaffia glomerata***. 2014. 46p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - IFSULDEMINAS - Campus Inconfidentes.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3273-3279, 2003.

PRONI, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na Bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Arq. Ciên.vet.zool. UNIPAR**, v.3, n.2, p.145-150, 2000.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; LLOP, C.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-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.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.11 , n.2, p.57-69, 2001.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Área de pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 61, n. 1-2, p. 19-25, 2006.

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.

SALVADOR, M. J.; de LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA N. L.; PASCOAL, A. C.; STEFANELLO, M. E. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

SAYRE, L.M.; PERRY, G; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, 2007.

SCHWARZ, H. F. **Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere**. Bulletin of the American Museum of Natural History. v.90. New York, 1948, 546p..

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.

SILVA, W. P. & PAZ, J. R. L. da. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v.10, n.3, p.146-152, 2012.

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.

SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. de; FONSECA, A. A. O.; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B. de A. Perfil sensorial e aceitabilidade de méis de abelhas sem ferrão submetidos a processos de conservação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p.72-77, 2008.

SOUZA, S. A.; SILVA, E. M. S. ; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Flavonóides da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke). In: **XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2012, Bento Gonçalves (RS).

TOMÁS - BARBERÁN, F. A.; GARCIA - VIGUERA, C; VIT - OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS - LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical from Venezuela. **Phytochemistry**, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera maritima* (Planta in natura e obtida por cultura de células)**. 2008. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos – S.P.

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.

VAN HONG, N. T.; RIVIÈRE, C.; HONG, Q. T.; CHATAIGNÉ, G.; HOAI, N.N.; DEJAEGHER, B.; TISTAERT, C.; KIM T. N.; VAN KIEM, P.; VANDER HEYDEN Y.; VAN M. C.; QUETIN-LECLERCQ J. Identification by LC-ESI-MS of flavonoids responsible for the antioxidant properties of Mallotus species from Vietnam. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 813-818, 2011.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCIB, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEVC, A. Chemical Composition and Biological Activity of Propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung**. 55c, p.785-789, 2000.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 4, n.2, p.119-130, 2007.

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.

VILLAS - BÔAS, J. **Manual Tecnológico - Mel de abelhas sem ferrão**. 1ªed. Brasília,DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012. 96p..