

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

Avaliação dos potenciais antioxidante e antimicrobiano da
própolis das abelhas nativas *Melipona quadrifasciata anthidioides*,
***Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae)**

Carolina Santos Pereira Cardoso Trindade

Dourados – Mato Grosso do Sul

Março – 2012

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

Avaliação dos potenciais antioxidante e antimicrobiano da
própolis das abelhas nativas *Melipona quadrifasciata anthidioides*,
***Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae)**

Carolina Santos Pereira Cardoso Trindade

Orientador:

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Co-orientador:

Prof. Dr. José Benedito Parella Balestieri

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

Dourados – Mato Grosso do Sul

Março – 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

T833p	<p>Trindade, Carolina Santos Pereira Cardoso.</p> <p>Potenciais antioxidante e antimicrobiano das abelhas nativas <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>, <i>Plebeia droryana</i> e <i>Scaptotrigona depilis</i> (Hymenoptera, Apidae). /Carolina Trindade. – Dourados, MS: UFGD, 2014.</p> <p>73f.</p> <p>Orientador: Prof.Dr. Edson Lucas dos Santos.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Entomologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1.Meliponinae. 2. Estresse oxidativo. 3. Fungicida.4. Bactericida. 5. Bacteriostático.</p> <p>CDD –595.75</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

AGRADEÇO,

A **Deus**, pela minha vida, minha família, meus amigos e por meu trabalho.

Por sua infinita misericórdia em minha vida. O caminho foi difícil, mas Deus me sustentou em todos os momentos!

DEDICO,

A minha avó, **Alexandrina Cardoso**, que mesmo que fossem escritas mil palavras, não seria capaz de expressar o quanto é importante em nossas vidas. Exemplo de caráter, persistência, competência, carinho, amor e companheirismo. Esteve ao meu lado em cada etapa que conclui, agradeço a mãe e amiga maravilhosa que você é. Tenho muito orgulho de ser neta de uma mulher forte, que não teve medo da vida e a enfrentou com muitas dificuldades, mas nunca desistiu. Estou muito feliz por concluir mais esta etapa e logo estar convivendo diariamente com você. Amo eternamente a minha gordinha.

Ao meu pai, **Alexandre Cardoso Trindade**, amigo fiel que nunca me faltou, exemplo que procuro seguir a cada dia de minha vida. Agradeço pelo incentivo de todos os dias, por acreditar em mim sempre e me apoiar em todas as minhas decisões. Sei que hoje estou concluindo este mestrado porque desde criança ouço meu pai dizendo: “estude minha filha que um dia você será alguém na vida e alcançará tudo o que deseja”, e é por isso que hoje estou aqui, por mim e por você pai. Saiba, que mesmo que do meu jeito, eu te amo e quero estar sempre dividindo a minha vida com você e ser sempre um motivo de orgulho e alegria. Te amo, meu amigo.

A minha mãe, **Rosilane Santos Pereira**, que mesmo a muitos quilômetros de distância, me incentiva a cada dia acreditando em mim, não me deixando desistir. Criativa, amável, alegre, carinhosa e me lembrando todos os dias que Deus não me

deixa em nenhum momento. Obrigada mãe pelas palavras ao telefone e internet, quantas vezes até mesmo lendo a bíblia pra mim. Te amo sempre.

A minha avó, **Mariazinha** (é assim que ela gosta que a chamem), obrigada por fazer parte da minha formação, da minha vida. Que desde a época de escola está ao meu lado, tornando aqueles dias cansativos e cheios de trabalhos e provas, dias alegres com suas músicas ao longo do caminho de ida e volta pra casa. Tenho muito orgulho de ser sua neta, me espelho no seu jeito alegre de levar a vida, sempre brincando e fazendo as pessoas felizes. Dedico também a você vó mais essa vitória. Te amo.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os 24 meses de mestrado.

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho, infra-estrutura e apoio.

Ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, pelos ensinamentos, orientação, confiança e por todas as oportunidades oferecidas.

A Prof. Dr. Kely de Picoli Souza, pelos ensinamentos e sugestões, as quais proporcionaram a valorização do nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. José Benedito Perrela Balestieri, pelo fornecimento da matéria prima, por estar sempre disponível a esclarecer dúvidas e por proporcionar um maior conhecimento sobre as abelhas sem ferrão.

A minha amiga Jaqueline Ferreira Campos, pelo apoio incondicional, amizade que levaremos para o resto de nossas vidas. Obrigada por estar ao meu lado me ajudando em cada etapa, não só do mestrado, mas de toda a minha vida acadêmica. Além do apoio na vida profissional, sempre pude contar com seu apoio na vida pessoal, seu e da sua família, pessoas que amo muito e agradeço pelo carinho. Mesmo não estando mais com você todos os dias saiba que a amo muito e sempre estarei pronta a estar do seu lado em todos os momentos. Obrigada.

Ao meu “brodi” Uilson, que sempre esteve ajudando na execução dos experimentos e também pela ajuda e atenção. Te agradeço muito pela amizade.

Ao Luis Fernando, que proporcionou a execução dos experimentos antimicrobianos e que sempre esteve disposto a nos ajudar. Agradeço também pela amizade sincera.

Aos demais membros do GEBBAM, pela ajuda, compreensão e pela convivência tão alegre que sempre tivemos, com muitas risadas e brincadeiras.

As minhas amigas de tantos anos, Janaína, Ana Cláudia e Renata, as quais sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Muito obrigado pelo apoio e amizade.

Aos técnicos de laboratório da FCBA, Fabiana, Tati, Mara, Jú, Marquinhos, Edi e Lívia, pela ajuda no preparo das aulas práticas e também de nossos experimentos e pelo carinho com que sempre me trataram.

Aos meus amigos do condomínio Santo André (PROJAC), pelo incentivo, apoio e imenso carinho de todos. São amigos que amo muito.

A minha amiga Rosália e Elaine, pelo apoio, carinho e compreensão de todos os dias.

Agradeço a toda a minha família e amigos, que de alguma forma, mesmo que pequena, me apoiaram e incentivaram.

Índice

Resumo	11
ABSTRACT	12
1. Introdução	13
1.1. Abelhas.....	13
1.1.1. Espécies investigadas neste estudo	16
1.2. Produtos das abelhas sem ferrão	17
1.2.1. Cera e cerume	17
1.2.2. Samora/saburá	17
1.2.3. Mel	18
1.2.4. Geoprópolis	19
1.2.5. Própolis	19
1.3. Atividades biológicas da própolis.....	20
1.3.1. Atividade antioxidante.....	20
1.3.2. Atividade antimicrobiana	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Identificação das espécies	23

3.2. Coleta das amostras	23
3.3. Preparo dos extratos etanólicos da própolis	24
3.4. Atividade antioxidante	24
3.4.1 Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	24
3.4.2. Proteção contra hemólise em eritrócitos induzida por 2,2' Azobis (2-metilpropanamida) dicloridato (AAPH).....	26
3.5. Atividade antimicrobiana.....	31
3.5.1. Método de difusão radial em Agar	32
3.5.2. Método de microdiluição	33
3.6. Cálculos e Análises Estatísticas.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Coloração dos Extratos.....	36
4.2. Atividade Antioxidante.....	37
4.2.1. Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH.....	37
4.2.2. Atividade anti-hemolítica da própolis frente ao indutor de hemólise AAPH.....	41
4.3. Atividade antimicrobiana.....	49
4.3.1. Atividade antifúngica e antibacteriana da própolis.....	49
4.3.2. Concentração inibitória mínima da própolis	51
5. DISCUSSÃO	55
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60

Resumo

Este estudo buscou avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano da própolis das espécies de abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis*. As amostras de própolis foram coletadas e os extratos etanólicos foram preparados. A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade de captura do radical livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e da proteção contra hemólise induzida por 2,2' Azobis 2-metilpropanamida dicloridato (AAPH) em eritrócitos. As avaliações antimicrobianas foram determinadas frente à espécie de fungo *Candida albicans* e às espécies de bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa), utilizando-se as técnicas de difusão em ágar (avaliação qualitativa) e microdiluição (avaliação quantitativa). A atividade antioxidante da própolis para cada espécie é representada através da concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres (IC₅₀): *M. q. anthidioides* (77,3 ± 2,7 µg/ml), *P. droryana* (133,7 ± 19,9 µg/ml) e *S. depilis* (1749 ± 65 µg/ml). No ensaio de indução de hemólise, a própolis de *M. q. anthidioides* foi capaz de proteger os eritrócitos contra hemólise após 60, 120 e 180 minutos de incubação, sem promover alterações morfológicas nas membranas dos eritrócitos. Nas concentrações avaliadas, todas as amostras apresentaram efeito fungicida contra *C. albicans* (nas concentrações testadas de 6,25-25 mg/ml para *M. q. anthidioides* ; de 25-100 mg/ml para *P. droryana* e *S. depilis*). Frente à bactéria *S. aureus*, a própolis de *M. q. anthidioides* exerceu ação bactericida (6,25-25 mg/ml), já as amostras de *P. droryana* (3,125–12,5 mg/ml) e *S. depilis* (25-100 mg/ml) apresentaram ação bacteriostática. Nenhuma amostra de própolis apresentou atividade contra a bactéria *E. coli* nas concentrações avaliadas. Em conjunto estes dados mostram o perfil antioxidante e antimicrobiano da própolis das abelhas nativas sem ferrão *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis*. Além de caracterizar o potencial biológico da própolis destas espécies, este estudo contribui indiretamente para conservação da biodiversidade brasileira.

Palavras-Chave: Meliponinae; estresse oxidativo; fungicida; bactericida; bacteriostático.

ABSTRACT

This study sought to evaluate the potential antioxidant and antimicrobial activities of propolis from stingless bee species *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* and *Scaptotrigona depilis*. The propolis samples were collected and the extracts prepared. The antioxidant activity were evaluated by their ability to capture free radicals using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and protection against hemolysis induced by 2,2 'azobis (2-methylpropanamide) dicloridato (AAPH) in erythrocytes. Antimicrobial activity were determined against the species of fungi *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus* (gram positive bacteria) and *Escherichia coli* (Gram negative bacteria), using the agar diffusion techniques (qualitative evaluation) and microdilution (quantitative evaluation). The antioxidant activity of propolis for each species was represented by the concentration able to inhibit 50% of free radicals (IC₅₀): *M. q. anthidioides* (77.3 ± 2.7 ug / ml), *P. droryana* (133.7 ± 19.9 mg / ml) and *S. depilis* (1749 ± 65 mg / ml). In the test of induction of hemolysis the propolis *M. q. anthidioides* was able to protect erythrocyte against hemolysis 60, 120 and 180 minutes of incubation, without promoting morphological changes in the membranes of erythrocytes. In the concentrations tested, all samples showed fungicidal effect against *C. albicans* (*M. q. anthidioides* between: 6.5 to 25 mg / ml, *P. droryana* between: 25-100 mg / ml and *S. depilis* between: 25-100 mg / ml). Against the bacteria *S. aureus* the propolis from *M. q. anthidioides* showed bactericidal effect (6,25 to 25 mg / ml), the propolis from *P. droryana* (3,125 to 12,5 mg / ml) and *S. depilis* (25-100 mg/ml) showed bacteriostatic effect. No samples of propolis showed activity against the bacteria *E. coli* in the concentrations evaluated. Together these data show the antimicrobial and antioxidant activity of propolis from native stingless bees *M. q. anthidioides*, *P. droryana* and *S. depilis*. In addition to characterizing the biological potential of propolis of these species, this study contributes indirectly to biodiversity conservation in Brazil.

Keyword: Meliponinae; oxidative stress, fungicidal, bactericidal, bacteriostatic.

1. Introdução

1.1. Abelhas

As abelhas pertencem à ordem Hymenoptera, são descendentes das vespas, que ao invés de aranhas e pequenos insetos, se alimentam de pólen. Atualmente são descritas mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que o dobro destas ainda não foram descritas (Santos, 2002).

Estes insetos destacam-se como eficientes forrageiros e polinizadores, sendo por si só os mais importantes agentes da polinização. Segundo Grimaldi e Engel (2005), surgiram a cerca de 120 milhões de anos, período que houve . O papel ecológico das abelhas é fundamental na manutenção da diversidade de espécies vegetais, sendo que no ato de visitação às flores, as abelhas transferem o pólen de uma flor para a outra, promovendo a polinização cruzada, garantindo a variabilidade genética dos vegetais e a formação de bons frutos (Santos, 2002).

Segundo a classificação de Michener (2007), Silveira e colaboradores (2002) as abelhas estão reunidas na superfamília Apoidea, que por sua vez é constituída por diversas famílias. Dentre elas a família Apidae apresenta hábitos sociais mais avançados e possui somente uma Apinae e diversas tribos, sendo uma delas a Meliponini, podendo ter uma sub-tribo denominada Meliponina (Silveira e cols., 2002). Diferentemente, Nogueira-Neto (1997) relata que ao invés de uma são quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. As três primeiras famílias estão num estágio social avançado e a grande maioria das outras Apoidea são abelhas solitárias ou de hábitos sociais primitivos.

Dentre as abelhas de hábitos sociais avançados, a subfamília Meliponinae geralmente encontrada em regiões subtropicais agrupa as chamadas "abelhas indígenas sem ferrão", assim denominadas por possuírem aparelho ferroador atrofiado ou inexistente. Estas abelhas são polinizadores importantes, sendo responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (Kerr e cols., 1996).

De acordo com Nogueira-Neto (1997), o professor padre Jesus S. Moure dividiu a subfamília em duas tribos: Meliponini, a qual é composta por todas as abelhas do gênero *Melipona* e Trigonini, constituída de vários gêneros, sendo uma tribo muito diversificada. A primeira é caracterizada por não ter o hábito de construir células reais, todos os componentes da colônia nascem e se desenvolvem até o estágio adulto em células de tamanho igual. Outra característica é a entrada do ninho de suas espécies, que geralmente está localizada no centro de uma estrutura de barro. Diferentemente, as abelhas da tribo Trigonini constroem células reais maiores que as outras, sendo este o local de onde emergem as rainhas e a entrada de suas colônias geralmente possuem um formato de tubo.

Diversas espécies fazem parte da tribo Meliponini, como: mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), urucu (*Melipona scutellaris*), jandaíra (*Melipona subnitida*), guaraipe (*Melipona bicolor*), manduri (*Melipona marginata*), tujuba (*Melipona rufiventris*), tiúba (*Melipona compressipes*), preguiçoso (*Melipona seminigra pernigra*), entre outras. A tribo Trigonini é composta por muitas espécies, tais como: jataí (*Tetragonisca angustula*), mirins (*Plebeia* spp.), borá (*Tetragona* spp.), irapuá (*Trigona spinipes*), canudo (*Scaptotrigona* spp.),

marmeladas (*Frisiometitta* spp.), caga-fogo (*Oxytrigona tataira*), entre outras (Carvalho e cols., 2003).

As características morfológicas das abelhas nativas são as mesmas atribuídas aos outros insetos e artrópodes em geral (Kerr e cols., 1996). Estas espécies apresentam uma diversidade de cores, tamanhos e formas que as caracterizam, algumas com tons verde, roxo e azul metálico são até confundidas com moscas varejeiras, outras possuem listras e manchas pelo corpo, cores lisas e brilhantes, variando entre tonalidades do negro ao amarelo. O tamanho pode variar de mais de 5 centímetros a cerca de 2 milímetros (Santos, 2002).

O ninho dos meliponíneos se apresenta de forma e tamanhos variados (Figura 1). Uma mistura de cera branca e pura com própolis constitui as células, material este denominado cerume, o qual também é utilizado na vedação das mesmas, após a ovoposição, para vedar frestas e delimitar cavidades nos ninhos. Na tribo Meliponini, ao invés de cerume as abelhas utilizam o geoprópolis, uma mistura de própolis e barro (Nogueira-Neto, 1997).



Figura 1. (A) Entrada do ninho de abelhas do gênero *Melipona*. (B) Entrada do ninho de abelhas do gênero *Scaptotrigona*.

A localização dos ninhos é bastante diversa, podendo ser construídos em ocos de árvores, bambus, ou até mesmo em cavidades naturais, como barrancos, e artificiais, como muros e paredes de casas de alvenaria (Campos, 1983).

As abelhas possuem diferentes funções dentro da colméia, que variam de acordo com a casta a que pertencem. A rainha é responsável pela reprodução e coesão dos membros da colônia. Dependendo da espécie, o macho pode participar da produção de cera ou da desidratação do néctar, mas em geral sua principal função é copular com rainhas jovens (Kerr e cols., 1996). Dentre as funções das operárias, sair e alertar as demais abelhas sobre as fontes de alimentos, argila e resinas disponíveis, flores que possuem o néctar e pólen para serem coletados (Nogueira-Neto, 1997). Estas são chamadas de abelhas campeiras, esse tipo de comunicação é muito importante, pois auxilia na otimização da busca de recursos para a preparação de produtos, como mel, própolis, entre outros.

1.1.1. Espécies investigadas neste estudo

Dentre as espécies presentes no Mato Grosso do Sul, nosso estudo tem como foco a própolis produzida pelas espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836, *Plebeia droryana* Friese, 1900 e *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942.

M.q.anthidioides, conhecida popularmente como “mandaçaia”, é uma subespécie de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836. Integrante da tribo Meliponini, encontra-se distribuída somente no Brasil. As espécies *P. droryana*

("mirim droriana") e *S. depilis* ("canudo") pertencem à tribo Trigonini e podem ser encontradas na Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil.

A maioria dos estudos sobre estas espécies estão relacionados a comportamento (Sakagami e cols., 1965; Collevatti e cols., 2000; Ferreira e cols., 2010; Lichtenberg e cols., 2010), fisiologia (Neves e cols., 2003) e polinização (Singer, 2002; Roselino e cols., 2009; Roselino e cols., 2010), sendo poucos os relatos científicos que descrevam o potencial farmacológico de seus produtos.

1.2. Produtos das abelhas sem ferrão

1.2.1. Cera e cerume

A cera é uma placa branca secretada através de glândulas presentes entre os segmentos abdominais localizados no dorso do abdome de meliponíneos jovens da colméia. Pode ser encontrada em depósitos nos ninhos ou compor a entrada dos mesmos em algumas espécies (Nogueira-Neto, 1997).

O cerume é o resultado da mistura da cera pura e branca com resinas vegetais coletadas pelas abelhas de árvores e arbustos. A cor desse material pode variar de amarelo claro a uma cor bem escura. Essa variação depende da quantidade de resina (própolis) misturada à cera ainda pura (Nogueira-Neto, 1997).

1.2.2. Samora/saburá

O pólen coletado pelas abelhas é transportado por uma estrutura nas tíbias das pernas traseiras, expansão encurvada, denominada corbícula. O mesmo é armazenado em potes de cerume, possui um aspecto de massa e

uma consistência pastosa. A partir disso, o pólen coletado é trabalhado e modificado juntamente com gorduras vegetais para depois ser utilizado pelas abelhas sem ferrão, sendo também conhecido como samora ou saburá. Os meliponíneos manipulam a samora com suas mandíbulas e durante este processo recebe secreções de suas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (Nogueira-Neto, 1997). Sua composição pode variar, mas geralmente constitui-se de água, proteínas, lipídios e glicídios (Souza e cols., 2004).

1.2.3. Mel

A matéria-prima do mel é o néctar que é coletado das flores e depois é transformado pelas abelhas. Essa transformação consiste na sua desidratação, isso ocorre através da exposição e da retração de uma gotícula do mesmo na língua de várias abelhas. Assim a quantidade de água presente no néctar vai evaporando e o líquido vai se tornando mais denso, a sacarose ali presente se transforma em frutose e glicose através da ação de enzimas. O mel é estocado em potes de cerume dentro dos ninhos (Nogueira-Neto, 1997).

O mel é constituído por três grupos de componentes essenciais: água (17%), glicídios (80%) e substâncias diversas (3%), como enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonóides e materiais minerais (Lianda, 2009).

Embora produzindo mel em menor quantidade, os meliponíneos fornecem um produto que se diferencia do mel de *A. mellifera*, principalmente no sabor e no aroma, alcançando preços elevados no mercado (Crane, 1985; Marcchini, 1998; Cortopassi, 2002; Evangelista, 2003; Alves e cols., 2005).

1.2.4. Geoprópolis

O geoprópolis é composto de própolis e barro, podendo também apresentar outras substâncias. É utilizado para delimitar cavidades e também para vedar frestas do ninho. Espécies como *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia), *Melipona subnitida* (jandaíra) e a *Melipona favosa orbigny* (manduri de Mato Grosso) apresentam sua própolis acumulada juntamente com barro (Nogueira-Neto, 1997).

1.2.5. Própolis

A palavra própolis é derivada do grego *pro*, em defesa, e *polis*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (Pereira e cols., 2002). É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores; além desses, na colméia, estes insetos adicionam secreções salivares e enzimas (Franco e cols., 2000; Pereira e cols., 2002). As abelhas de fato usam a própolis para protegê-las contra insetos e micro-organismos, no reparo de frestas ou danos à colmeia, na assepsia de locais para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (Marcucci, 1996).

Alguns aspectos da ecologia vegetal, zona de temperatura e sazonalidade da região onde a própolis foi coletada, além da variabilidade genética da abelha rainha, são fatores que podem influenciar na quantidade, qualidade e composição química deste material resinoso (Park e cols., 1998; Bankova e cols., 2005; Sawaya e cols., 2007; Castro e cols., 2007).

A maioria dos compostos encontrados na própolis são distribuídos em diversas classes principais, tais como: ácido fenólico e outros ésteres,

flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, chalconas), terpenos, β esteróides, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos, naftaleno, derivados de benzopirano, benzofenona, ácido caféico, derivados do ácido cinâmico e ácido benzóico (Banskota, e cols., 2000; Albuquerque, e cols., 2007).

Nos últimos anos vêm crescendo o interesse pela composição química da própolis, a qual pode ser considerada uma substância com grande potencial para a indústria e no tratamento de diversas patologias (Marcucci 1995). Esta resina tem apresentado propriedades terapêuticas, tais como: anti-inflamatória, antitumoral, anestésico local, antiúlcera gástrica, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica, neuroprotetora, imunomodulatória, entre outras (Park e cols., 1998; Suzuki e cols., 2002; Castaldo e Capasso 2002; Fernandes e cols., 2007; Velazquez e cols., 2007; Manna e cols., 2011; Watanabe e cols., 2011; Bachiega e cols., 2012). No entanto, a maioria dos relatos presentes na literatura descrevem propriedades relacionadas a própolis da abelha *Apis mellifera*, existindo poucos estudos sobre as abelhas nativas brasileiras.

1.3. Atividades biológicas da própolis

1.3.1. Atividade antioxidante

É crescente a preocupação com patologias ligadas a geração de radicais livres, motivo pelo qual vem sendo desenvolvidos estudos a fim de proporcionar entendimento e avanços no assunto. Os radicais livres são moléculas reativas com um ou mais elétrons desemparelhados, são formados na mitocôndria e geralmente danificam moléculas como DNA, lipídeos e proteínas (Vasconcelos e cols., 2007)

As espécies reativas de oxigênio são caracterizadas por serem ou gerarem radicais livres. São formadas através de processos oxidativos que ocorrem a partir de compostos biológicos endógenos, ou podem ser gerados a partir de compostos exógenos. Dentre os processos biológicos envolvidos, a fosforilação oxidativa, responsável pela geração de energia através de formação de ATP na mitocôndria, é um dos mais importantes (Renz, 2003).

São muitas as evidências de que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no envelhecimento celular e doenças como diabetes, câncer, catarata, entre outras (Renz, 2003; Mathew e White., 2012). Em consequência disso, muitos estudos têm sido realizados a fim de buscar novas fontes naturais com potencial antioxidante. Um composto natural que vem se destacando por apresentar esta propriedade é a própolis da espécie *Apis mellifera* (Kumazawa e cols., 2004; Teixeira e cols., 2008; Lima e cols., 2009; Izuta e cols., 2009; Stevanato e Gregoris, 2010; Gülçin e cols., 2010; Laskar e cols., 2010; Righi e cols., 2011; Yang e cols., 2011; Guo e cols., 2011; Aliyazicioglu e cols., 2011; Abu-Mellal e cols., 2012). Estes estudos atribuem a ação antioxidante desta resina a alguns de seus constituintes, tais como: isoflavonas, chalconas, polifenóis, flavonóides, ácido cafeico e seus derivados.

1.3.2. Atividade antimicrobiana

Em decorrência dos elevados índices de casos de contaminação alimentar e infecções causadas por micro-organismos, além da resistência dos mesmos à antibióticos convencionais, muitos estudos estão sendo realizados em busca de novos agentes antimicrobianos. Além de moléculas sintéticas é importante a caracterização de novas substâncias que tenham origem natural,

provenientes da nossa fauna e flora, visto que a própria evolução foi capaz de selecionar compostos eficientes contra vários agentes causadores de infecções (Dafre, 2001).

A própolis de *A. mellifera* (Endler e cols., 2003; Katircioglu e cols., 2006; Alencar e cols., 2007; Rahman e cols., 2010; Kim e Chung, 2011; Dota e cols., 2011; Kalogeropoulos e cols., 2011), *Trigona laeviceps* (Umthong e cols., 2009) e *Melipona fasciculata* (Liberio e cols., 2011) apresentam importante atividade antimicrobiana. Tais estudos correlacionam as atividades antifúngica e antibacteriana da própolis aos seus componentes químicos, dentre os quais se encontram: polifenóis, flavonoides, ácido cafeico, ácido cinâmico e seus derivados.

A própolis é foco de muitos estudos, porém a grande maioria dos trabalhos avalia esta resina obtida a partir da espécie *A. mellifera*. No entanto outras espécies de abelhas são capazes de produzir este composto, como é o caso das espécies de abelhas sem ferrão.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar a atividade antioxidante e antimicrobiana da própolis das espécies *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis*.

2.2. Específicos

- Caracterizar a ação antioxidante da própolis das espécies *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis*;

- Verificar o efeito protetor da própolis com melhor atividade antioxidante contra hemólise induzida em eritrócitos;

- Determinar as atividades antifúngica e antibacteriana das amostras de própolis, frente ao fungo *Candida albicans* e às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

- Identificar a concentração inibitória mínima e estabelecer a capacidade fungicida ou fungistática e bactericida ou bacteriostática da própolis contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Identificação das espécies

As espécies de abelhas sem ferrão utilizadas neste estudo foram previamente enviadas à especialistas para identificação. *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi identificada pelo Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri, *Plebeia droryana* pelo Prof. Dr. Pd. Jesus Santiago Moure e *Scaptotrigona depilis* pelo Prof. Dr. João M. F. Camargo.

3.2. Coleta das amostras

As amostras de própolis das espécies *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis* foram coletadas pelo especialista Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri, no estado do Mato Grosso do Sul (Coordenadas: 22°13'12" S – 54°49'2" O). Após a coleta as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio estéreis, devidamente identificados com o nome de cada espécie e posteriormente armazenadas a -20°C. Todos os materiais utilizados na coleta foram esterilizados para evitar qualquer tipo de contaminação.

3.3. Preparo dos extratos etanólicos da própolis

Os extratos foram preparados na proporção de 4,5 ml de etanol 80 % para cada grama de própolis (Alencar e cols., 2007), obtendo a concentração final de 222,22 mg/ml. Após este processo as amostras foram levadas ao banho-maria a 70°C onde permaneceram até a total solubilização em etanol 80%. Durante este período todos os tubos de ensaio foram constantemente homogeneizados em um agitador “vórtex”.

Depois que as soluções foram solubilizadas a filtração foi realizada em papéis filtro com o auxílio de funis de vidro. O filtrado foi acondicionado em tubos de ensaio estéreis de 15 mL devidamente identificados. Posteriormente os extratos foram mantidos a -20°C.

3.4. Atividade antioxidante

3.4.1 Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O radical DPPH pode ser obtido pela dissolução do reagente em meio orgânico (Rufino e cols., 2007), gerando uma solução com coloração púrpura, mas quando o radical é reduzido a solução adquire cor amarela (Figura 2).

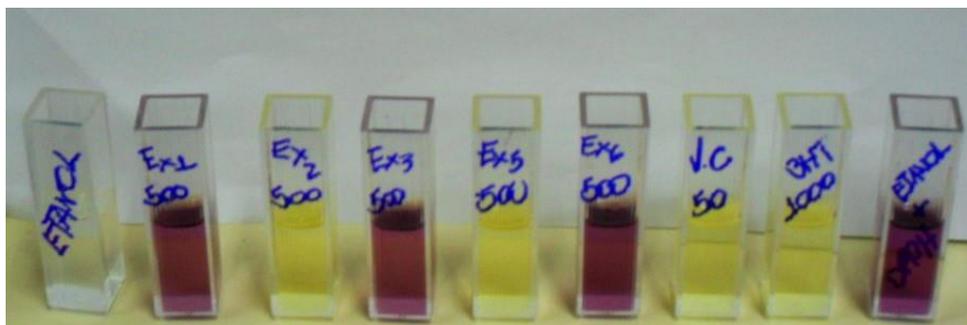


Figura 2. Solução etanólica de DPPH com extratos, ácido ascórbico e BHT.

Este método baseia-se na reação do radical com substâncias antioxidantes, as quais são capazes de doar prótons de hidrogênio H^+ e reduzir o radical. A capacidade antioxidante da amostra avaliada é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante na reação, sendo esta proporcional à concentração do antioxidante (Bondet e cols., 1997; Sanchez-Moreno, 2002). Este método é comumente utilizado por ser uma reação estável e simples, pois se trata de uma reação direta entre o radical e um antioxidante (Noipa e cols., 2011).

Neste estudo foi utilizado o método descrito por Gupta e Gupta (2011). A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade captadora de radicais livres DPPH.

Para cada experimento foi preparada uma solução de 0,11mM de DPPH em um volume de 100 mL, que foi mantida protegida da luz por se tratar de um composto fotossensível. Como controle positivo foi utilizado o hidroxibutiltolueno (BHT – antioxidante sintético que possui estrutura fenólica, com característica lipossolúvel, muito utilizado na indústria alimentícia e de cosméticos). Inicialmente o antioxidante padrão foi solubilizado em etanol 80%, resultando em uma solução estoque na concentração de 20 mg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas do controle e dos extratos nas concentrações: 1; 10; 50; 100; 200; 300; 500; 1000; 2000 $\mu\text{g/mL}$.

As cubetas, previamente identificadas com as diferentes concentrações do BHT e dos extratos, receberam 1800 µl da solução de DPPH e 200 µl de cada extrato e antioxidante padrão em suas respectivas concentrações. As soluções foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos, no escuro. Após este período estas soluções foram levadas ao espectrofotômetro (T70 UV/VIS – PG instruments Ltda) e as absorvâncias foram mensuradas na faixa de 517 nm.

3.4.2. Proteção contra hemólise em eritrócitos induzida por 2,2' Azobis (2-metilpropanamida) dicloridato (AAPH).

A avaliação quanto à proteção contra hemólise gerada pelo indutor AAPH utiliza eritrócitos a fim de avaliar a capacidade antioxidante de substâncias. Esse tipo de célula não possui núcleo e mitocôndrias, indicando uma baixa atividade metabólica, sendo a hemoglobina o seu principal constituinte. Por apresentar o grupo heme, esta proteína é quantificada e identificada tendo uma alta absorção em torno de 540 nm. Por fim, ácidos graxos poli-insaturados em alta concentração constituem a membrana plasmática dos eritrócitos, tornando-os suscetíveis a lise através da peroxidação lipídica. Devido a esses fatores e pela fácil obtenção destas células, o rompimento das hemácias causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) se torna um dos meios para avaliar a atividade antioxidante de substâncias e seus compostos (Forte-Gomes e cols. 2009)

Por apresentar melhor atividade antioxidante no método de captura do radical DPPH, o extrato da própolis da espécie *M. q. anthidioides* foi escolhido para que se avaliasse sua capacidade de

proteger os danos ocasionados por radicais livres às membranas dos eritrócitos. A ação anti-hemolítica da própolis foi avaliada de acordo com o método descrito por Valente e cols. (2011), com algumas alterações.

Para cada experimento foram coletados 5 mL de sangue de um doador saudável por meio de punção venosa, que foi depositado em um tubo com citrato anticoagulante. Em seguida a amostra de sangue foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o plasma sobrenadante e a camada celular superior, rica em leucócitos, foram descartados e cerca de 3 mL de solução salina 0,9% foram adicionados no mesmo tubo, homogeneizado e novamente encaminhado para a centrífuga a 2000 rpm por mais 10 minutos. Depois da centrifugação, a solução sobrenadante foi novamente retirada e o processo se repetiu por mais duas vezes.

Após todo processo de centrifugação, 11 mL de solução de hematócrito a 10 % foi preparada a partir da homogeneização de 9,9 ml de solução salina 0,9 % e 1,1 ml da papa de eritrócitos.

Neste experimento foi utilizado o indutor de hemólise AAPH, diluído em solução salina 0,9 % na concentração de 100 mM. O extrato da própolis foi inicialmente solubilizado em solução salina 0,9% para se obter uma solução estoque de 50 mg/ml e posteriormente diluído nas concentrações iniciais: 200, 300, 400 e 500 µg/mL. Este mesmo processo foi realizado com o antioxidante padrão, ácido ascórbico (antioxidante hidrossolúvel, encontrado em vários alimentos). Como referência de hemólise total foi utilizada a suspensão de eritrócitos

incubada com água destilada. O veículo etanol 80%, também foi diluído em salina a uma concentração de 1%.

O extrato e o ácido ascórbico foram avaliados na presença e na ausência AAPH, verificando se estes podem induzir os eritrócitos à hemólise. Na primeira etapa do ensaio, os eritrócitos foram pré-incubados por 30 minutos, em banho-maria, com 250µL de cada tratamento, de solução salina 0,9%, de etanol 1% e de água destilada separadamente em cada tubo devidamente identificado de acordo com os tratamentos e suas concentrações.

O hematócrito, o extrato e o ácido ascórbico foram preparados em concentrações iniciais duas vezes maiores que as finais. Pois, quando 250 µl da solução de hemácias foram adicionados ao mesmo volume de ácido ascórbico e de extrato suas concentrações foram reduzidas pela metade. Depois do período de pré-incubação mais 500 µl de AAPH, de solução salina 0,9 % e de água foram adicionados aos tubos de ensaio devidamente identificados, ocorrendo novamente a diluição. Após este processo as concentrações finais do extrato e do ácido ascórbico avaliadas durante o experimento foram de 50, 75, 100 e 125 µg/ml e o hematócrito de 10 % foi diluído a 2,5 % (Tabela 1).

Tabela 1. Procedimento experimental da indução de hemólise por AAPH

Pré-incubação (30 minutos)	Tratamentos	Concentração final
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl de salina	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5%
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl de Etanol	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Etanol
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl de salina	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 200 µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 50µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 300 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 75µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 400 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 100µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 500 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 125µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Ext. 200 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 50µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Ext. 300 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 75µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Ext. 400 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 100µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Ext. 500 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 125µg/ml + AAPH
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 200 µg/ml	+ 500µl de Salina	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 50µg/ml
Suspensão de hemácias 10 % + 250 µl Vit.C 300 µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 75µg/ml

Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Vit.C 400µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 100µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Vit.C 500µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Vit.C 125µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Ext. 200µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 50µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Ext. 300µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 75µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Ext. 400µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 100µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl Ext. 500µg/ml	+ 500µl de AAPH	Suspensão de hemácias 2,5% + Ext. 125µg/ml
Suspensão de hemácias 10% + 250 µl água destilada	+ 500µl de Água destilada	Suspensão de hemácias 2,5% + Água destilada

Após acrescentar todas estas soluções, as avaliações experimentais foram realizadas aos 60, 120, 180 e 240 minutos. Alíquotas de 200 µl da solução de cada tubo de ensaio de cada tratamento foram retirados e acrescentados a outros tubos contendo 1800 µl de solução salina. Estes foram levados a centrífuga a 3600 rpm por 10 minutos. Para cada ponto de avaliação do experimento foram utilizados 40 tubos de ensaio, além dos que permaneceram incubados à 37°C em banho-maria.

Cada uma das soluções centrifugadas foram transferidas cuidadosamente a cubetas, identificadas de acordo com os tratamentos e suas respectivas concentrações. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (T70 UV/VIS – PG instruments Ltda) a 540 nm.

Lâminas com alíquotas de 40 µl dos tratamentos de hemácias com solução salina, com etanol, com AAPH e com a maior concentração do extrato e do ácido ascórbico (125 µg/ml), com e sem o indutor de hemólise AAPH, foram preparadas a fim de visualizar e registrar, com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio, a morfologia das células a cada 60 minutos de experimento.

3.5. Atividade antimicrobiana

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para a avaliação dos potenciais antimicrobianos da própolis das espécies estudadas: o teste de difusão em ágar é um método qualitativo, em que um micro-organismo entra em contato com a substância a ser avaliada através de um meio de cultura sólido, o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo é relacionado com a concentração da substância testada. Neste método, a substância analisada pode ser aplicada ao meio de cultura solidificado através de discos de papel, cilindros de aço inoxidável ou de vidro utilizados na perfuração do ágar.

Outro método é o de diluição em meio de cultura líquido (caldo), uma avaliação quantitativa, em que são relacionadas à proporção de crescimento do microrganismo em meio líquido e a concentração da substância em teste. Esta avaliação pode ser realizada em tubos de ensaio (macrodiluição) e em microplacas de 96 poços (microdiluição). A avaliação é comparada á um antimicrobiano de referência, como o antifúngico cetoconazol e o antibiótico tetraciclina. O crescimento

microbiano está relacionado com a intensidade da turbidez da solução, quanto mais turva maior é crescimento de colônias (Pinto e cols., 2003)

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas a espécie de fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) e duas espécies de bactérias, a gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 8739) e a gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estes micro-organismos foram reativados em caldo BHI, subcultivados em placas de petri com Ágar Muller Hinton e incubados em estufa microbiológica à 37°C no período de 18 a 24 horas. Após o crescimento, soluções microbianas foram preparadas com solução salina 0,9 % estéril. A suspensão foi ajustada de acordo com o tubo padrão 0,5 da escala de Mc Farland, isto significa que há aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/ml) na solução preparada. Todos os materiais e soluções utilizadas nos experimentos foram previamente esterilizados, a fim de se evitar contaminação e comprometer os resultados deste estudo.

3.5.1. Método de difusão radial em Agar

Os extratos da própolis das espécies *M. q. anthidioides*, *S. depilis* e *P. droryana* foram diluídos a uma concentração de 200 mg/mL. Como controles positivos foram utilizados Cetoconazol para o fungo e Tetraciclina para bactérias na concentração de 4 mg/mL.

A suspensão contendo cada espécie de micro-organismo foi utilizada para a semeadura em placas de petri contendo meio de cultura ágar Muller Hinton solidificado. A semeadura foi realizada com o auxílio de swabs, distribuindo os micro-organismos por toda a superfície do

ágar. Todo esse processo ocorreu dentro de uma câmara de fluxo laminar, a fim de evitar possíveis contaminações por outros microrganismos.

Ao término da inoculação, os poços foram confeccionados nas placas com auxílio de cilindros metálicos. Estes foram pressionados contra o ágar retirando uma pequena parte e formando um orifício. Em cada placa foi feito um poço para cada extrato, para os controles positivos (cetoconazol para placas com fungo e tetraciclina para bactérias) e para o controle negativo, o etanol 80%.

Cerca de 100µl de cada tratamento foram depositados nos poços, com o auxílio de uma micropipeta. As placas foram identificadas de acordo com o microrganismo semeado e cada poço com seu tratamento. Foram embaladas com papel filme e levadas à estufa microbiológica a 37°C durante 24 h. Após este período foram dimensionados os diâmetros dos halos de inibição, isto é, o tamanho da área em volta dos poços onde não houve crescimento do fungo e das bactérias.

3.5.2. Método de microdiluição

Esta avaliação, além de confirmar os resultados obtidos nos testes anteriores, determina a concentração inibitória mínima dos extratos que impede o crescimento dos micro-organismos.

Todos os experimentos foram realizados em microplacas de 96 poços. Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente, assim como os controles positivos e o negativo. Para cultivo dos micro-organismos foi utilizado o caldo Mueller Hinton.

Os extratos e os controles foram preparados nas mesmas concentrações do experimento anterior (extratos: 200 mg/mL e controles positivos: 4 mg/mL), sendo avaliada a concentração mínima capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

A diluição começa a partir do primeiro poço de cada coluna, o qual já contém 100µl de meio e recebeu a mesma quantidade de extratos e controles, fazendo com que a concentração destes seja reduzida pela metade. Após a homogeneização, 100µl da solução é transferida para o poço seguinte, ocorrendo uma diluição seriada dos tratamentos. Após a diluição, cada poço recebe 10µl de inóculo a ser testado.

As placas foram vedadas com tampas plásticas e levadas a estufa microbiológica a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação as leituras das absorbâncias foram realizadas no leitor de microplacas (TERMO PLATE TP-READER), a 620 nm.

A partir da determinação da concentração inibitória mínima de cada uma das amostras de própolis, foram realizados ensaios com a finalidade de determinar a atividade (fungiostático ou fungicida) exercida sobre o fungo *C. albicans* e (bacteriostático ou bactericida) sobre a bactéria *S. aureus*.

Alíquotas de 20 µl, das soluções presentes nos poços referentes às três menores concentrações dos extratos capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* e de *S. aureus*, foram adicionadas a placas

de petri com meio de cultura ágar Muller Hinton solidificado. Após 24 h de incubação em estufa microbiológica, foram avaliados os crescimentos (efeito fungistático ou bacteriostático) ou não (efeito fungicida ou bactericida) das colônias dos micro-organismos.

3.6. Cálculos e Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os resultados foram representados como as médias dos valores \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados através do teste *t* de *Student*, para amostras não pareadas, com nível de significância em $p < 0,05$.

Para determinar a porcentagem de inibição do radical livre DPPH foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{ AA} = \left(\frac{1 - \text{Abs}_1}{\text{Abs}_2} \right) \times 100$$

Abs_1 é a absorbância de cada amostra de extrato adicionada à solução de DPPH e Abs_2 é a absorbância do controle, sendo este uma mistura de 200 μ l de etanol 80% com 1800 μ l de DPPH. A partir das análises dos dados, foram calculados os valores do IC_{50} , concentração capaz de inibir 50% da atividade do radical DPPH, através de regressão não linear, após a determinação da curva de atividade antioxidante. Com

os dados obtidos foi calculado o fator relativo, o qual corresponde à razão do IC₅₀ da amostra em relação ao IC₅₀ do controle positivo. Para as amostras de própolis de cada espécie de abelha foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

A porcentagem de hemólise foi calculada a partir da equação:

$$\text{As } \% \text{ AA} = \left(\frac{\text{Abs}_1}{\text{Abs}_2} \right) \times 100 \quad \text{absorbâncias} \quad \text{dos}$$

sobrenadantes foram utilizadas para se determinar a porcentagem de hemólise das amostras. Abs₁ é a absorbância de cada amostra avaliada e Abs₂ é a absorbância referente à hemólise total. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

Quanto à determinação da atividade antimicrobiana, foi calculado o valor de efetividade das amostras de própolis em relação aos controles, através da razão entre o valor do halo de inibição ocasionado pelo extrato em relação ao halo do controle positivo, multiplicado por 100, para se obter os valores em porcentagem. Para isto, foi utilizada a seguinte equação: Fator de efetividade = (amostra/controlado) X100.

4. RESULTADOS

4.1. Coloração dos Extratos

Após todo processo de preparação dos extratos de própolis, estes apresentaram diferentes colorações sendo que o extrato de *M. q. anthidioides* apresentou uma cor marrom, o de *S. depilis* amarelo e o de *P. droryana* caramelo (Figura 3).

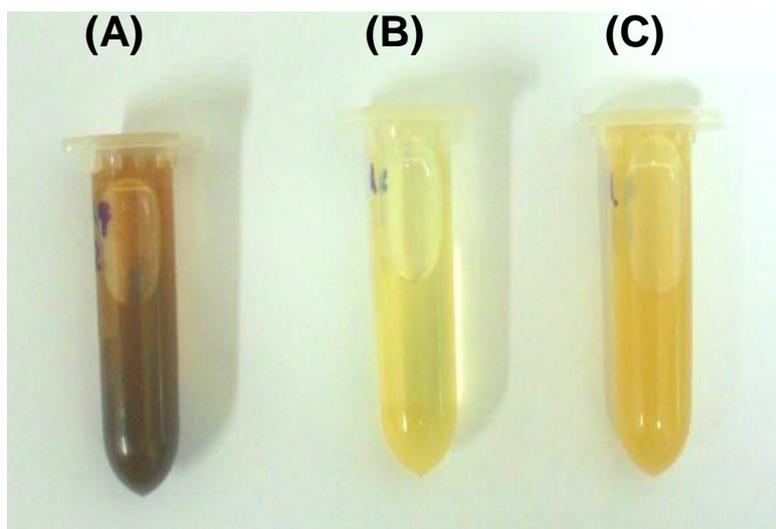


Figura 3. Extratos etanólicos da própolis: **(A)** *Melipona quadrifasciata anthidioides*; **(B)** *Scaptotrigona depilis* e **(C)** *Plebeia droryana*.

4.2. Atividade Antioxidante

4.2.1. Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH

De acordo com a figura 4A e tabela 2, a própolis de *M. q. anthidioides* demonstrou capacidade de inibir 50% dos radicais livres na concentração de $77,3 \pm 2,7 \mu\text{g/ml}$, cerca de 2 vezes menos eficiente que o controle BHT, o qual apresentou IC_{50} de $35,7 \pm 8,6 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 2). Dentre as concentrações testadas, o controle atinge sua atividade máxima de $91,1 \pm 1,6\%$ aos $200 \mu\text{g/ml}$, enquanto que a própolis na concentração de $300 \mu\text{g/ml}$ apresenta ação máxima de $97,5 \pm 0,1\%$ (Figura 4B e Tabela 2).

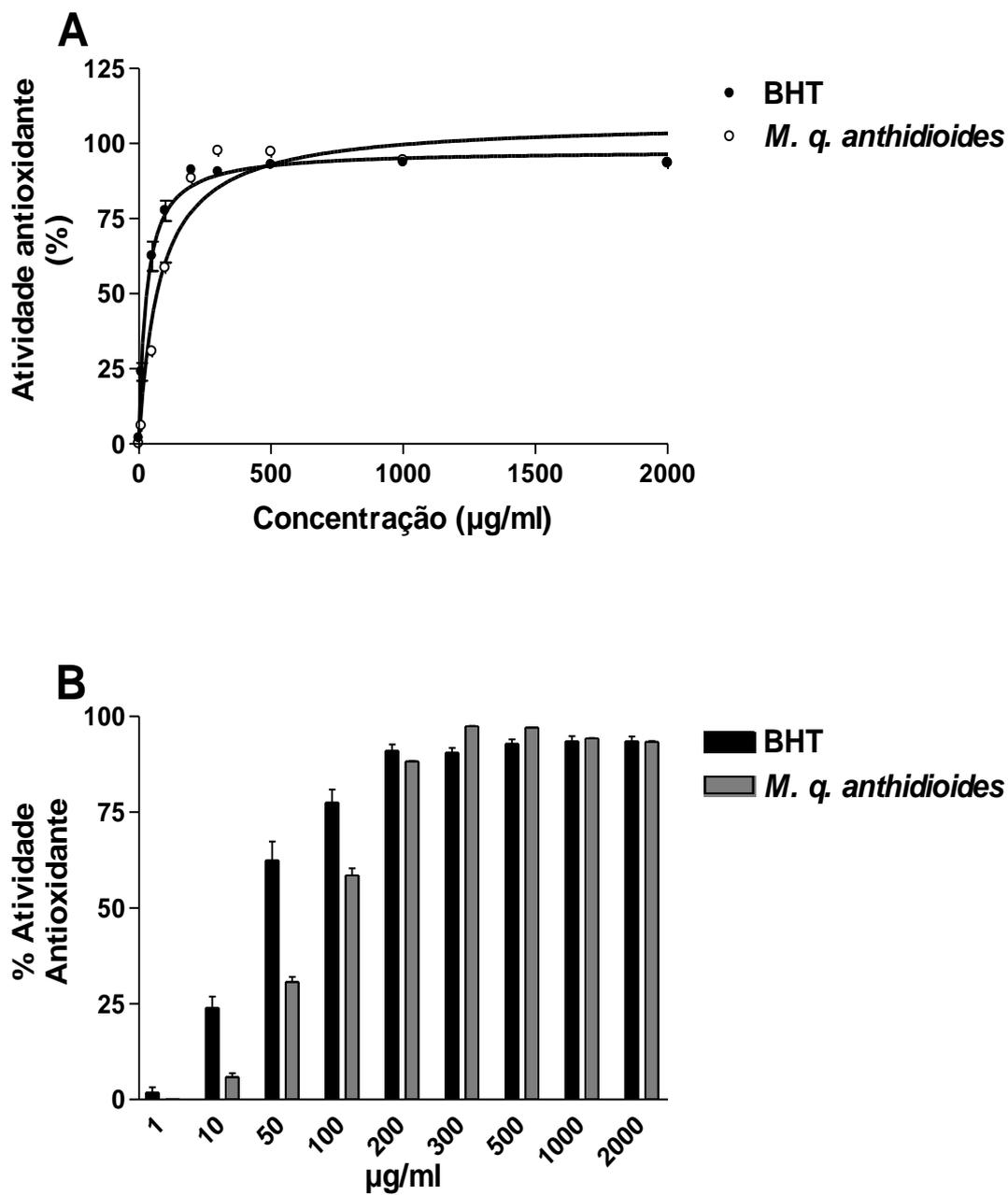


Figura 4. Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH. (A) Concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres (IC_{50}). **(B)** Atividade Antioxidante de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, em comparação ao controle Hidroxibutiltolueno (BHT).

A própolis de *P. droryana* apresenta IC₅₀ de 133,7 ± 19,9 µg/ml, ação 3,7 vezes inferior ao BHT (Figura 5A e Tabela 2). Atinge sua atividade máxima de 86,5 ± 5,3% na concentração de 500 µg/ml (Figura 5B e Tabela 2).

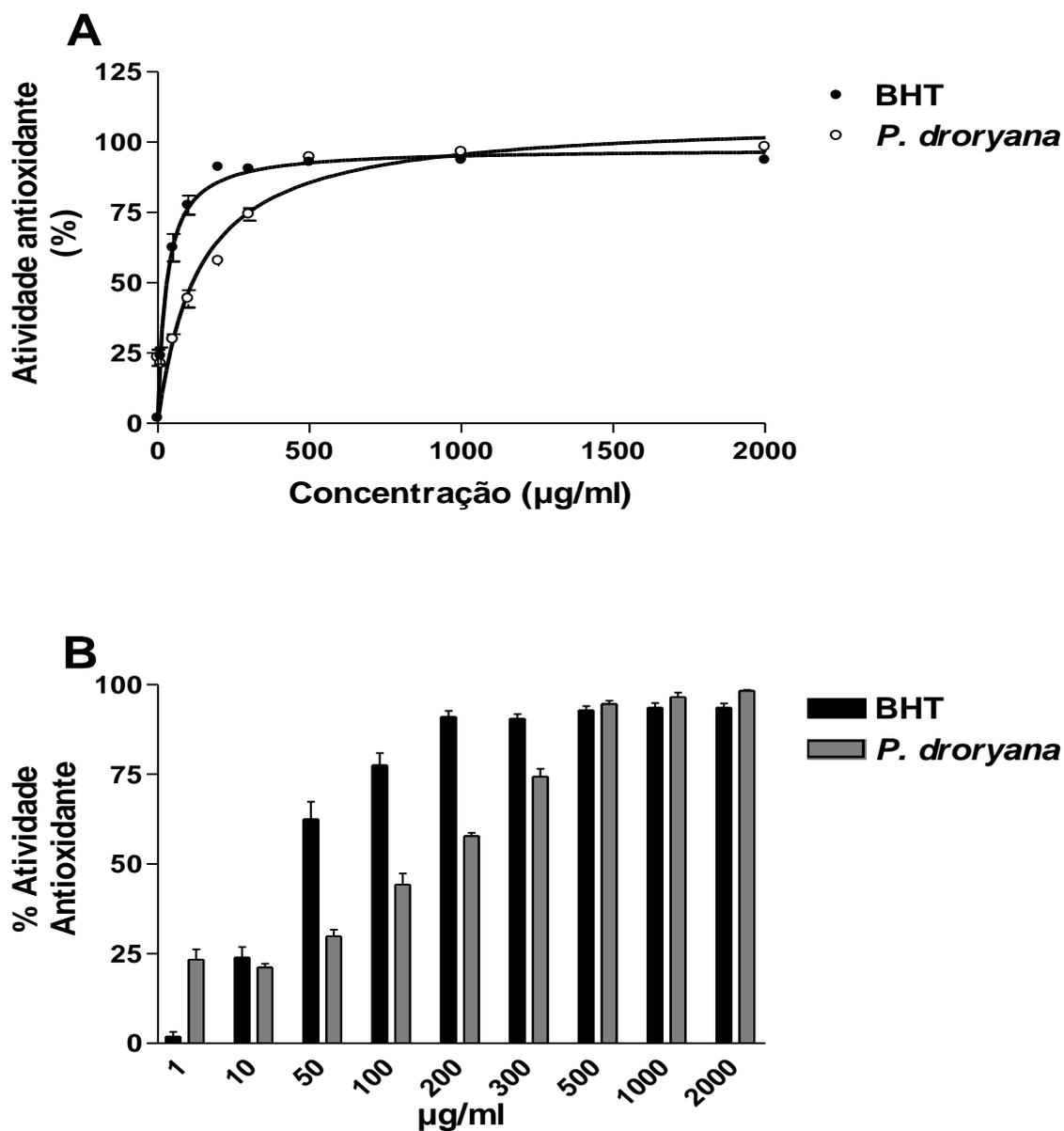


Figura 5. Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH. (A) Concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres (IC₅₀). **(B)** Atividade Antioxidante de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Plebeia droryana*, em comparação ao controle Hidroxibutiltolueno (BHT).

A ação da própolis de *S. depilis* se apresenta 49 vezes inferior ao controle BHT, apresentando IC₅₀ de 1749 ± 65 µg/ml (Figura 6A e Tabela 2) e sua atividade máxima, dentre as concentrações testadas, foi de 51,1 ± 1,4% observada na concentração de 2000 µg/ml (Figura 6B e Tabela 2).

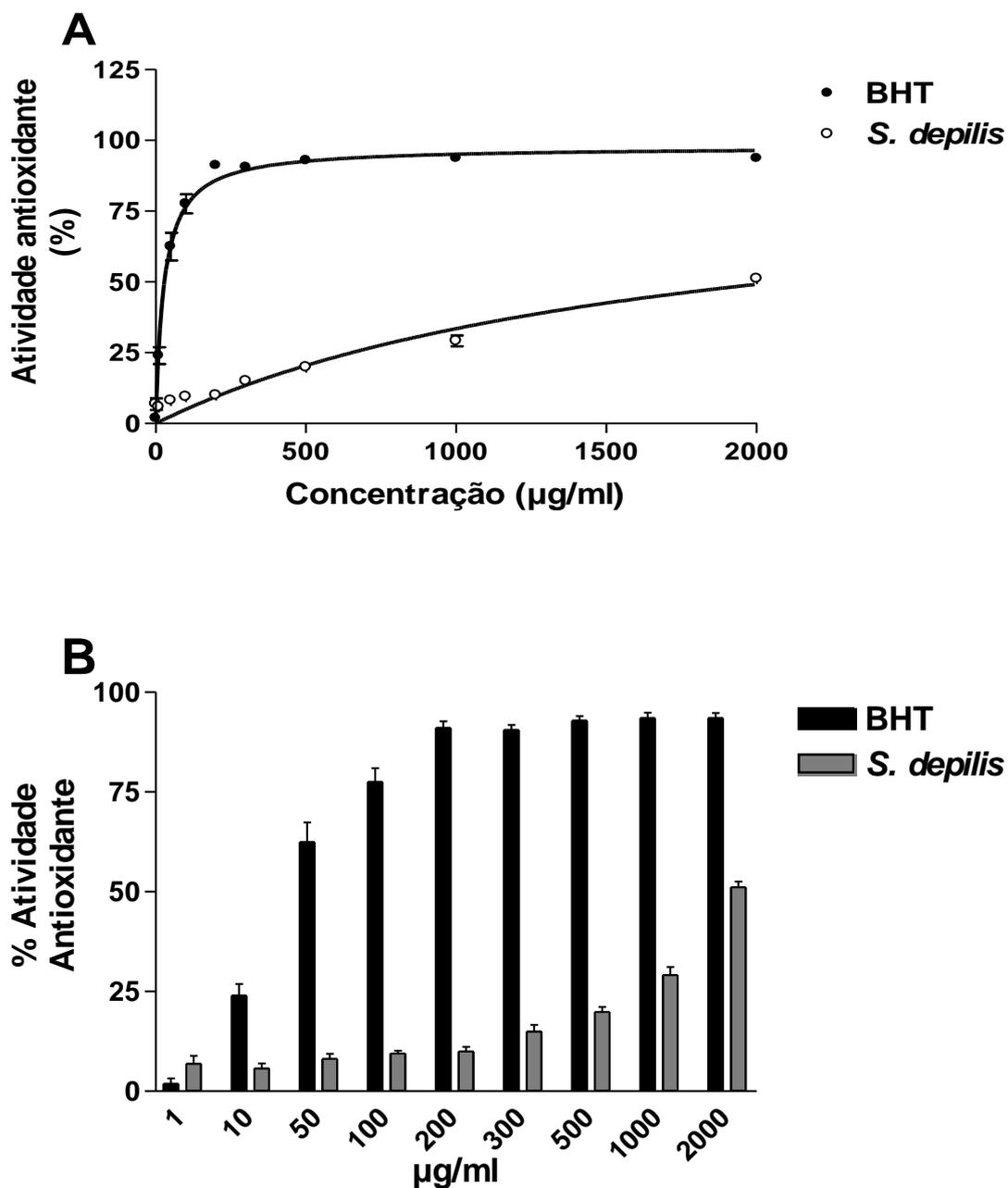


Figura 6. Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH. (A) Concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres (IC₅₀). **(B)** Atividade Antioxidante diferentes concentrações do extrato etanólico de *Scaptotrigona depilis*, em comparação ao controle Hidroxibutiltolueno (BHT).

Tabela 2. IC₅₀ dos extratos da própolis das espécies *Melipona quadrifascita anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis*, comparados ao antioxidante padrão BHT, juntamente com o percentual de atividade máxima de captação do radical livre DPPH, na sua respectiva concentração.

Tratamentos	IC ₅₀ (µg / ml)	F. relativo	(n)	Atividade máxima	
				%	µg / ml
BHT	35,7 ± 8,6	-----	(8)	91,1 ± 1,6	200
<i>M. q. anthidioides</i>	77,3 ± 2,7	2,2	(2)	97,5 ± 0,1	300
<i>P. droryana</i>	133,7 ± 19,9	3,7	(2)	86,5 ± 5,3	500
<i>S. depilis</i>	1749 ± 65	49	(2)	51,1 ± 1,4	2000

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

4.2.2. Atividade anti-hemolítica da própolis frente ao indutor de hemólise AAPH.

A própolis da espécie *M. q. anthidioides* foi escolhida por apresentar melhor atividade antioxidante nas avaliações de captação do radical livre DPPH. A capacidade funcional da atividade antioxidante desta própolis foi avaliada através do ensaio da indução de hemólise por AAPH.

Os eritrócitos incubados somente com solução salina 0,9 % e com etanol, não apresentaram hemólise no decorrer das quatro horas de avaliação (Figura 7 A). Os tubos contendo água destilada, a qual ocasionou hemólise total das células, foram utilizados como parâmetro para calcular as porcentagens de hemólise dos demais tratamentos e não demonstraram diferenças entre os pontos de avaliação do ensaio (Figuras 9A, 10A, 11A e 12A). A morfologia das membranas dos eritrócitos se manteve sem alterações durante todo o período de

incubação com solução salina 0,9 % (Figuras 9B, 10B, 11B e 12B) e etanol (Figuras 9C, 10C, 11C e 12C).

As figuras 7A a D demonstram que o ácido ascórbico e a própolis de *M. q. anthidioides* não causaram hemólise aos 60, 120, 180 e 240 minutos em nenhuma das concentrações avaliadas, em relação aos tratamentos dos eritrócitos incubados com solução salina 0,9 % ou etanol. Em consonância com estes resultados, as figuras 9 E a F – 12 E a F demonstram que a morfologia externa dos eritrócitos não foi alterada.

Aos 60 minutos de incubação com o indutor de hemólise, o ácido ascórbico e a própolis exerceram efeito protetor em todas as concentrações avaliadas (Figura 8A). Este efeito também pode ser observado diretamente nos eritrócitos, incubados com 125 µg/ml do ácido ascórbico (Figuras 9G) e da própolis (Figura 9H), que mantiveram a integridade das membranas após a incubação com o agente hemolítico.

Aos 120 e 180 minutos de incubação o ácido ascórbico protegeu os eritrócitos contra hemólise nas concentrações de 75, 100 e 125 µg/ml, e a própolis em 100 e 125 µg/ml (Figura 8 B e C), em ambos os tratamentos os perfis de proteção foram concentração depende. Esta proteção foi confirmada pela manutenção da integridade da membrana dos eritrócitos na presença do ácido ascórbico (Figuras 10G, 11G) e da própolis (Figuras 10H e 11H), ambos na concentração de 125 µg/ml.

Após 240 minutos de incubação com AAPH, o ácido ascórbico e a própolis não foram capazes de proteger os eritrócitos contra hemólise em nenhuma concentração avaliada (Figura 8D). O que pode ser confirmado nas alterações morfológicas demonstradas nas Figuras 12G e H.

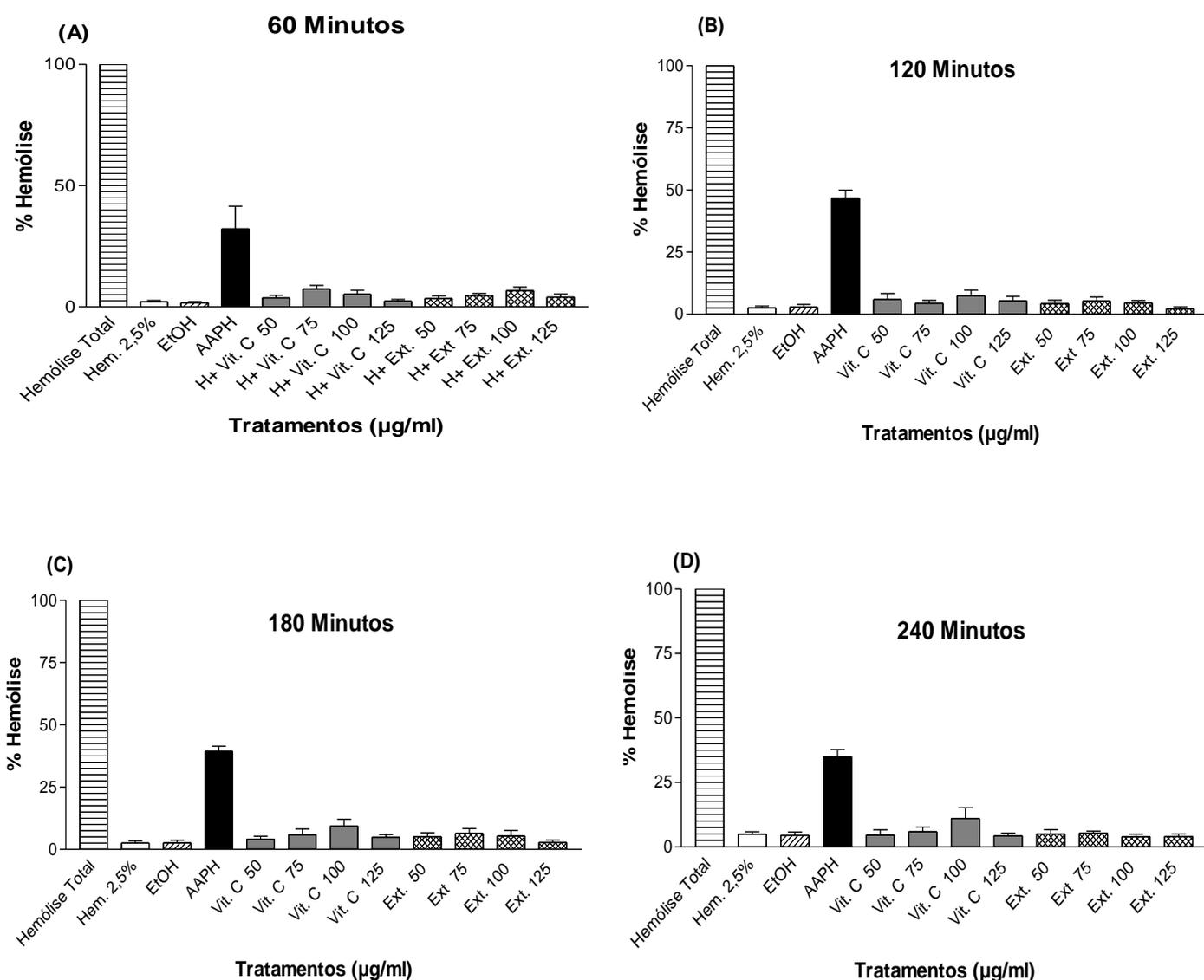


Figura 7. Efeito das diferentes concentrações da própolis de *M. q. anthidioides* em suspensão de eritrócitos humanos aos (A) 60 (B) 120 (C) 180 e (D) 240 minutos. Os resultados estão expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média), n = 3. $P < 0,05$ de Hem. 2,5% ou etanol.

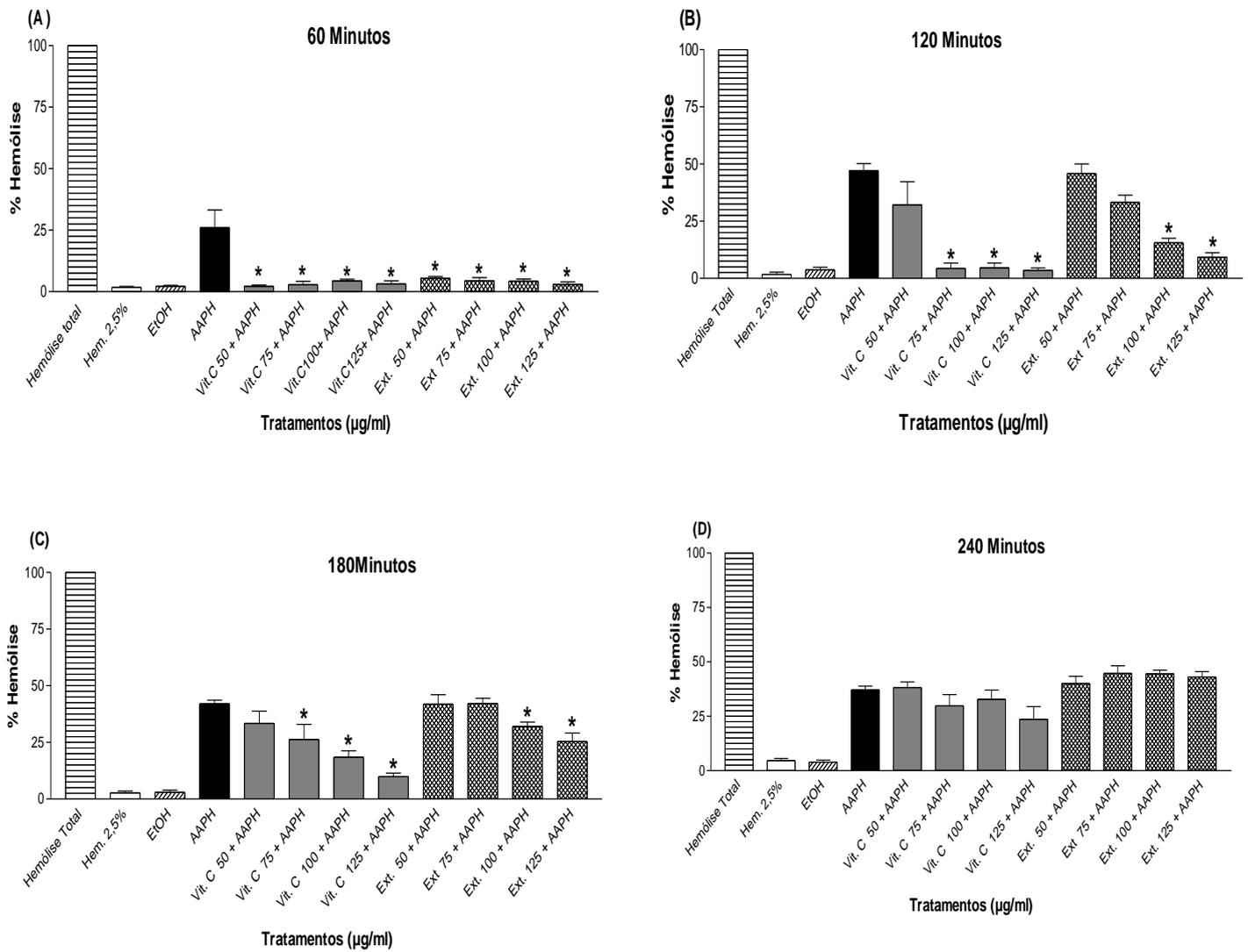


Figura 8. Efeito protetor da própolis de *M. q. anthidioides* contra hemólise induzida por AAPH em suspensão de eritrócitos humanos aos (A) 60 (B) 120 (C) 180 e (D) 240 minutos. Os resultados estão expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média), $n = 3$. $P < 0,05$ de Hem. 2,5% ou etanol.

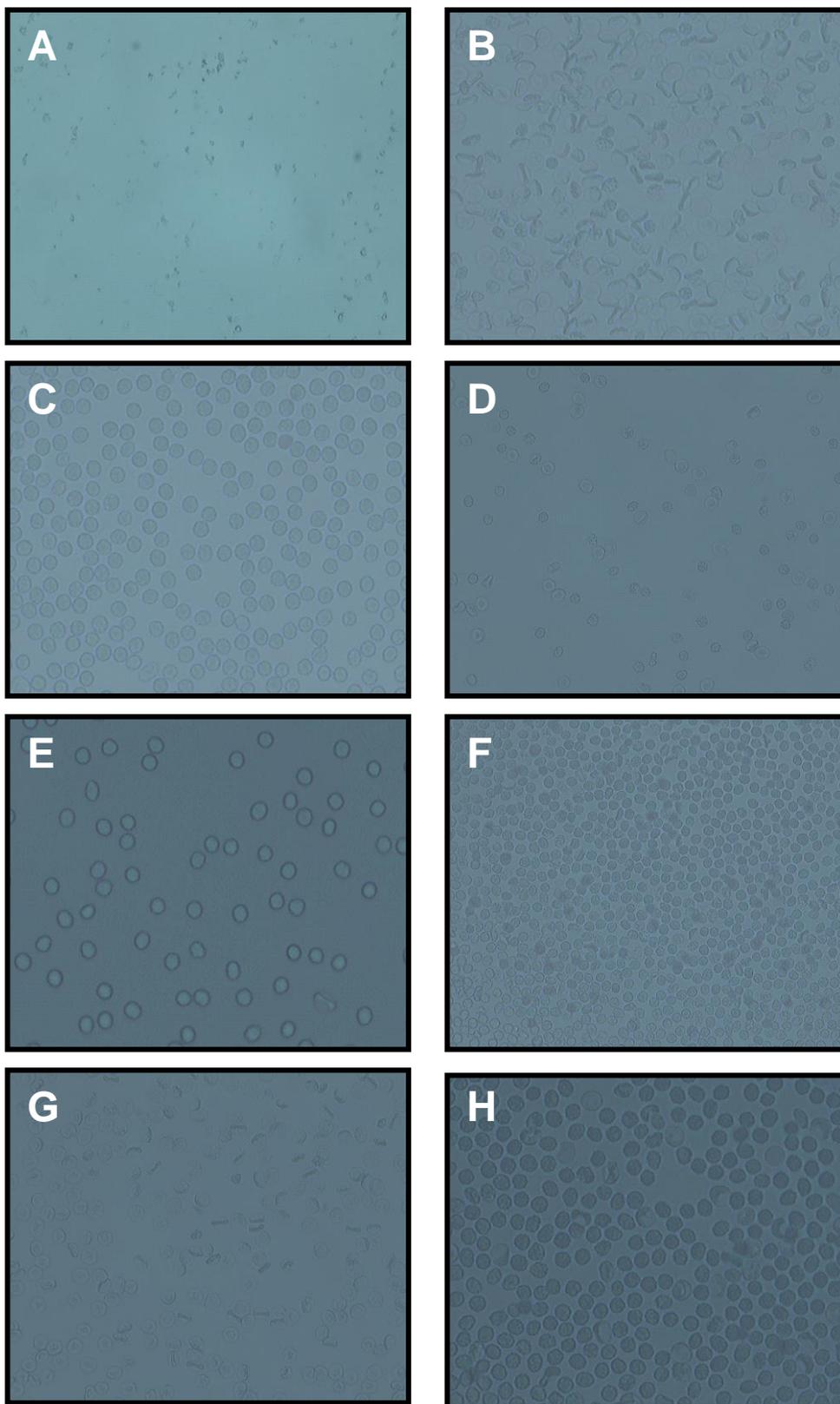


Figura 9. Representação dos eritrócitos aos 60 minutos de incubação à 37 °C. (A) Solução de hemácias com água destilada; (B) Solução salina de hemácias 2,5%; (C) Solução de hemácias com Etanol; (D) Solução de hemácias com AAPH; (E) Solução de hemácias com ácido ascórbico a 125µg/ml; (F) Solução de hemácias com extrato a 125µg/ml; (G) Solução de hemácias com ácido ascórbico na concentração de 125µg/ml com adição de AAPH; (H) Solução de hemácias com extrato na concentração 125µg/ml com adição de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

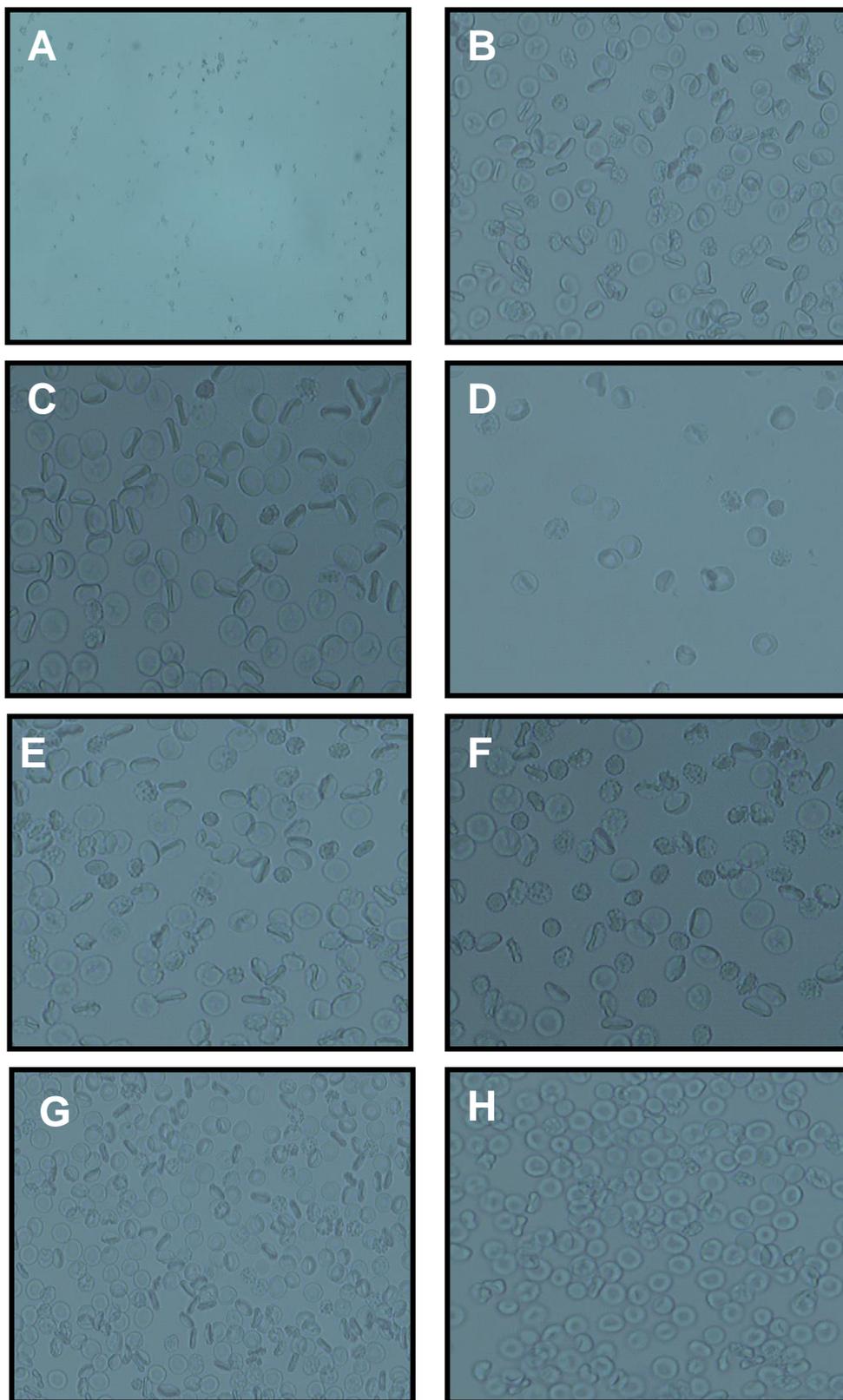


Figura 10. Representação dos eritrócitos aos 120 minutos de incubação à 37 °C. (A) Solução de hemácias com água destilada; (B) Solução salina de hemácias 2,5%; (C) Solução de hemácias com Etanol; (D) Solução de hemácias com AAPH; (E) Solução de hemácias com ácido ascórbico a 125µg/ml; (F) Solução de hemácias com extrato a 125µg/ml; (G) Solução de hemácias com ácido ascórbico na concentração de 125µg/ml com adição de AAPH; (H) Solução de hemácias com extrato na concentração 125µg/ml com adição de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

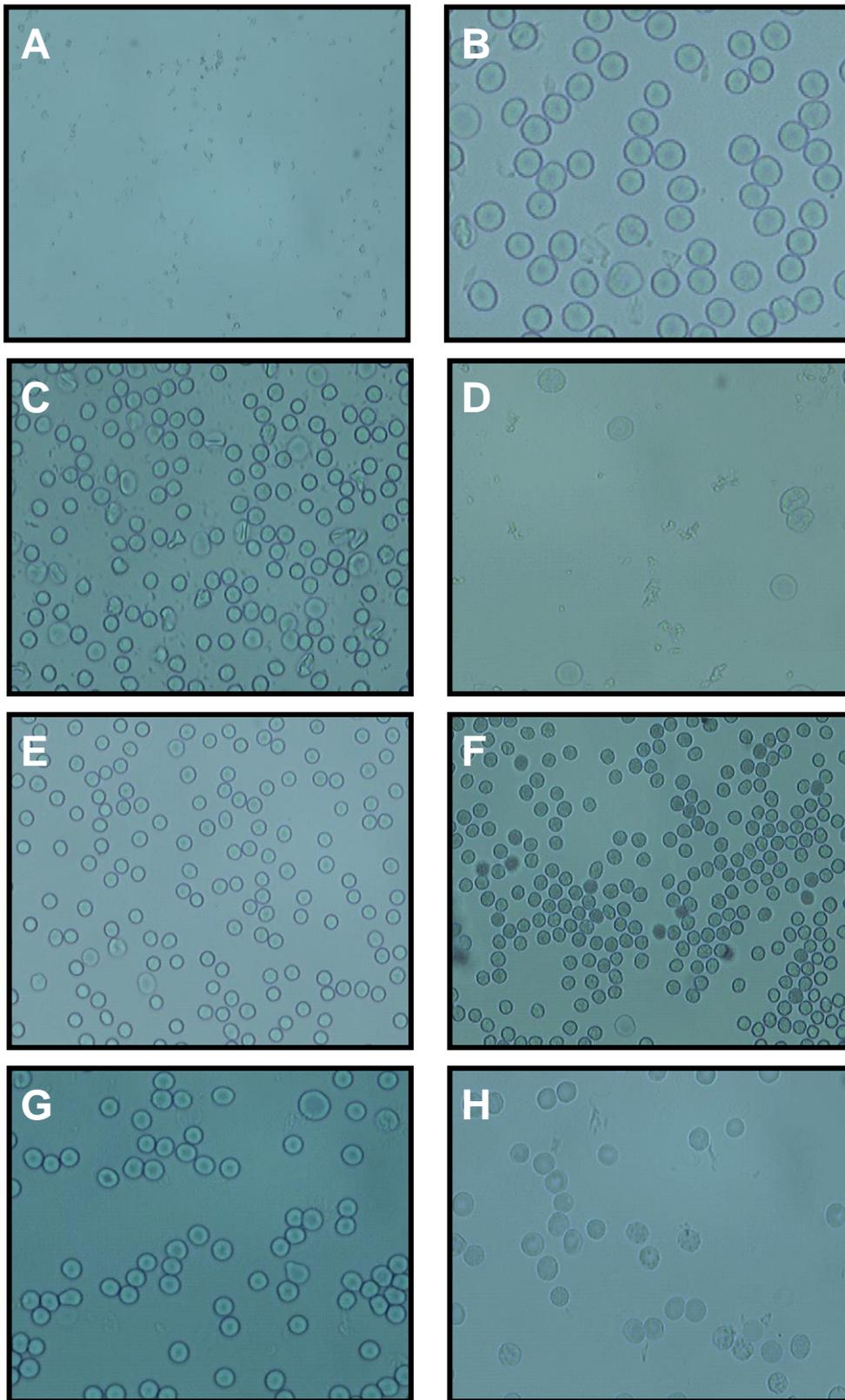


Figura 11. Representação dos eritrócitos aos 180 minutos de incubação à 37 °C. (A) Solução de hemácias com água destilada; (B) Solução salina de hemácias 2,5%; (C) Solução de hemácias com Etanol; (D) Solução de hemácias com AAPH; (E) Solução de hemácias com ácido ascórbico a 125µg/ml; (F) Solução de hemácias com extrato a 125µg/ml; (G) Solução de hemácias com ácido ascórbico na concentração de 125µg/ml com adição de AAPH; (H) Solução de hemácias com extrato na concentração 125µg/ml com adição de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

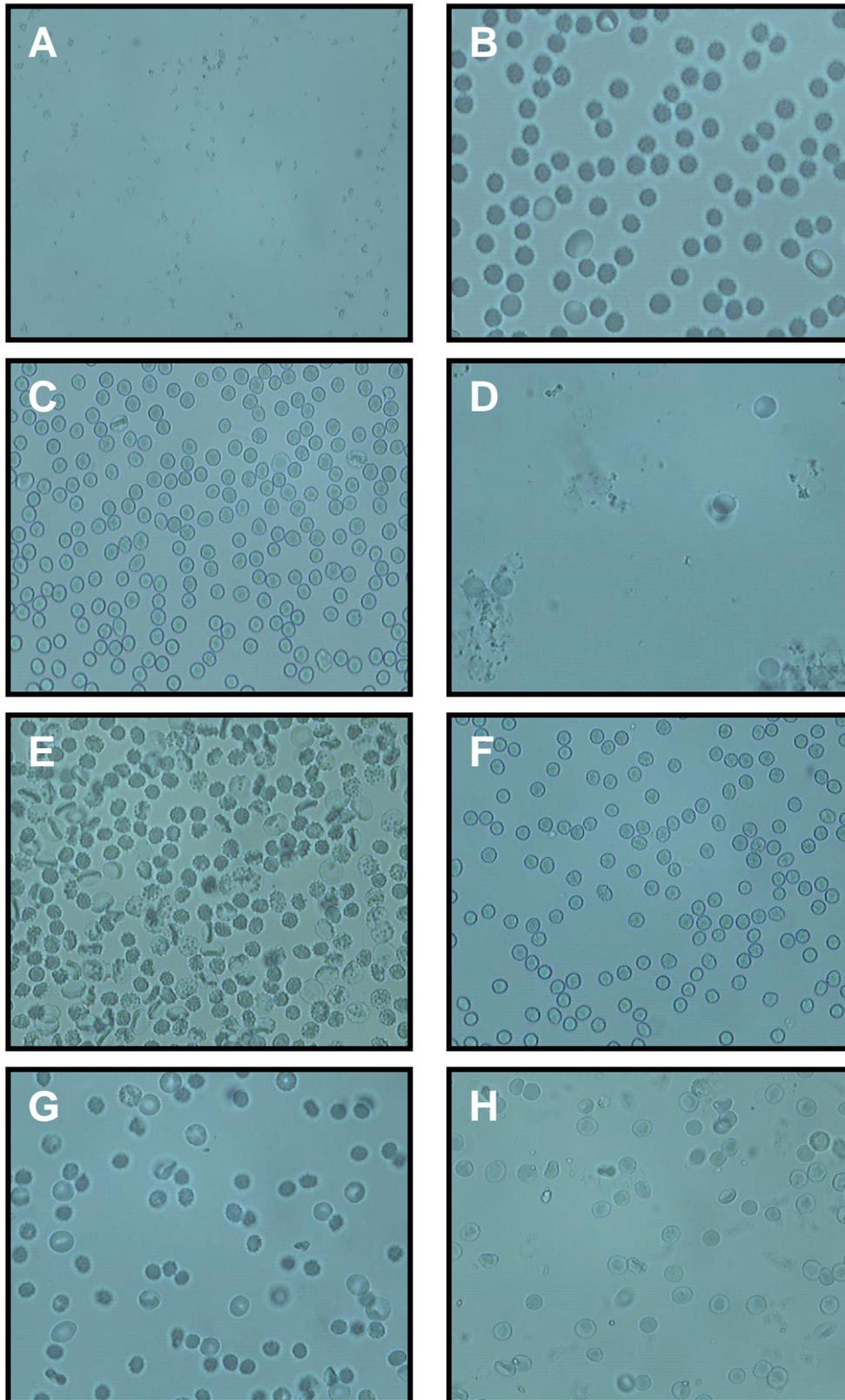


Figura 12. Representação dos eritrócitos aos 240 minutos de incubação à 37 °C. (A) Solução de hemácias com água destilada; (B) Solução salina de hemácias 2,5%; (C) Solução de hemácias com Etanol; (D) Solução de hemácias com AAPH; (E) Solução de hemácias com ácido ascórbico a 125µg/ml; (F) Solução de hemácias com extrato a 125µg/ml; (G) Solução de hemácias com ácido ascórbico na concentração de 125µg/ml com adição de AAPH; (H) Solução de hemácias com extrato na concentração 125µg/ml com adição de AAPH. Os resultados estão expressos em média \pm EPM, n = 4.

4.3. Atividade antimicrobiana

4.3.1. Atividade antifúngica e antibacteriana da própolis

No teste qualitativo, a própolis de *M. q. anthidioides* apresentou $21,6 \pm 1,6$ mm de diâmetro de halo de inibição do crescimento do micro-organismo, cerca de 12% mais efetivo que o Cetoconazol, nas concentrações avaliadas, o qual apresentou halo de inibição de $19,3 \pm 0,6$ mm (Tabela 3).

Tabela 3. Halo de inibição do controle Cetoconazol (4mg/ml) e da própolis (200µg/ml) das espécies de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* frente ao fungo *Candida albicans*.

<i>C. albicans</i>		
Tratamentos	DHI (mm)	F _{efetividade} (%)
Cetoconazol	$19,3 \pm 0,6$	100
Etanol 80%	0	0
<i>M. q. anthidioides</i>	$21,6 \pm 1,6$	112
<i>P. droryana</i>	14 ± 1	72
<i>S. depilis</i>	$23,5 \pm 0,1$	122

Fator de efetividade (%) é a razão entre os valores de inibição de cada amostra analisada em relação ao Cetoconazol, multiplicado por 100, para a obtenção dos valores em porcentagem. *DHI: Diâmetro dos halos de inibição.

De acordo com a Tabela 3, a própolis de *P. droryana* possui ação antifúngica correspondente a 72% da ação do controle positivo, apresentando halo de inibição de 14 ± 1 mm. Já a própolis da espécie *S.*

depilis mostra uma atividade 22% superior ao Cetoconazol, nas concentrações avaliadas, com halo de $23,5 \pm 0,1$ mm.

Todos os extratos inibiram somente o crescimento da espécie de bactéria gram-positiva *S. aureus*, não exercendo qualquer ação sobre a bactéria gram-negativa *E. coli* (tabela 4)

Tabela 4. Halo de inibição do controle Tetraciclina (4mg/ml) e da própolis das espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* (200µg/ml) frente às bactérias Gram-Positiva *S. aureus* e Gram-Negativa *E. coli*.

Tratamentos	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	DHI (mm)	F _{efetividade} (%)	DHI (mm)	F _{efetividade} (%)
Tetraciclina	35 ± 2,8	100	34 ± 0,3	100
Etanol 80%	0	0	0	0
<i>M. q. anthidioides</i>	28,3 ± 1,6	81	0	0
<i>P. droryana</i>	20 ± 2,8	57	0	0
<i>S. depilis</i>	17,3 ± 2,6	49	0	0

Fator de efetividade (%) é a razão entre os valores de inibição de cada amostra analisada em relação a Tetraciclina, multiplicado por 100, para a obtenção dos valores em porcentagem.
*DHI: Diâmetro dos halos de inibição.

O halo de inibição do crescimento bacteriano foi de $28,3 \pm 1,6$ mm, para a própolis de *M. q. anthidioides*, apresentando uma atividade correspondente a 81 % da ação do controle positivo tetraciclina (4 mg/ml), o qual apresentou halo de $35 \pm 2,8$ mm (Tabela 4).

Em comparação com o mesmo controle, a própolis de *P. droryana* possui uma atividade antibacteriana que corresponde a 57 % da sua ação, com halo de inibição de $20 \pm 2,8$ mm. A própolis de *S. depilis* desenvolveu um halo de inibição do crescimento de *S. aureus* de $17,3 \pm 2,6$ mm, apresentando uma atividade correspondente a 49% da ação da tetraciclina (Tabela 4).

4.3.2. Concentração inibitória mínima da própolis

A partir do ensaio de difusão em ágar, foram realizados testes quantitativos para se conhecer a concentração mínima dos extratos capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos.

A concentração inibitória mínima da própolis de *M. q. anthidioides* foi de 6,25 mg/ml para *C. albicans* e *S. aureus* (Tabelas 5 e 8).

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da própolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, frente à *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentração do EEP (mg/ml)	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,25	-	-
3,125	+	+
1,56	+	+
0,78	+	+

(-): inibição do crescimento do micro-organismo/(+): crescimento do micro-organismo

De acordo com as tabelas 6 e 8, a própolis de *P. droryana* foi capaz de inibir o crescimento do fungo *C. albicans* na concentração mínima de 25 mg/ml e com 3,125mg/ml inibiu o crescimento da bactéria gram-positiva *S. aureus*.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da própolis de *Plebeia droryana*, frente à *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentração do EEP (mg/ml)	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	+	-
6,25	+	-
3,125	+	-
1,56	+	+
0,78	+	+

(-): inibição do crescimento do micro-organismo/(+): crescimento do micro-organismo

Com uma concentração mínima de 25 mg/ml a própolis de *S. depilis* foi capaz de inibir o crescimento de ambos os micro-organismos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da própolis de *Scaptotrigona depilis*, frente à *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentração do EEP (mg/ml)	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
100	-	-
50	-	-
25	-	-
12,5	+	+
6,25	+	+
3,125	+	+
1,56	+	+
0,78	+	+

(-): inibição do crescimento do micro-organismo/(+): crescimento do micro-organismo

Com as concentrações inibitórias mínimas já estabelecidas, foi realizado um ensaio a fim de se conhecer o efeito das amostras de própolis exercido sobre *C. albicans* e *S. aureus*.

De acordo com a tabela 8, todas as amostras de própolis apresentaram efeito fungicida contra *C. albicans*, nas concentrações de 6,25 a 25 mg/ml para a própolis de *M. q. anthidioides* e de 25 a 100 mg/ml para a própolis das espécies *P. droryana* e *S. depilis*.

Em relação à gram-positiva *S. aureus*, somente a própolis de *M. q. anthidioides* demonstrou a capacidade de levar à bactéria a morte (ação bactericida), na faixa de 6,25 a 25 mg/ml (Tabela 8). A própolis de *P. droryana* e a de *S. depilis* inibiram o crescimento bacteriano (ação bacteriostática) entre

as concentrações de 3,125 – 12,5 mg/ml e 25 - 100 mg/ml, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetro de suscetibilidade de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* frente aos extratos da própolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis*.

Parâmetro de suscetibilidade				
Espécies de abelhas	mg/ml	<i>C. albicans</i>	mg/ml	<i>S. aureus</i>
<i>M. q. anthidioides</i>	6,25 - 25	Fungicida	6,25 - 25	Bactericida
<i>P. droryana</i>	25 - 100	Fungicida	3,125 – 12,5	Bacteriostático
<i>S. depilis</i>	25 - 100	Fungicida	25 - 100	Bacteriostático

5. DISCUSSÃO

É crescente o interesse científico por produtos naturais, os quais podem ser utilizados como fonte de novos compostos capazes de combater várias patologias e para fins biotecnológicos. Dentre eles a própolis é um dos produtos utilizados pela humanidade há séculos (Pereira e cols., 2002). Esta resina tem apresentado propriedades terapêuticas, tais como: anti-inflamatória, antitumoral, anestésico local, antiúlcera gástrica, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica, neuroprotetora, imunomodulatória, entre outras (Park e cols., 1998; Suzuki e cols., 2002; Castaldo e Capasso 2002; Fernandes e cols., 2007; Velazquez e cols., 2007; Manna e cols., 2011; Watanabe e cols., 2011; Bachiega e cols., 2012).

De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que as amostras de própolis das espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* demonstram a capacidade de sequestrar radicais livres DPPH, sendo esta uma ação concentração-dependente. Resultados semelhantes foram relatados por Campos e cols. (2012) para própolis das espécies *Melipona orbignyi*, *Plebeia catamarcensis* e *Tetragonisca angustula*, Lu e cols. (2003) e Izuta e cols. (2009) para amostras de própolis de *Apis mellifera*.

Estes resultados sugerem a presença de compostos capazes de doar átomos de hidrogênio para os radicais livres. Atividade que pode ser atribuída aos polifenóis, os quais possuem uma alta reatividade como doadores de elétrons ou de hidrogênio, a partir de um grupo hidroxila aromático e a

capacidade desta estrutura de suportar um elétron não pareado (Duthie e cols., 2003).

A própolis de *M. q. anthidioides* demonstrou a melhor atividade antioxidante comparada a própolis de *P. droryana* e *S. depilis* o que pode ser confirmado funcionalmente através de sua ação anti-hemolítica concentração e tempo-dependentes. Resultados semelhantes foram obtidos por Campos e cols. (2012) que analisaram a ação protetora da própolis da espécie de abelha nativa *Melipona orbigny*, Valente e cols. (2011), avaliando a atividade protetora da própolis de *A. mellifera* e por Costa e cols. (2009), o qual avaliou a atividade anti-hemolítica de folhas de *Cydonia oblonga* (Marmelo).

Neste tipo de célula o estresse oxidativo leva à alteração da morfologia da membrana celular através da peroxidação lipídica gerada por radicais livres, os quais também podem provocar poros hemolíticos levando ao extravasamento de potássio ocasionando a hemólise (Bureau, 2005). De acordo com Moreno e cols. (2000), a atividade antioxidante pode ser correlacionada com o teor de flavonoides presentes na composição química da própolis. Estes são conhecidos por serem antioxidantes do tipo “chain-breaking”, os quais atuam na limpeza de radicais peroxil e alcoxil prevenindo a abstração contínua de átomos de hidrogênio durante a peroxidação lipídica (Pereira, 1998).

Estes compostos fenólicos compõem um grupo diverso de metabólitos secundários de plantas, no qual também podem ser incluídos taninos, ésteres hidroxicinamato, entre outros. Esses compostos estão envolvidos em algumas atividades biológicas, como resposta ao estresse contra herbívoros e

patógenos, atuam na proteção a raios ultravioleta e eliminam várias espécies oxidativas (Grace e cols., 2000).

Em relação às atividades antimicrobianas, todas as amostras de própolis foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Candida albicans* e da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, mas não exerceram efeito sobre a gram-negativa *Escherichia coli*. Outros estudos com amostras de própolis das espécies *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula*, *Apis mellifera*, *Melipona orbignyi*, *Plebeia catamarcensis* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Campos e cols., 2012; Rahman e cols., 2010; Miorin e cols., 2003; Kujumgiev e cols., 1999) demonstraram atividades antifúngica e antibacteriana semelhantes as do presente trabalho.

Segundo Marcucci (1996) a atividade antibacteriana da própolis não deve ser somente atribuída a um componente químico, mas a um sinergismo entre compostos. Os flavonoides são os principais responsáveis pelas propriedades biológicas da própolis (Marcucci, 1995), estes compostos podem diminuir a viabilidade das unidades formadoras de colônias através da formação de agregados celulares ou podem apresentar um efeito bactericida, atuando na inibição da síntese de ácidos nucléicos, inibindo a função da membrana citoplasmática e o metabolismo dos micro-organismos (Cushnie e Lamb, 2005).

A composição química da própolis difere de acordo com a região geográfica (Kujumgiev e cols., 1999) e com as diferentes espécies de plantas utilizadas como fonte de coleta. A composição química destas fontes influencia

diretamente nos componentes químicos (Bankova e cols., 2005) e nas atividades biológicas apresentadas pela própolis (Alencar e cols., 2007).

Possivelmente, as diferenças entre as atividades antioxidantes e antimicrobianas apresentadas pelas espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeia droryana* e *Scaptotrigona depilis* estão relacionadas às preferências intrínsecas destas abelhas por diferentes espécies de plantas. Comportamento este que ocorre principalmente em regiões tropicais, onde existem várias espécies de abelhas que buscam por fontes vegetais particulares (Imperatriz-Fonseca e cols., 2004; Michener, 2007).

Perspectivas: serão realizadas investigações químicas complementares e novos ensaios prospectivos das própolis investigadas relacionados à citotoxicidade e atividade antitumoral das mesmas. Em conjunto, esta caracterização ratificará a importância das abelhas nativas no contexto abordado e a necessidade de sua conservação.

6. Conclusões

- A própolis das espécies *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis* apresentaram atividade antioxidante.

- A própolis de *M. q. anthidioides* conferiu proteção contra hemólise a eritrócitos humanos gerada pelo indutor AAPH.

- A própolis de *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis* foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. albicans* por ação fungicida.

- Não foi observado nenhum efeito da própolis de *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis* sobre a bactéria gram-negativa *E. coli* nas concentrações avaliadas.

- Contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*, a própolis de *M. q. anthidioides*, *P. droryana* e *S. depilis* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, entretanto, apenas a própolis da espécie *M. q. anthidioides* apresentou ação bactericida.

7. Referências Bibliográficas

Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R. K., Tran, V. H. e Duke, C. C. (2012) Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*.

Albuquerque, I. L., Alves, A. L., Lemos, T. L. G., Monte, F. J. Q. e Braz-Filho R. (2007) Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais. *Química Nova*. 4, 828.

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

Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Cakiroglu, T. N., Akalin, I., Deger, O. e Bedir, A. (2011) Preventive and Protective Effects of Turkish Propolis on H₂O₂-induced DNA Damage in Foreskin Fibroblast Cell Lines *Acta Biologica Hungarica* 62(4), pp. 388–396.

Alves R. O., Carvalho C. A. L., Souza B. A., Sodr  G. S. e Marchini L. C. (2005) Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Ci nc. Tecnol. Aliment.* vol.25 no.4 Campinas Oct./Dec.

Bachiega, T. F., Orsatti, C. L., Pagliarone A. C. e Sforcin, J. M. (2012) The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. *Phytotherapy Research*.

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

Bankova, V. S. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2 (1): 29-32.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G. e Kadota, S. J. (2000) Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Ethnopharmacol.* 72, 239.

Bondet, V., Brand-Williams, W. e Berset, C. (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 609–615. Academic Press Limited.

Bureau, A., Lahet, J. J., Lenfant, F., Bouyer, F., Petitjean, M., Chaillot, B. e Freysz, M. (2005) Dossier: Antioxidants in the prevention of human diseases Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59: 341–344.

Camargo, J. M. F. e Pedro, S. R. M. (2008) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region – versão* <http://www.moure.cria.org/catalogue>. Acesso em 03/01/2012.

Campos, L. A. O. (1983) Criação de abelhas: alternativa para aumento da produção agrícola. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 9, nº 106, p. 76-80.

Castaldo, S. e Capasso. F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73: S1-6.

Carvalho, C. A. L., Alves, R. M. e O., Souza, B. A. (2003) Criação das abelhas sem ferrão: aspectos práticos. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA. (Série Meliponicultura) 1: 42p.

Castro, M. L., Cury J. A., Rosalen, P. L., Alencar, S. M., Ikegaki, M., Duarte, S. e Koo, H. (2007) Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, Vol. 30, No. 7, 1512-1516.

Collevati, R. G., Shoereder, J. H. e Campos, L. A. O. (2000) Foraging Behaviour of bee pollinators on the tropical weed *Triumfetta semitriloba*: flight distance and directionality. *Rev. Brasil. Biol.*, 60(1): 29-37.

Cortopassi-Laurino, M. (2002) Abelhas em agronegócios. VI Seminário Nordestino de Pecuária - Apicultura, Fortaleza, CE, p. 5-11.

Costa, R. M., Magalhães, A. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Carvalho, M. e Silva, B. M. (2009) Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology* 47: 860–865.

Crane, E. (1985) O livro do mel. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 226 p.

Cushnie, T. P. T. e Lamb, A. J. (2005) Review: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343–356.

Dafre, S., Miranda, A. M., Miranda, T. M. M., Bulet, P., Silva, P. I. J., Machado, A., Fogaça, A. C., Lorenzini, D. M., Pereira L. S., Fázio, M. A., Esteves, E. e Burgierman, M. R. (2001) Peptídeos Antibióticos. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* - nº 23.

Dota, K. F. D., Consolaro, M. E. L., Svidzinski, T. I. E. e Brush, M. L. (2011) Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , Article ID 201953, 8 pages.

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

Endler, A. L., Oliveira, S. C., Amorim, C. A., Carvalho, M. P. e Pileggi, M. (2003) Test of the efficiency of propolis in combating pathogenic bacteria of the respiratory system. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, 9 (2): 17-20.

Evangelista-Rodrigues, A.; Silva, E. M. S. da; Bezerra, E. M. F. e Rodrigues, L. M. (2005) Análises físico-químicas de méis de abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidas em duas regiões do Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v35, n.5, p.1166-1171.

Fernandes, F. F., Dias, A. L. T., Ramos, C. L., Ikegaki, M., Siqueira, A. M. e Franco, M. C. (2007) The “in vitro” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(2): 93-95.

Ferreira, M. G., Manente-Balestieri, F. C. D. e Balestieri, J. B. P. (2010) Pólen coletado por *Scaptotrigona depilis* (Moure) (Hymenoptera, Meliponini), na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 54(2): 258–262.

Franco, S. L, Bruschi, M. L., Moura, L. P. P. e Bueno, J. H. P. (2000). Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. *Revista Brasileira Farmacognosia* 9: 1-10.

Gomes, F. H. F., Grassi, M. L., Menezes, M. L. e Ximenes, V. F. (2009) AAPH-Induced hemolysis of erythrocytes: antihemolysis protection by gallic acid and your esters. *Prope – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho*.

Grace, S. C. e Logan, B. A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* (2000) 355, 1499-1510.

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

Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M. H., Bilsel, M. e Gören, A. C. (2010) Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2227–2238.

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

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

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

Izuta, H., Nahara, Y., Shimazawa, M., Mishimas, S., Kondo, S. e Hara, H. (2009) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Bee Products and Their Constituents Determined by ESR *Biol. Pharm. Bull.* 32(12) 1947—1951.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I. e Karathanos, V. T. (2009) Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 116: 452–461.

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

Kerr, W. E. 1996. Biologia e manejo da tíuba: a abelha do Maranhão. EDUFMA. São Luis, MA. 156pp.

Kim, Y. e Chung, H. (2011) The effects of Korean própolis against foodboorne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New Biotechnology*. Volume 28, Number 6 .

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

Kumazawa, S., Hamasaka, T. e Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-339.

Laskar, R. A., SK,I., Roy, N. e Begum, N. A. (2010) Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry* 122: 233–237.

Lianda, R. L. P. (2009) Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante, 156f.

Liberio, S. A., Pereira, A. L., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, A. J. A. M., Mattar, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M. e Monteiro-Neto, V. (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:108.

Lichtenberg, E. M., Imperatriz-Fonseca, V. L. e Nieh, J. C. (2010) Behavioral suites mediate group-level foraging dynamics in communities of tropical stingless bees. *Insectes Sociaux*. 57:105–113.

Lima, B., Tapia, A. Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirshmann, G., Podio, N. S., Wunderlin, D. A. e Feresin, G. E. (2009) Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina) J. Agric. Food Chem. 57, 2691–2698.

Lu, L., Chen, Y. e Chou, C. (2003) Antibacterial and DPPH Free Radical-scavenging Activities of the Ethanol Extract of Propolis Collected in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 11, No. 4, Pages 277-282.

Mannaa, F., El-Shamy, K. A., El-Shaikh, K. A. e El-Kassaby, M. (2011) Efficacy of fish liver oil and propolis as neuroprotective agents in pilocarpine epileptic rats treated with valproate. Pathophysiology 18: 287–294.

Marchini, L. C., Carvalho, C. A. L. de, Alves, R. M. de O., Teixeira, G. M., Oliveira, P. C. F. de e Rubia, V. R. (1998) Características físico-químicas de amostras de méis da abelha urucu (*Melipona scutellaris*). In: XII Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador, BA, p. 201.

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

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

Mathew R, White E. (2012) Autophagy, Stress, and Cancer Metabolism: What Doesn't Kill You Makes You Stronger. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.

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

Miorin, P. L., Levy Junior, N. C., Custodio, A. R.; Bretz, W. A. e Marcucci, M.C. (2003) Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and

Tetragonisca angustula against *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology. 95: 913–920.

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

Neves, C. A., Gitirana, L. B. e Sarrão, J. E. (2003) Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) *Braz. J. Biol.*, 63(4): 683-690.

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

Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T. e Ngeontae, W. (2011) New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. Food Research International 44: 798–806.

Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A. S., Ikegaki, M., Cury, J. A. e Rosalen, P. L. (1998) Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* 36, 24-28.

Pereira, A. L. (1998) Efeito dos flavonoides na oxidação da hemoglobina e peroxidação lipídica em eritrócitos normais e deficientes em Glicose-6-desidrogenase tese apresentada ao instituto de biologia da universidade estadual de campinas. Tese de Doutorado - Instituto de biologia UNICAMP

Pereira, A. S., Seixas, F. R. M. S. e Neto, R. A. (2002) Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quimica. Nova*, Vol. 25, No. 2, 321-326.

Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M. e Ohara, M. T. (2003) Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325p.

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

Renz, S. V. (2003) Oxidação e antioxidantes. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica da pós graduação em ciências veterinárias na UFRGS do tecido animal.

Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L., Breyerd, H. e Salatinoa, A. (2011) Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. J Sci Food Agric.

Roselino, A. C., Santos, S. A. B. e Bego, L. R. (2010) Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 154-158.

Roselino, A. C., Santos, S. B., Hrcir, M. e Bego, L. R. (2009) Differences between the quality of strawberries (*Fragaria x ananassa*) pollinated by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* and *Nannotrigona testaceicornis*. Genetics and Molecular Research 8 (2): 539-545.

Rufino, M. S. M., Alvez, R. E., Brito, E. S., Moraes, S. M. Sampaio, C. G., Pérez-Jimenez, J. e Saura-Calixto, F. D. (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa). Comunicado Técnico. ISSN 1679-6535.

Sakagami, S. F., Montenegro, M. J. e Kerr, W. E. (1965) Behaviour studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. Journal Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, zool. 15.

Sanchez-Moreno, C. (2002) Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8: 121.

Santos, I. A. (2002) A vida de uma abelha solitária. Depto. Ecologia, Universidade de São Paulo. *Revista Ciência Hoje* n.179

Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S., Marcucci, M. C., Aidar D. S., Silva, E. C. A., Carvalho, C. A. L. e Eberlin, M. N. (2007) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. *Apidologie* 38: 93–103.

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

Singer, R. B. (2002) The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl (Orchidaceae: Maxillariinae): Sexual Mimicry and trap- flowers. *Annals of Botany* 89: 157-163.

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

Stevanato, R. e Gregoris, E. (2010) Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology* 48: 76–82.

Suzuki, I., I. Hayashi, T. Takaki, D.S. Groveman e Y. Fujimiya. (2002) Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother. Radiopharm.* 17: 553–562.

Teixeira, E. W., Message, D., Negri, G., Salatino, A. e Stingheta, P. C. (2008) Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian

Propolis Samples. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (3), 307–315.

Umthong, S., Puthong, S. e Chanchao, C. (2009) *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 37, No. 5, 855–865 2009 World Scientific Publishing Company.

Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L. e Carvalho, M. (2011) Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food and Chemical Toxicology. 49: 86–92.

Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. F., Manfredini, V., Benfato, M. S. e Kubota, L. T. (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quim. Nova, Vol. 30, No. 5, 1323-1338.

Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Ângulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F. M., Velazquez, E. F., Astiazaran, H. e Hernandez, J. (2007) Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran própolis Journal of Applied Microbiology 103: 1747–1756.

Watanabe, M. A. E., Amarante, B. J. C. e Sforcin, J. M. (2011) Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. journal pharmacy and pharmacology, 63: 1378–1386.

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., e Li, X. (2011) Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* 16, 3444-3455.