

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG**

TACIANE MAÍRA MAGALHÃES HIPÓLITO

**Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta*
varia: determinação da composição química e atividades
biológicas**

ALFENAS-MG
2013

TACIANE MAÍRA MAGALHÃES HIPÓLITO

Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*: determinação da composição e atividades biológicas

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

ALFENAS-MG
2013

Hipólito, Taciane Máira Magalhães

Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*:
determinação da composição química e atividades biológicas / Taciane
Máira Magalhães Hipólito. - 2013.
96 f. -

Orientador: Masaharu Ikegaki

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Própolis. 2. Produtos com Ação Antimicrobiana. 3. Antioxidantes.
4. Compostos Fenólicos. 5. Flavonoides. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.
CDD: 615.1

TACIANE MAÍRA MAGALHÃES HIPÓLITO

**PRÓPOLIS DE ABELHA NATIVA SEM FERRÃO DA
ESPÉCIE FRIESEOMELITTA VARIA: DETERMINAÇÃO
DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Aprovado em: 04/03/13

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Masaharu Ikegaki

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Instituição: CPQBA - UNICAMP

Assinatura: Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Marcelo Henrique dos Santos

Aos meus pais, Mauri e Déa, e a minha irmã, Laísa,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a mais perfeita fonte de sabedoria e força em todos os momentos que vivi durante a realização desta pós-graduação.

Ao Professor Masaharu Ikegaki, pela orientação e confiança no meu trabalho. Sua competência e amizade muito contribuíram para meu crescimento pessoal e amadurecimento científico.

À Unifal-MG pela oportunidade e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Marcelo Ayres de Araújo, pela receptividade e auxílio na obtenção das amostras de própolis para a realização desta pesquisa.

Aos colaboradores do CPQBA/UNICAMP (Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz e Prof. Dr. João Ernesto Carvalho) e da ESALQ-USP (Prof. Dr. Severino Matias Alencar), pela parceria na realização dos experimentos.

Aos meus pais, Mauri Hipólito e Maria Déa Magalhães Hipólito, e a minha irmã, Laísa Taline Magalhães Hipólito, pelo amor, apoio e compreensão constantes.

Aos meus amados irmãos da Comunidade Mariana Resgate e de seus apostolados, Grupos de Oração Missão Resgate e Gerados por Maria, que me acompanharam e foram alicerce desde o início até o fim deste curso de pós-graduação.

À querida Sarah Negreiros de Carvalho, pela amizade, cuidado e carinho em todos os momentos, sobretudo durante o tempo que estive em Campinas para a realização de experimentos.

Aos amigos do laboratório de Bioprocessos, Marina Poloni e Gustavo Silveira, pela companhia e apoio.

À minha amiga Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho, cuja amizade e auxílio científico sempre foram valiosos.

Aos companheiros de trabalho e amigos, Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho e alunos do LQFar (Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica), com os quais dividi os momentos de conclusão deste curso.

RESUMO

O auxílio terapêutico exercido pelas própolis de abelhas *Apis mellifera* é conhecido desde tempos imemoriais e suas propriedades têm sido amplamente estudadas. Contudo, as própolis produzidas por abelhas sem ferrão foram ainda pouco investigadas. Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar algumas características químicas e atividades biológicas de própolis de abelhas sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia* obtidas em épocas e locais diferentes. Para tanto, obtiveram-se extratos etanólicos de própolis coletadas na região de Alfenas-MG (Fv1, Fv2 e FvA), os quais foram avaliados quanto ao perfil de absorção da luz UV visível, composição por flavonoides (com base em quercetina), compostos fenólicos (com base em ácido gálico) e perfil químico por cromatografia em camada delgada (CCD). Adicionalmente, Fv1, Fv2 e FvA foram submetidos a testes *in vitro* que analisaram suas atividades antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa. O espectro de absorção da luz UV visível apresentou picos característicos de fenólicos e flavonoides e os testes quantitativos mostraram baixos valores destes compostos fitoquímicos. A CCD, por sua vez, revelou a presença de terpenoides em todas as amostras. Quanto às propriedades biológicas, verificou-se baixa atividade antioxidante. As atividades antimicrobiana e antiproliferativa, no entanto, foram bastante relevantes. A amostra Fv1 mostrou capacidade para inibir totalmente o crescimento de células de câncer de ovário multirresistente a drogas em uma concentração de 7,6µg/mL, valor inferior ao necessário do padrão Doxorubicina para inibir esta mesma linhagem celular. Nos testes de atividade antimicrobiana, Fv1 também se destacou por sua ação bactericida sobre *Streptococcus agalactiae* em concentração contida entre 15,62-31,25µg/mL, valor também inferior ao obtido com o padrão Cloranfenicol. Os resultados encontrados nesta pesquisa evidenciam o grande potencial biológico das própolis de *Frieseomelitta varia*, que pode se modificar conforme local e época de coleta.

Palavras-chave: *Frieseomelitta varia*, antimicrobiana, antiproliferativa, antioxidante, flavonoides, compostos fenólicos.

ABSTRACT

The therapeutic aid exercised by propolis of honeybee *Apis mellifera* is known since immemorial times and their properties have been widely studied. However, the stingless bee propolis has been little investigated. In this way, this work proposed to assess some chemical characteristics and biological activities of propolis produced by *Frieseomelitta varia* stingless bees. The samples (Fv1, Fv2 and FvA) were obtained in different times and places in the city of Alfenas-MG. Extraction were made with them in ethanol and the resultant extracts were submitted to some evaluations: UV-visible absorption profile, composition by flavonoids (quercetin), phenolic compounds (based on Gallic acid) and chemical profile by thin-layer chromatography (TLC). Additionally, Fv1 Fv2 and FvA were examined by *in vitro* biological assays, such as antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. The absorption spectrum of UV-visible light showed characteristic peaks of phenolic compounds and flavonoids, on the other hand, the quantitative tests showed low values of these phytochemicals. The TLC result revealed the presence of terpenoides in all the samples. With regard to biological properties, low antioxidant activity was found. However, the antimicrobial and antiproliferative results, were quite relevant. The sample Fv1 showed ability to inhibit fully the growth of ovarian cancer cells resistant to drugs at a concentration of 7.6 μ g/mL, below the required value of the standard Doxorubicin to inhibit this same cell line. In the antimicrobial assays, Fv1 also stood out for its bactericidal action on *Streptococcus agalactiae* in concentration contained between 15.62 -31.25 μ g/mL, also lower than the value obtained with the standard Chloramphenicol. The results found in this research show the great biological properties of *Frieseomelitta varia* propolis, which can change according to location and time of collection.

Keywords: *Frieseomelitta varia*, antimicrobial, antioxidant, antiproliferative, flavonoids, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Entrada de ninhos da abelha <i>Frieseomelitta varia</i>	18
Figura 2 - Fotos de abelha operária da espécie <i>Frieseomelitta varia</i>	19
Figura 3 - Distribuição geográfica das abelhas <i>Frieseomelitta varia</i>	20
Figura 4 - Ácidos fenólicos identificados em extrato de <i>Populus nigra</i> , fonte vegetal comumente utilizada por abelhas <i>Apis mellifera</i> europeia na produção de própolis.	21
Figura 5 - Flavonoides identificados em extrato de <i>Populus nigra</i> , fonte vegetal comumente utilizada por abelhas <i>Apis mellifera</i> europeia na produção de própolis.	22
Figura 6 - Estruturas químicas de alguns flavonoides comumente encontrados em própolis.	23
Figura 7 - Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos comumente encontrados em própolis.	24
Figura 8 - Estrutura química do isopreno e de alguns monoterpenos.	25
Figura 9 - Formação cabeça-cauda dos esqueletos carbonados dos compostos mono e sesquiterpenos.	26
Figura 10 - Reação entre o radical DPPH e uma molécula antioxidante.	35
Figura 11 - Reação de molécula ABTS com persulfato de potássio para formar o radical ABTS•+.	36
Figura 12 - Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante.....	37
Figura 13 - Curva utilizada para o cálculo do valor de ORAC.	38
Figura 14 - Caixas das abelhas <i>F. varia</i> com resina característica depositada sobre suas paredes externas.	42
Figura 15 - Caixa contendo colmeia de onde foi obtida a amostra de própolis denominada FvA.	43
Figura 16 - Processo de coleta das amostras de própolis por meio de raspagem das tampas das caixas com espátula.....	43
Figura 17 - Aspecto das própolis de <i>F. varia</i> após processo de pulverização em grau e pistilo.	44
Figura 18 - Espectros de absorção da luz ultravioleta visível obtidos nas análises das amostras Fv1, Fv2 e FvA.	58

Figura 19 - Cromatograma contendo diferentes amostras de meliponíneos e padrões.....	63
Figura 20 - Placa cromatográfica contendo amostras de <i>F. varia</i>	65
Figura 21- Atividade antioxidante de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> pelo ensaio ABTS.....	70
Figura 22 - Atividade antioxidante de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> pelo ensaio FRAP. ..	71
Figura 23 - Atividade antioxidante de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> pelo ensaio ORAC...	73
Figura 24 - Estruturas das paredes celulares de bactérias.....	78
Figura 25 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina 1.	81
Figura 26 - Atividade antiproliferativa de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> (Fv1).....	82
Figura 27 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina 2.	82
Figura 28 - Atividade antiproliferativa de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> (Fv2).....	83
Figura 29 - Atividade antiproliferativa de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> (FA2).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.....	54
Tabela 2 - Médias das quantificações de compostos fenólicos em extratos secos (Fv1, Fv2 e FvA) de própolis produzidas pelas abelhas <i>Frieseomelitta varia</i>	59
Tabela 3 - Médias das quantificações de flavonoides em extratos secos (Fv1, Fv2 e FvA) de própolis produzidas pelas abelhas <i>Frieseomelitta varia</i>	61
Tabela 4 - Atividade antioxidante pelo método DPPH do padrão Trolox e extratos secos (Fv1, Fv2, FvA) de própolis produzidas pelas abelhas <i>Frieseomelitta varia</i>	67
Tabela 5 - Atividade antibacteriana do padrão Cloranfenicol e extratos secos (Fv1, Fv2, FvA) de própolis produzidas pelas abelhas <i>Frieseomelitta varia</i>	76
Tabela 6 – Concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Doxorubicina e extratos de própolis de <i>F. varia</i> capazes de inibir totalmente o crescimento (TGI- <i>Total Growth Inhibition</i>) das células tumorais e queratinócitos (q).....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Própolis.....	15
2.2 Abelhas sem ferrão.....	16
2.3 Composição química de própolis	20
2.4 Atividades biológicas	26
2.4.1 Atividade antimicrobiana	27
2.4.2 Câncer e atividade antiproliferativa	29
2.4.3 Radicais livres e atividades antioxidantes	31
2.4.3.1 DPPH.....	34
2.4.3.2 ABTS	35
2.4.3.3 FRAP	36
2.4.3.4 ORAC	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivo específico.....	40
4 PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1 Coleta das amostras de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	41
4.2 Obtenção do extrato etanólico de própolis	43
4.3 Análises químicas	45
4.3.1 Espectrofotometria na região ultravioleta visível	45
4.3.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos.....	45
4.3.3 Determinação quantitativa de flavonoides totais	46
4.3.4 Cromatografia em camada delgada	46
4.4 Determinação das atividades biológicas	47
4.4.1 Atividade antimicrobiana	47
4.4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
4.4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	49
4.4.2 Atividades antioxidantes	50
4.4.2.1 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	50

4.4.2.2 Atividade sequestrante do radical ABTS	51
4.4.2.3 Potencial de redução de Ferro (FRAP)	51
4.4.2.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	52
4.4.3 Atividade antiproliferativa	53
4.5 Análise estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Investigação da composição química.....	57
5.1.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível	57
5.1.2 Conteúdo de compostos fenólicos	59
5.1.3 Conteúdo de flavonoides	60
5.1.4 Cromatografia em camada delgada	62
5.2 Determinação das atividades biológicas	67
5.2.1 Atividades antioxidantes	67
5.2.1.1 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	67
5.2.1.2 Atividade sequestrante do radical ABTS	69
5.2.1.3 Potencial redutor do Ferro (FRAP).....	71
5.2.1.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	72
5.2.2 Atividade antimicrobiana	75
5.2.3 Atividade antiproliferativa	81
6 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo utilizados no tratamento de diversas doenças desde tempos remotos e isto ocorre pelo conhecimento popular de seus benefícios para o organismo. A Organização Mundial da Saúde valoriza o uso tradicional de produtos provenientes da biodiversidade, reconhecendo que o mesmo constitui um importante instrumento na descoberta de novos medicamentos para o combate de doenças que assolam as populações dos países em desenvolvimento (BRASIL, 2012).

Considerando que o Brasil se enquadra nesta realidade e possui uma vasta biodiversidade ainda pouco investigada, fazem-se necessários estudos de bioprospecção mais amplos. Acerca da importância dos mesmos, dados mostraram que para se tratarem as doenças que assolam a humanidade, entre os anos de 1981 e 2010, 59,6% dos medicamentos aprovados eram de origem natural (CRAGG et al, 2012). Assim, os países detentores de grande biodiversidade podem ter sua riqueza natural explorada e, desta forma, entrarem em mercados bilionários.

Estes fatores são relevantes, ainda que sejam necessários para isto muitos anos de pesquisa com os produtos naturais até que seja possível a produção e comercialização de medicamentos com eficácia e segurança comprovadas. Porém, esta busca também permite um retorno favorável à sociedade de uma forma mais imediata, pois constitui uma maneira potencial de se resgatar o cultivo familiar destes produtos, ou até mesmo lhes agregar valor.

Entre os recursos naturais inseridos neste contexto, considera-se a própolis uma fonte promissora (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Isto se confirma por estudos etnofarmacológicos, que demonstram a utilização da mesma em tratamentos de várias enfermidades desde a antiguidade (TRUSHEVA et al, 2006; XUAN, 2011). Sobre isto, têm-se relatos de seu uso em feridas, queimaduras, dores de garganta, gastrites, úlceras estomacais, entre outros. Além destes empregos provenientes do conhecimento popular, comprovações científicas de atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, citostática, antiproliferativa, citotóxica, hepatoproteção e

antimicrobiana (BANKOVA, 2005; BANKOVA; POPOVA, 2007; SFORCIN; BANKOVA, 2011), também tem ocorrido.

As referidas atividades exercidas pelas própolis, e muitas outras além destas, estão relacionadas com a sua composição. Como se sabe, a sua complexidade química está diretamente ligada à vegetação que compõe o habitat das abelhas. Conforme as condições climáticas, variação botânica e localização geográfica, diferenças podem ocorrer na constituição química das própolis (GÜLÇİN et al, 2010).

Algumas vezes, esta variação pode ser somente quantitativa, não diferindo as classes fitoquímicas nelas presentes (MIGUEL et al, 2010). Entretanto, contrapondo este cenário, há trabalhos científicos que relatam a inexistência de discrepâncias em algumas atividades biológicas quando as própolis são de origens geográficas diferentes (FERNANDES JÚNIOR et al, 2001). Com isto, percebe-se a importância de se estudar de forma aprofundada cada realidade, pois este contexto pode variar muito.

A respeito disso, muitas pesquisas sobre as atividades biológicas e composição química das própolis vem sendo realizadas. No entanto, a grande maioria foi desenvolvida com aquelas produzidas por *Apis mellifera*, espécie de abelhas mais conhecidas e cujos produtos são amplamente utilizados. Assim, podem-se inserir neste contexto as própolis produzidas por abelhas sem ferrão, fonte natural ainda pouco estudada (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MICHENER, 2007).

Estas abelhas são pertencentes à tribo Meliponini, e por isso também são denominadas “meliponíneos”. No Brasil, elas são responsáveis por cerca de 60 a 90% da polinização, conforme o ambiente onde estão inseridas (MICHENER, 2007). Do ponto de vista econômico, as abelhas sem ferrão são importantes na produção de mel e outros produtos, e embora essa produção seja em quantidade inferior à de *Apis mellifera*, é considerada de ótima qualidade. Assim, esses produtos têm um alto valor agregado, sendo responsáveis por uma considerável fatia do faturamento do segmento apícola, ou meliponícola (GONÇALVES, 2010).

Tendo em vista a contribuição do conhecimento sobre esta fonte diversa de própolis, Bankova e Popova (2007) afirmam que frequentes estudos têm sido realizados comparando-se os produtos de abelhas melíferas e meliponíneos, ambos

coletados de uma mesma localização. Os dados obtidos nestes estudos muitas vezes mostraram que os recursos utilizados por *Apis mellifera* e as abelhas sem ferrão não são os mesmos, levando a diferentes atividades biológicas exercidas pelo mel e própolis produzidas por elas.

Desta forma, pode-se perceber a necessidade de estudos complementares para elucidar as propriedades das própolis de meliponíneos provenientes de diferentes localidades. Muito já se tem melhorado neste seguimento, no entanto, *Frieseomelitta varia* constitui uma espécie cujos produtos, mel e própolis, não foram ainda amplamente investigados. Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar as atividades biológicas e alguns aspectos químicos das própolis produzidas por esta espécie de abelha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Própolis

A palavra própolis (do grego pro - “em defesa de” - e polis - “cidade”) reflete a sua importância para as abelhas. É usada para manter asséptico o ambiente perto de seus ninhos (SAWAYA, 2004). É depositada na entrada das colmeias para fechar as suas frestas e reduzir a entrada de vento frio, bem como de inimigos naturais como fungos e bactérias. Dentro das colmeias, é usada para embalsamar insetos invasores que são mortos e não podem ser retirados, pois desta forma se evita a decomposição dos mesmos (CASTALDO; CAPASSO, 2002; CAMILO, 2008; TEIXEIRA et al, 2008). Também é utilizada como material de construção no interior da colmeia, soldando favos e envernizando o interior dos alvéolos para a postura da abelha rainha (SALOMÃO et al, 2004).

É constituída de um material resinoso, cuja cor geralmente é creme, amarela, verde, marrom claro ou escuro. Quando colhida, denominada em tal momento como própolis bruta, é constituída de cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (CAMILO, 2008). A composição da própolis pode ser extremamente complexa e variar muito, mas sabe-se que os constituintes mais importantes são a cera, a resina vegetal e compostos voláteis (MENEZES, 2005).

Para a sua produção, as abelhas coletam exsudatos dos tecidos vegetais e estas fontes podem ser de diversas naturezas, como material lipofílico nas folhas, mucilagens, gomas, resinas, entre outros. Estes compostos ainda podem ser misturados com cera, enzimas das abelhas, pólen e açúcares (SFORCIN; BANKOVA, 2011), gerando a composição final complexa citada anteriormente.

Geralmente, estes materiais são recolhidos das plantas que se encontram nas proximidades das colmeias. Uma vez que as características do local onde esta fonte vegetal está situada influencia na sua composição fitoquímica, conseqüentemente, a localização das colmeias pode afetar diretamente na composição final da própolis.

Como consequência desta variabilidade na constituição química, diferenças nas propriedades biológicas também podem ocorrer (SALATINO et al, 2005; CAMILO, 2008).

Sobre isto, a literatura mostra que muitas das resinas coletadas pelas abelhas possuem atividade contra uma grande variedade de patógenos humanos e animais (SALOMÃO et al, 2004). Entretanto, é importante estudar as própolis e não somente as resinas, ainda que estas componham aquelas. Isto se justifica, pois as abelhas modificam a composição original das resinas. Quando produzem as própolis, elas secretam enzimas que hidrolisam compostos inicialmente presentes nas resinas (SILVA et al, 2011). Exemplo disso são as β -glicosidases secretadas pelas abelhas, que hidrolisam flavonoides heterosídeos em agliconas, que muitas vezes, resultam em aumento do seu potencial farmacológico (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2011).

Sobre as suas formas de apresentação, a própolis pode ser distribuída como produto puro, apenas retirando-se a cera. Há ainda a possibilidade de ser comercializada na forma de cápsulas (isolada ou combinada), como extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como antisséptico bucal (combinado com melissa), como pastilhas para garganta, cremes e em forma de pó. Também pode ser usada em cosméticos e como constituinte de alimentos considerados saudáveis (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

2.2 Abelhas sem ferrão

As abelhas da subfamília Meliponinae, denominadas abelhas sem ferrão ou meliponíneos, apresentam distribuição pantropical, mas também podem ser encontradas em regiões subtropicais. São descritas mais de 400 espécies contidas em 50 gêneros, sendo que mais de 300 espécies pertencentes a 30 gêneros são encontradas nas Américas (MICHENER, 2007).

Constituem polinizadores nativos de angiospermas nos trópicos, consideradas também excelentes agentes polinizadores de emprego nas plantações em estufas (MENEZES, 2005; CAMILO, 2008). São insetos eussociais e se caracterizam

principalmente por terem seu ferrão de tamanho reduzido (SERRA, 2009). Incluem abelhas pequenas e médias (2 mm a 1,5 cm) com um nível de organização semelhante ao das abelhas *Apis mellifera* (CAMILO, 2008).

Os meliponíneos fazem seus ninhos nos mais diversos locais, como ocos de árvores e de cipós, fendas de paredes e de rochas, em ninhos de térmitas ou formigas, em ninhos abandonados de aves ou ninhos livres e em cavidades subterrâneas. Eles são muito peculiares e, por meio da estrutura construída nas suas entradas, pode-se fazer a identificação da espécie ali presente (CAMILO, 2008; SERRA, 2009).

Especificamente sobre as abelhas do gênero *Frieseomelitta*, pertencentes à tribo Trigonini, sabe-se que os ninhos são construídos em buracos apodrecidos de troncos de árvores ou em algum pequeno espaço que lhes forneça proteção suficiente. O orifício do ninho por onde passam geralmente é de 0,3 a 0,5 cm de diâmetro, permitindo a entrada ou saída de somente uma abelha por vez (Figura 1). Seus enxames não possuem abelhas guardas para proteger a entrada de seus ninhos e, por esta razão, elas espalham uma resina adesiva em volta da abertura, a fim de prevenir que algum inseto adentre a colmeia (PATRICIO, 2002).

As abelhas do gênero *Frieseomelitta* possuem tíbias grandes e achatadas no seu terceiro par de pernas, com rastelo e corbícula pouco desenvolvidos (Figura 2) (MICHENER, 2007). As abelhas operárias carregam resinas de plantas e, de forma específica nas espécies de *Frieseomelitta*, essas resinas ajudam a manter os grãos de pólen junto da corbícula que, por serem pouco desenvolvidas, possuem apenas poucos pelos para captar e ligar o pólen (PATRICIO, 2002).

A compreensão do padrão de sua distribuição e abundância é considerada importante para que se desenvolvam estratégias de conservação, a fim de reduzir os efeitos da fragmentação de habitats sobre a estrutura genética e ecológica de populações de meliponíneos (SERRA, 2009). Os conhecimentos a respeito disto são bem estudados em formigas e *Apis mellifera*. Entretanto, em abelhas sem ferrão, ainda são escassos.

Neste sentido, o que se sabe sobre o gênero *Frieseomelitta* (Ihering, 1912) é que sua distribuição no Brasil se inicia nos estados do Sudeste e se estende para outros estados. O gênero é composto, ao todo, por 16 espécies. Destas, 10 estão

presentes no Brasil, a se citar, *F. dispar*, *F. doederleini*, *F. flavicornis*, *F. francoi*, *F. languida*, *F. longipes*, *F. portoi*, *F. silvestrii*, *F. trichocerata* e *F. varia* (GONÇALVES, 2010).

Singularmente, a espécie *Frieseomelitta varia* apresenta vasta distribuição geográfica, cobrindo os estados brasileiros da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Tocantins, Mato Grosso e alcançando a região central da Bolívia, como se pode observar na Figura 3 (GONÇALVES, 2010).

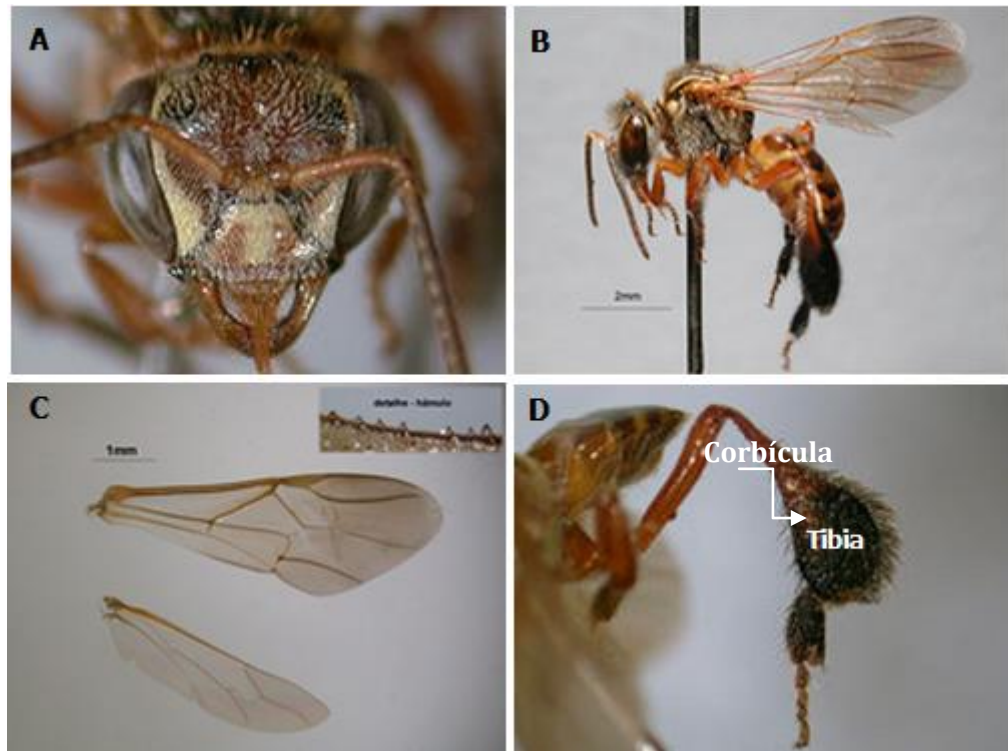
As diversas espécies de *Frieseomelitta* têm sido registradas em estudos realizados em florestas tropicais úmidas, savanas tropicais (cerrado) e florestas secas (caatinga). Entretanto, elas não foram encontradas em áreas mais ao sul do país, provavelmente devido à sua intolerância a climas frios (TEIXEIRA; OLIVEIRA; VIANA, 2007).

Figura 1 - Entrada de ninhos da abelha *Frieseomelitta varia*.



Fonte: FRIESEOMELITTA VARIA (2011).

Figura 2 - Fotos de abelha operária da espécie *Frieseomelitta varia*.



Fonte: FRIESEOMELITTA VARIA (2011), com modificações.

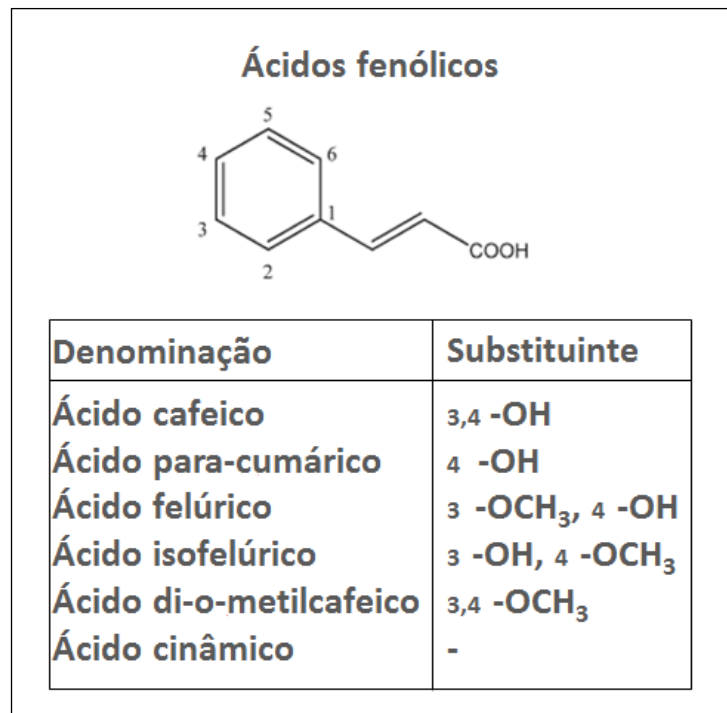
Nota: vista frontal (A), vista lateral (B), asas (C) e perna posterior (D). Na tíbia (em suas patas traseiras) está localizada a corbícula, conforme indicado por seta (D).

Com relação às fontes vegetais utilizadas pelas abelhas, a resina contida na própolis é coletada das plantas próximas ao local que habitam. Sobre as abelhas *Apis mellifera*, sabe-se que o espectro de voo abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, locais estes em que as abelhas coletam pólen e néctar para sua alimentação e obtêm resina para a constituição da própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas por uma determinada fonte vegetal, porém relatos demonstram que elas são seletivas nesta coleta (MENEZES, 2005).

Acerca das abelhas *Frieseomelitta* sp, um estudo permitiu afirmar que o uso de recursos florais observado entre suas espécies poderiam ser relatados como semelhanças e discrepâncias encontradas entre biomas, principalmente caatinga e cerrado e as interações ecológicas entre as populações presentes em cada bioma. (TEIXEIRA; OLIVEIRIA; VIANA, 2007).

(pinobankisina, pinobankisina 5-metil-éter e pinocembrina), dispostos nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 - Ácidos fenólicos identificados em extrato de *Populus nigra*, fonte vegetal comumente utilizada por abelhas *Apis mellifera* europeia na produção de própolis.



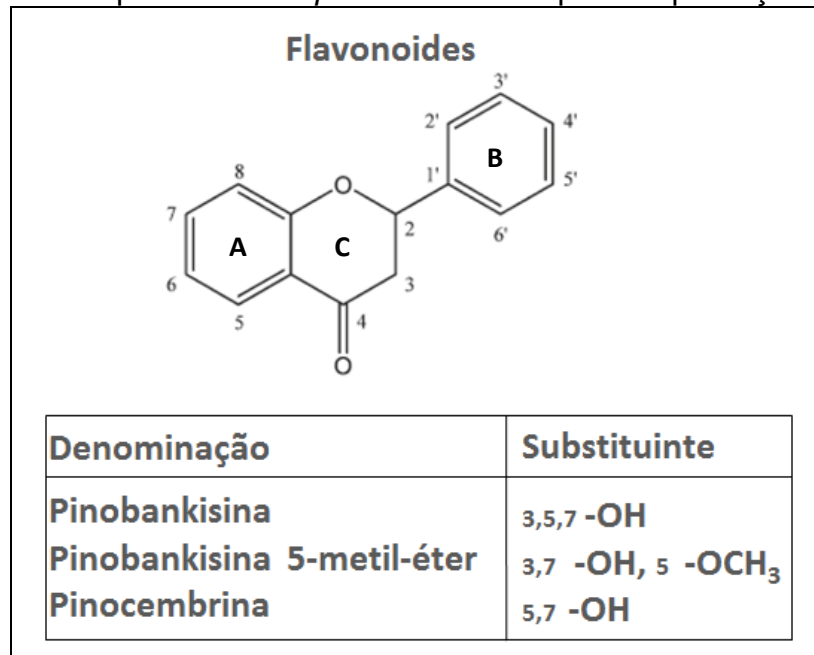
Fonte: DUDONNÉ et al (2011), adaptado.

Barbaric et al (2011) pesquisaram a composição química de própolis da Macedônia, Bósnia e Herzegovina e também encontraram ácidos fenólicos (ácido felúrico e *p*-cumárico) e flavonoides (galangina, pinocembrina, pinocembrina-7-metilester, crisina, apigenina e kaempferol).

Na Grécia, foram encontrados diversos compostos químicos (vanilina, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido *o*-cumárico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido felúrico, ácido cafeico, ácido sinápico, resveratrol, crisina, epicatequina, naringenina, catequina, genisteína, kaempferol, ácido clorogênico, quercetina, miricetina, ácido abiético, ácido isopimárico, pinocembrina, pinobankisina, pinobankisina-*o*-acetato, apigenina, entre outros)

(KALOGEROPOULOS et al, 2009). Algumas das estruturas químicas destes compostos estão dispostas nas Figuras 6 e 7.

Figura 5 - Flavonoides identificados em extrato de *Populus nigra*, fonte vegetal comumente utilizada por abelhas *Apis mellifera* europeia na produção de própolis.



Fonte: DUDONNÉ et al (2011).

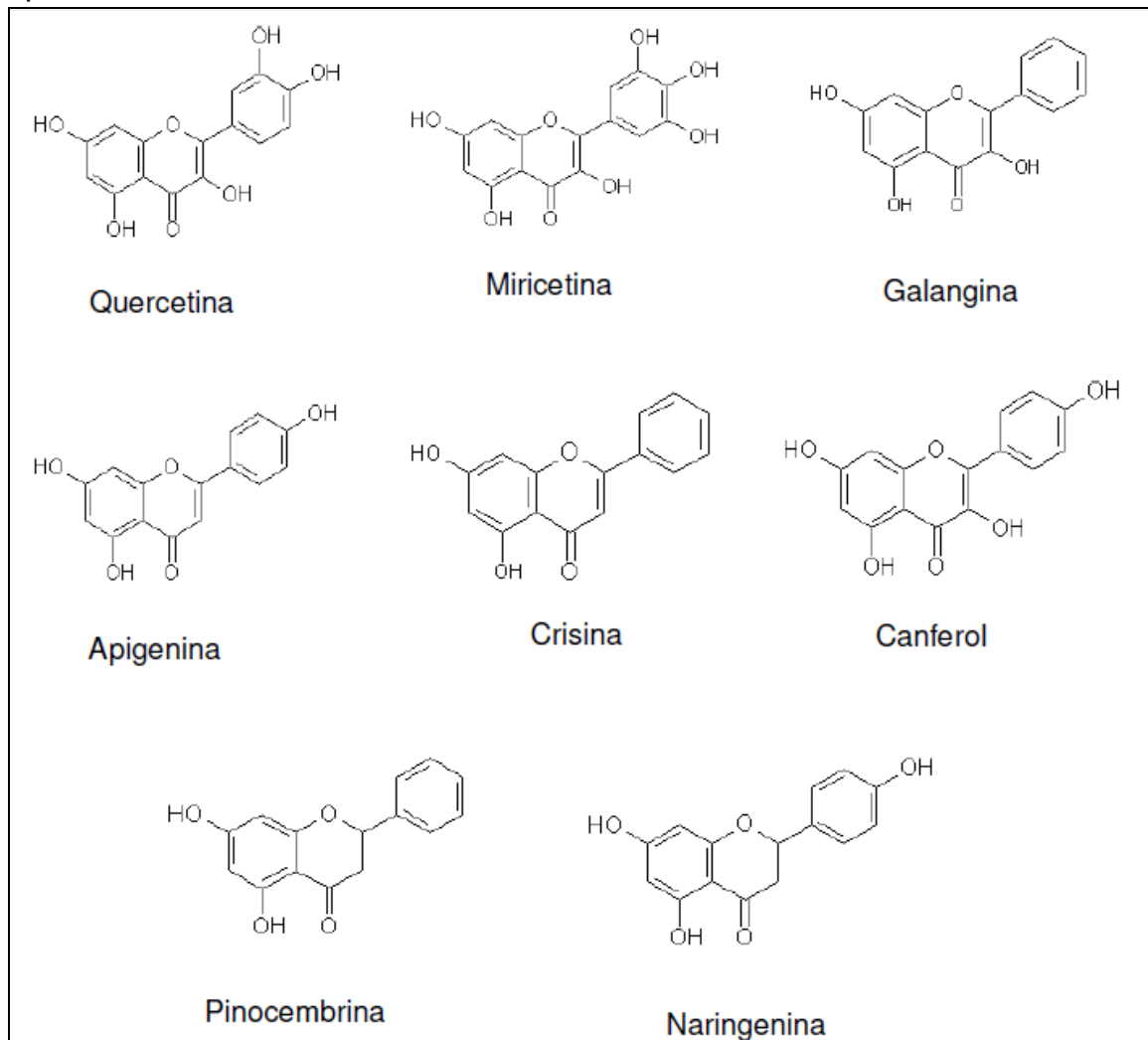
Nota: As letras "A", "B" e "C" indicam as denominações dos anéis do núcleo básico de flavonoides.

Como se pode notar, as própolis europeias geralmente são constituídas de muitos compostos fenólicos, sobretudo, flavonoides. Nas própolis tropicais, estes também são detectados, mas outras classes químicas, como terpenoides têm sido identificados com frequência.

As própolis brasileiras produzidas por *Apis mellifera* foram classificadas em 13 tipos segundo seu perfil químico (Silva et al, 2008). Entre estas, Park, Alencar e Aguiar (2002) analisaram a composição química das própolis dos grupos 3, 6 e 12 e encontraram alguns destes compostos fenólicos detectados em própolis europeias (ácido cumárico, ácido felúrico, kaempferol, apigenina, ácido cafeico, pinocembrina, galangina, pinobankisina 3-acetato, crisina). No entanto, detectaram também uma série de compostos aromáticos, terpenoides e ésteres de ácidos graxos. Na própolis

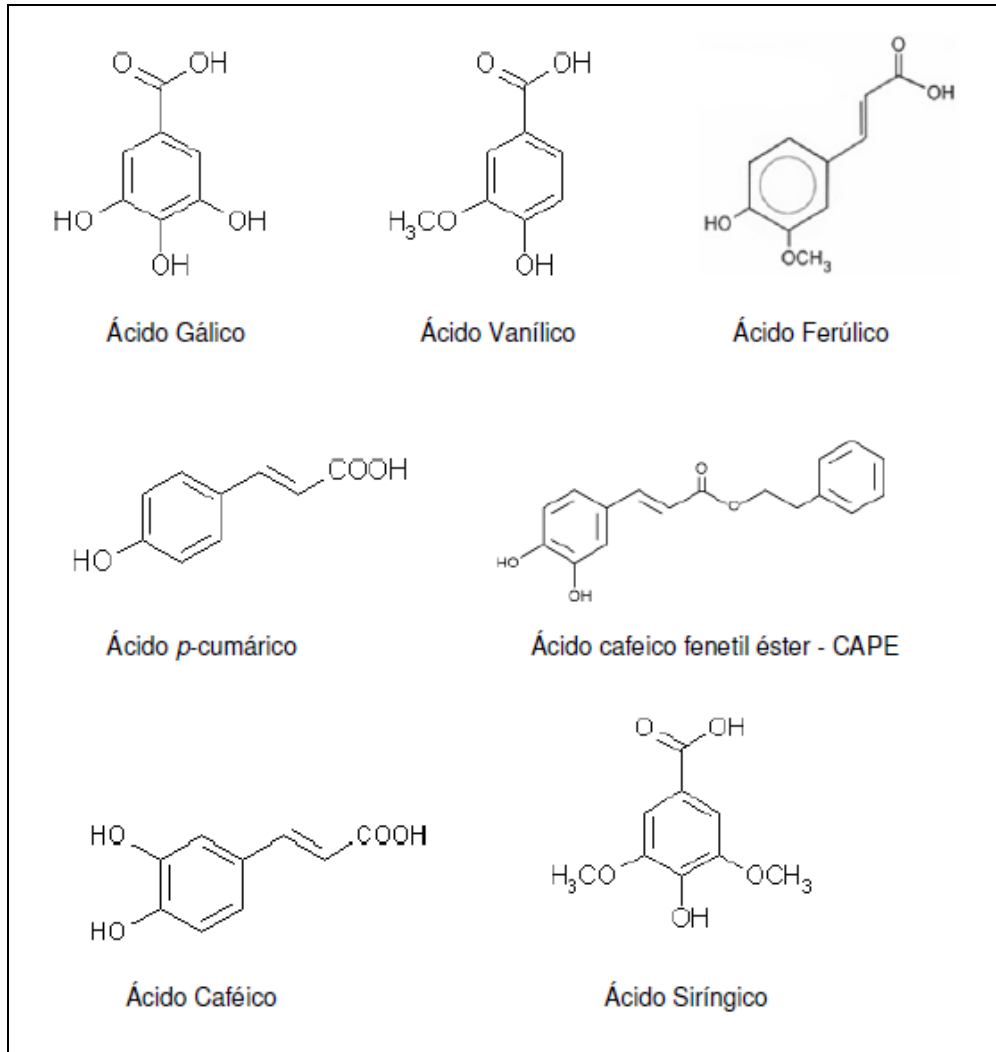
vermelha, proveniente da região nordeste do Brasil, foram encontrados principalmente flavonoides (rutina, liquiritigenina, daidzeina, pinobankisina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobankisina-3-acetato, biochanina) (DAUGSCH et al, 2008).

Figura 6 - Estruturas químicas de alguns flavonoides comumente encontrados em própolis.



Fonte: CABRAL (2008).

Figura 7 - Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos comumente encontrados em própolis.



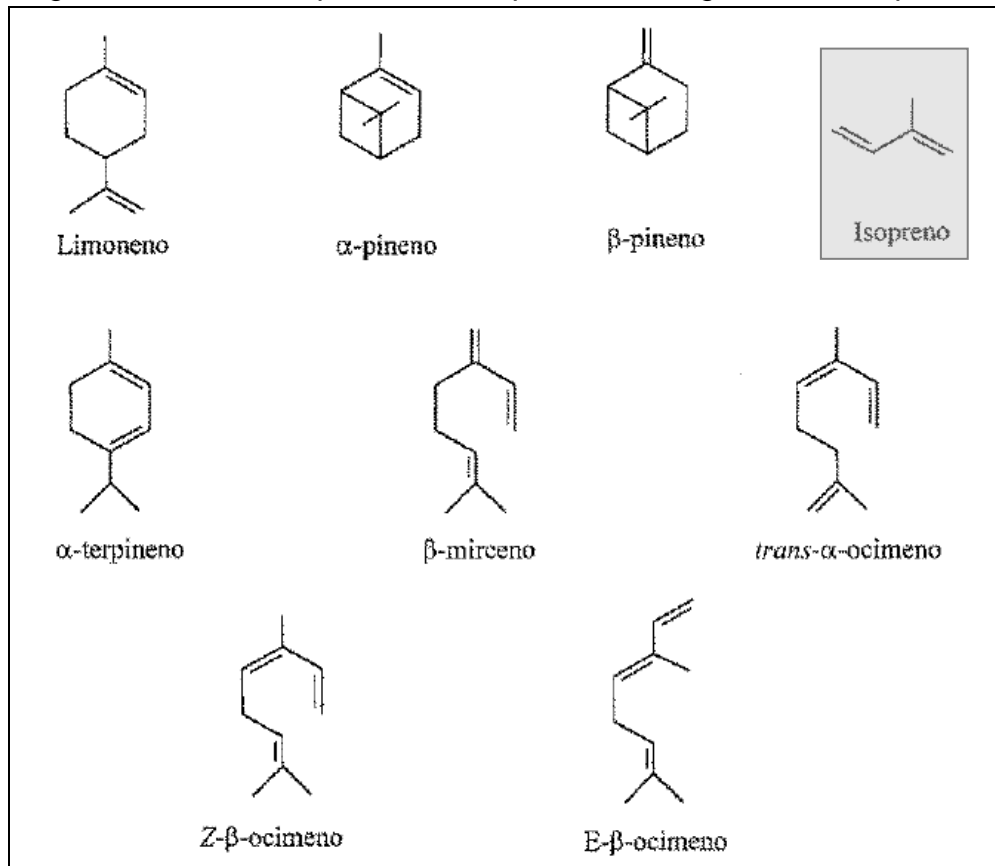
Fonte: CABRAL (2008).

Analisando óleos essenciais obtidos a partir de própolis brasileira, Oliveira et al (2010) encontraram β -pineno, limoneno, acetofenona, linalool, nonanal, metil hidroxicinamato, etil-hidroxicinamato, α -ylangeno, α -copaeno, β -cariofileno, γ -elemeno, α -cariofileno, γ -muroleno, γ -cadineno, δ -cadineno.

Em relação às própolis de abelhas sem ferrão, Leonhardt, Schmitt e Blüthgen (2011) avaliaram a composição química das resinas usadas por várias espécies destas abelhas e, como resultado, obtiveram vários terpenoides (mono, sesqui, di e

triterpenos). Esta classe química é constituída por estruturas químicas que possuem como molécula fundamental o isopreno (Figura 8). A condensação de isoprenos (Figura 9), então, forma as diferentes classes (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos), conforme o número de unidades que se ligam (2, 3, 4, 6) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Figura 8 - Estrutura química do isopreno e de alguns monoterpênos.



Fonte: NUNES; PEREIRA; ANDRADE (2000), adaptado.

antioxidante (MENEZES, 2005; NAGAI et al, 2003; ALENCAR et al, 2007), antitumoral (ASO et al, 2004), anti-HIV (ITO et al, 2001), adstringente, anestésica, espasmolítica e hepatoprotetora (TEIXEIRA et al, 2008).

Conhece-se ainda, por uso popular, o potencial da própolis no aumento da resistência natural a infecções, tratamento de úlceras gastrointestinais e uso tópico, aliviando vários tipos de dermatites causadas por bactérias ou fungos (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Dentre as muitas atividades biológicas geralmente encontradas em própolis, a antimicrobiana, a antiproliferativa e a antioxidante foram alvo de estudos neste trabalho.

2.4.1 Atividade antimicrobiana

As própolis de diversas origens têm atraído cada vez mais o interesse de pesquisadores, cujos estudos avaliam suas propriedades para diferentes aplicações. Entre as atividades biológicas comumente investigadas, a antimicrobiana tem sido muito relatada e, na literatura, vêm se apresentando eficientes contra vários microorganismos patogênicos.

Kouidhi, Zmantar e Bakhrouf (2010) realizaram estudos quanto à atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis. Em tal trabalho, quatro amostras de própolis coletadas de diferentes regiões geográficas na Anatólia exibiram valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima, que se refere a menor concentração que inibe o crescimento microbiano) de 2–64 µg/mL na atividade anticariogênica (pesquisa contra bactérias que causam cárie), a qual se apresentou semelhante à de clorexidina, considerada como referência.

Trabalhando com extratos hidro alcoólicos e oleosos de própolis, Buriol et al (2009) observaram atividade relevante de ambos contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Contra estas cepas, o extrato oleoso gerou resultados semelhantes aos tradicionais extratos hidro alcoólicos, com halos de inibição de tamanho bastante próximos.

Vardar-Ünlü, Silici e Ünlü (2008) identificaram bactérias Gram-positivas sensíveis a baixas concentrações de extratos de própolis, entretanto, bactérias Gram-negativas expostas às mesmas condições se mostraram resistentes até mesmo à dose mais alta dos extratos. Os micro-organismos mais susceptíveis foram *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* F1483, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* (CIM em concentrações entre 0,12 e 0,25 µg/mL), *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* F1462, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Candida albicans* ATCC 10231 (CIM de 0,5 µg/mL).

As atividades antimicrobianas de própolis de *Scaptotrigona* sp e *Melipona quadrifasciata*, abelhas sem ferrão, foram avaliadas por Farnesi et al (2009) e os resultados mostraram que ambas as amostras provocaram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, as duas própolis foram ativas, mas aquela produzida por *Melipona quadrifasciata* apresentou melhor atividade.

Cabral (2008) realizou pesquisa com extrato etanólico de própolis vermelha, bem como de suas frações e subfrações, os quais apresentaram efeito significativo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104.

Como se pode observar, o potencial antimicrobiano das própolis geralmente varia conforme as suas origens, o tipo de extração ou de acordo com solventes utilizados neste processo. Mas independente destas variáveis, elas frequentemente apresentam atividade antimicrobiana relevante. Isto se justifica, pois são utilizadas pelas abelhas na proteção das colmeias, provavelmente apresentando também um efeito bactericida e fungicida.

Sobre a forma como as atividades antimicrobianas ocorrem, Fernandes Junior (2005) sugeriu alguns mecanismos que poderiam ser exercidos pela própolis, como inibição da divisão celular; colapso do citoplasma bacteriano, bem como da sua parede ou membrana celular; bacteriólise e inibição da síntese de proteínas. Afirma ainda que os ácidos galágino e cafeico encontrados em extratos etanólicos de própolis seriam agentes inibidores de enzimas nas bactérias.

Acredita-se, por fim, que a atividade antimicrobiana da própolis se deve a efeitos sinérgicos complexos entre flavonoides, ácidos aromáticos fenólicos e seus derivados (BURIOL, 2009). A inibição da RNA-polimerase pelos compostos obtidos de própolis foi verificada em estudo e pode explicar parcialmente os sinérgismos dos extratos de própolis com outras drogas que agem inibindo a síntese de proteínas (FERNANDES JUNIOR, 2005).

Tendo em vista a existência de bactérias cada vez mais resistentes aos diversos antimicrobianos, o sinérgismo relatado em algumas pesquisas demonstra grande importância e reafirma que as própolis podem constituir fontes de tratamentos auxiliares contra micro-organismos resistentes aos antibacterianos já existentes.

2.4.2 Câncer e atividade antiproliferativa

O câncer é considerado “um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Ao se dividirem rapidamente, essas células provocam a formação de tumores malignos e podem se espalhar para outras partes do corpo, no processo conhecido como metástase” (INCA, 2012).

Esta doença tem causado grande preocupação no Brasil pela relevância do seu perfil epidemiológico, o que faz com que este tema conquiste cada vez mais espaço, pois o conhecimento sobre a sua incidência no país fornece respaldo para que sejam tomadas providências a seu respeito (SECRETARIA DA SAÚDE, 2012).

O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estimou cerca de 520 mil novos casos de câncer no Brasil no ano de 2012, e estes dados seriam válidos também para 2013 (SECRETARIA DA SAÚDE, 2012). Em escala mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) projetou um número de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 e 17 milhões de mortes devido a tal doença. Os países em desenvolvimento foram citados como os mais suscetíveis, entre eles o Brasil (SECRETARIA DA SAÚDE, 2012).

Tendo em vista a importância deste contexto, as pesquisas relativas à descoberta de novas drogas anticâncer também têm crescido. A respeito disto, os ensaios com modelo *in vitro* constituem formas rápidas e eficazes de se estudarem os produtos naturais ou moléculas sintéticas, fornecendo uma triagem para futuros testes *in vivo*. Estas metodologias estão relacionadas à toxicidade da amostra em estudo, verificando seu potencial para matar células neoplásicas em cultura e correlacionando a sua concentração-teste com a resposta seletiva para determinada célula tumoral (CHABNER; ROBERTS Jr, 2005). Assim, a denominação mais adequada para estes ensaios seria “avaliação de atividade antiproliferativa”, uma vez que investigam o potencial da amostra em impedir que as células tumorais continuem se proliferando.

Neste sentido, as própolis têm sido documentadas quanto aos compostos delas isolados. Dentre eles, derivados de ácido cinâmico e alguns terpenoides foram relatados como detentores de atividade antiproliferativa (KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010). Menezes (2005) também cita a ação inibitória de diterpenos e flavonoides sobre hepatocarcinoma humano.

Em outro trabalho, a crisina (flavonoide isolado da própolis, Figura 6) mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma C6 de rato, nas quais as células se mantiveram estacionadas na fase G1 do ciclo celular (MENEZES, 2005). Compostos hidrossolúveis da própolis, bem como seus componentes fenólicos (ácido cafeico, quercetina, crisina, naringenina), também puderam ser isolados e avaliados, chegando-se a conclusão de que atuam de forma sinérgica, potencializando a atividade de drogas conhecidas, inibindo assim o desenvolvimento de tumores acíticos de Ehrlich (ORSOLIC; KOSALEC; BASIC, 2005).

BANSKOTA et al (2002) realizaram um estudo com extrato metanólico de própolis da Holanda e verificaram que o mesmo teve uma atividade antiproliferativa interessante contra células do cólon, provenientes de metástase com origem no fígado (carcinoma L5-26) com um valor de EC_{50} de 3,5 µg/mL.

Estes e outros trabalhos fornecem informações que sustentam a hipótese de que as própolis têm potencial para inibir o crescimento de células tumorais, gerando,

assim, um incentivo para que haja estudos com tipos de própolis ainda não exploradas neste âmbito.

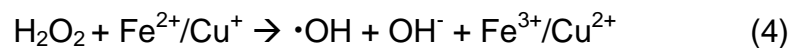
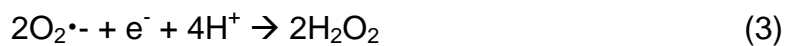
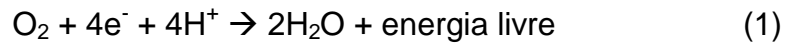
2.4.3 Radicais livres e atividades antioxidantes

Radicaís livres são átomos, moléculas orgânicas e inorgânicas, com existência independente, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Geralmente, são muito instáveis e altamente reativos. Ao reagirem com uma molécula, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia. Devido a isto, possuem uma vida muito curta (MARZZOCO; TORRES, 2007). Entre eles, as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em muitos processos degenerativos do organismo, pois são ou originam os radicais livres (HALIWELL et al, 1995).

Tais radicais podem ser gerados a partir de fontes externas ao organismo vivo, tais como luz ultravioleta, raios X e raios gama (GÜLÇIN et al, 2010). Além disso, em processos comuns do próprio organismo, a formação das EROs pode ocorrer em diferentes locais, como citoplasma, mitocôndrias e membrana celular. Ela acontece durante os processos biológicos oxidativos, formadas fisiologicamente a partir de compostos endógenos ou originadas do metabolismo de compostos exógenos. Geralmente ela se dá por ação catalítica de enzimas durante as transferências de elétrons no metabolismo celular (MARZZOCO; TORRES, 2007). A citocromo C oxidase constitui a última enzima das cadeias de transporte de elétrons mitocondriais e catalisa a passagem de elétrons do citocromo C para o oxigênio, formando água. Ao receber elétrons, o oxigênio é reduzido e, neste ponto, pode ocorrer uma redução parcial do oxigênio, que gera radicais livres (Equação 1) (HALIWELL, 2000).

A adição de um elétron ao oxigênio molecular origina o íon superóxido (Equação 2). Este íon, ao reagir com um elétron e adicionado de duas moléculas de água, forma o íon peróxido (Equação 3), processo que é catalisado pela enzima

superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é um oxidante potente e, embora não seja um radical livre, pode originar o radical hidroxila, um dos radicais mais reativos. Isto ocorre por meio da reação do peróxido de hidrogênio com íons ferro ou cobre, processo denominado Reação de Fenton (Equação 4)(HALIWELL, 2000).



O íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila são as chamadas espécies reativas de oxigênio. E a fim de controlar a produção destas espécies, o organismo possui enzimas que atuam na sua eliminação. A ação conjunta da superóxido dismutase e da catalase convertem o superóxido em água. Outra enzima catalisadora é a glutatona peroxidase, que auxilia na redução do peróxido de hidrogênio e dos peróxidos de lipídeos (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Em condições normais do metabolismo celular, os mecanismos de defesa contra as EROs permitem homeostase. Entretanto, a concentração destas espécies pode aumentar mediante uma maior geração intracelular das mesmas ou pela deficiência dos mecanismos de defesa. Com isso, há um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, causando um estresse oxidativo (MARZZOCO; TORRES, 2007). Isto resulta na indução de danos celulares, como a reação das EROs com proteínas e DNA (alteram as estruturas dos mesmos), bem como com lipídeos (converte-os em peróxidos).

Aprofundando-se nesta última, a peroxidação dos lipídeos consiste em uma série de processos onde ocorre a reação em cadeia de radicais livres com ácidos graxos poli-insaturados. Os hidroperóxidos lipídicos resultantes desta reação podem afetar a fluidez da membrana celular, a função de suas proteínas e causar até mesmo a sua lise, quando as duplas ligações das moléculas dos ácidos graxos pertencentes às membranas têm sua organização rompida. Além disso, os peróxidos de lipídeos geram outros radicais livres. Mediada por ferro, eles sofrem reação de redução e oxigenação, perdendo um elétron e formando o radical peroxila. Ao fim da peroxidação lipídica formam-se aldeídos reativos, como 4-hidroxila nonenal e malondialdeído, que são tóxicos para as células e podem danificar DNA e proteínas (GÜLÇİN et al, 2010).

Diante destes danos resultantes da ação de radicais livres, torna-se importante o uso de antioxidantes. Estes são definidos como substâncias que, em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir uma oxidação de forma eficaz. Isto ocorre por vários mecanismos, sejam eles: a) impedimento da formação dos radicais livres (por exemplo, formação de radical hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio); b) reparo de lesões (causadas pelos radicais livres); c) sequestro dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular (ou por fontes exógenas) e consequente impedimento de seus ataques aos lipídeos, aminoácidos, proteínas, duplas ligações dos ácidos graxos e bases nitrogenadas do DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Desta forma, tem havido um crescente interesse em se pesquisar produtos naturais que contenham fitoquímicos com potencial antioxidante. Assim, vários métodos vêm sendo desenvolvidos para avaliar tal potencial. Ensaio envolvendo diferentes formas de se medir a capacidade antioxidante são realizados, tais como eliminação dos radicais livres; doação de hidrogênio; extinção do oxigênio singlete; quelação de metais ou agindo como substrato para os radicais superóxido ou hidroxila (SARIKAYA et al, 2009). Alguns dos métodos que utilizam estes mecanismos de avaliação estão descritos a seguir.

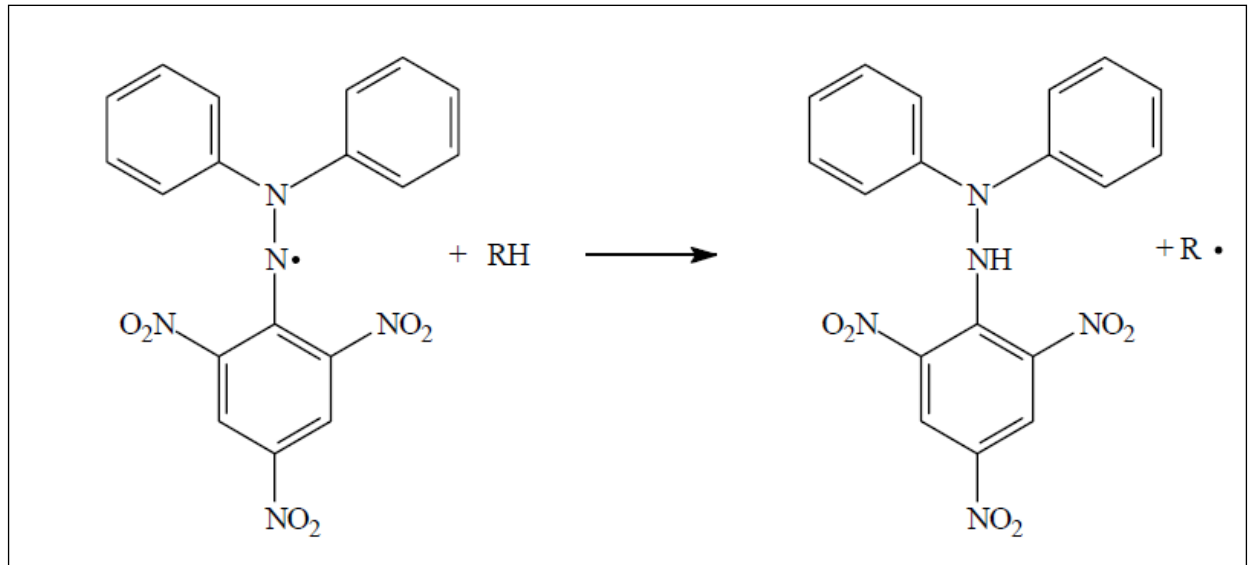
2.4.3.1 DPPH

A capacidade de sequestrar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) tem sido vastamente empregada na avaliação dos extratos de produtos naturais. DPPH é um radical moderadamente estável em diversos valores de pH, com exceção das soluções alcalinas. Normalmente, ele é capaz de se deteriorar lentamente e apenas os antioxidantes que são potentes doadores de hidrogênio podem ter relevância em captar radicais semelhantes ao DPPH fisiologicamente. Desta forma, este método é usado como uma forma geral de se triar compostos que tenham potencial antioxidante (GEORGIEV et al, 2010). Também vem sendo muito usado para mensurar a atividade antioxidante de produtos apícolas (CABRAL et al, 2009).

Como se pode verificar, o teste com DPPH avalia a capacidade de sequestro de radical livre, uma das formas mais eficientes de se inibir a peroxidação lipídica. Além disso, constitui uma técnica simples, rápida, sensível e reprodutível (GÜLÇİN, et al, 2010).

Baseia-se no princípio de que o radical DPPH, originalmente de cor violeta, aceita um elétron (ou um radical hidrogênio) de um componente antioxidante para se tornar uma molécula reduzida, momento este no qual adquire coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido por um elétron doado pelo composto antioxidante (BRAND, CUVELIER, BERSSET, 1995). A reação que ocorre com o radical DPPH e o antioxidante, ou sequestrante, pode ser conferida na Figura 10.

Figura 10 - Reação entre o radical DPPH e uma molécula antioxidante.

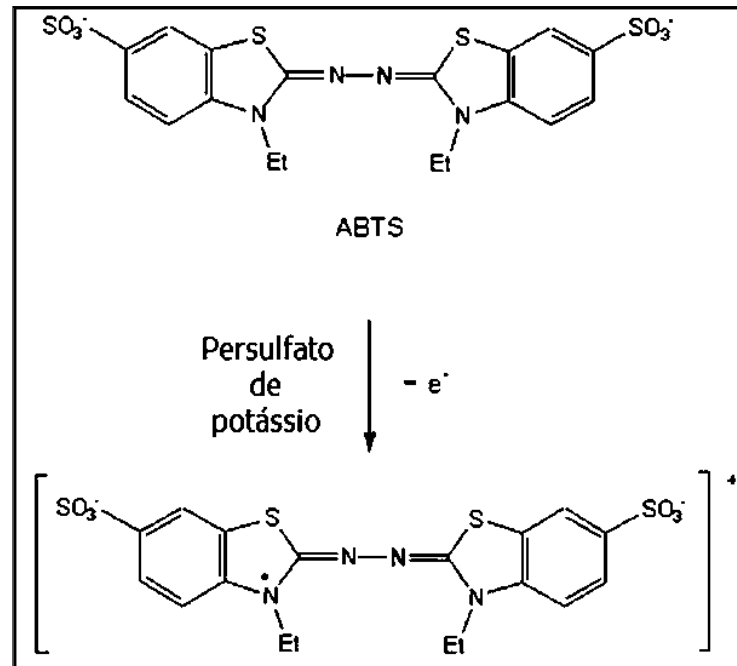


Fonte: OLDONI (2007).

2.4.3.2 ABTS

Assim como o método DPPH, o ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) constitui uma avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres. Entretanto, há algumas diferenças entre estes ensaios, tais como: 1) o ABTS comercial não está pronto para seu uso no teste, como ocorre com o DPPH. Para que o radical seja gerado, o ABTS é oxidado por persulfato de potássio, formando então $ABTS^{\bullet+}$ (Figura 11); 2) o DPPH só pode ser solubilizado em solventes orgânicos (por exemplo, etanol), ao passo que ABTS é solúvel em solventes orgânicos ou em água; 3) o radical $ABTS^{\bullet+}$ reage com qualquer composto que seja aromático hidroxilado, e por isso, pode ocorrer reação com grupos hidroxila que não são relevantes para atividade antioxidante (ARNAO, 2000). Diferente deste, o DPPH não reage com flavonoides que não contenham grupos hidroxila no anel B (vide núcleo básico de um flavonoide, Figura 5), nem com os ácidos aromáticos que têm apenas uma hidroxila (ROGINSK; LISSI, 2005).

Figura 11 - Reação de molécula ABTS com persulfato de potássio para formar o radical ABTS•+.



Fonte: OLDONI (2007).

Em suma, o método ABTS é baseado na capacidade da amostra de doar um elétron para o radical ABTS^{•+}, estabilizando-o e fazendo com que volte novamente à sua molécula original. O radical de coloração azul esverdeada passa a incolor, e este decréscimo de absorção é medido a 734nm (GÜLÇİN et al, 2010).

2.4.3.3 FRAP

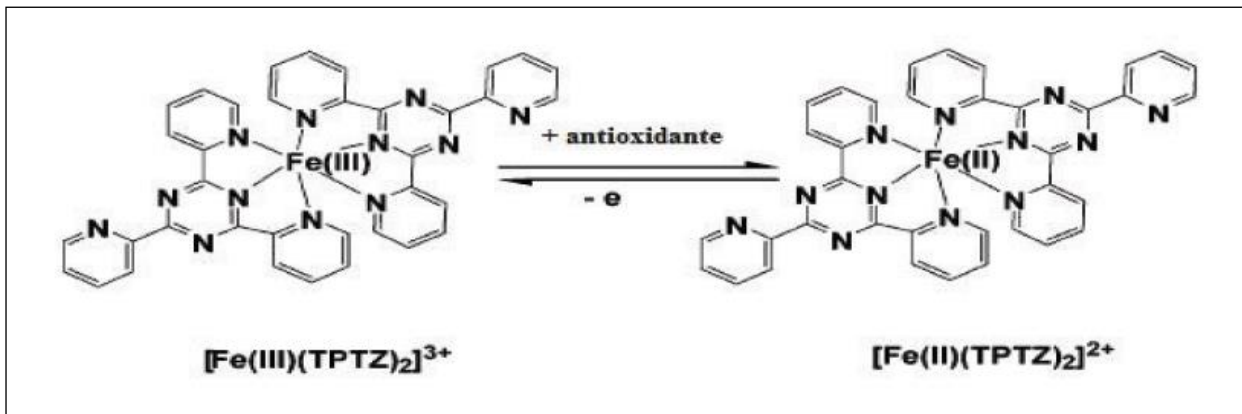
FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um ensaio barato, simples de ser realizado e reprodutível. Assim como ocorre em outros testes de avaliação antioxidante, também se baseia em reações de transferência de elétrons. Entretanto, segundo Sarikaya et al (2009), reflete uma capacidade antioxidante total.

O fundamento deste método se caracteriza por verificar a capacidade que uma determinada amostra teria de reduzir um radical livre (reação redox). Desta

forma, a espécie reativa oxidaria o agente antioxidante em vez de atuar em seus substratos no organismo (lipídeos, DNA, proteínas, etc), conseqüentemente, seria uma forma de evitar danos e lesões causados pelos radicais livres. Portanto, a capacidade antioxidante deste método é referida como poder redutor da amostra em análise (BENZIE; STRAIN, 1996).

Assim sendo, em meio contendo baixo pH, a reação se constitui na redução do TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)-Fe(III), de cor amarelada, a TPTZ-Fe(II), de cor azul intensa (Figura 12). Nesta última é medida a absorbância em espectrofotômetro a 593nm, comprimento de onda no qual TPTZ-Fe(II) tem sua absorção máxima (BENZIE; STRAIN, 1996).

Figura 12 - Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante.



Fonte: HUANG; OU; PRIOR, (2005).

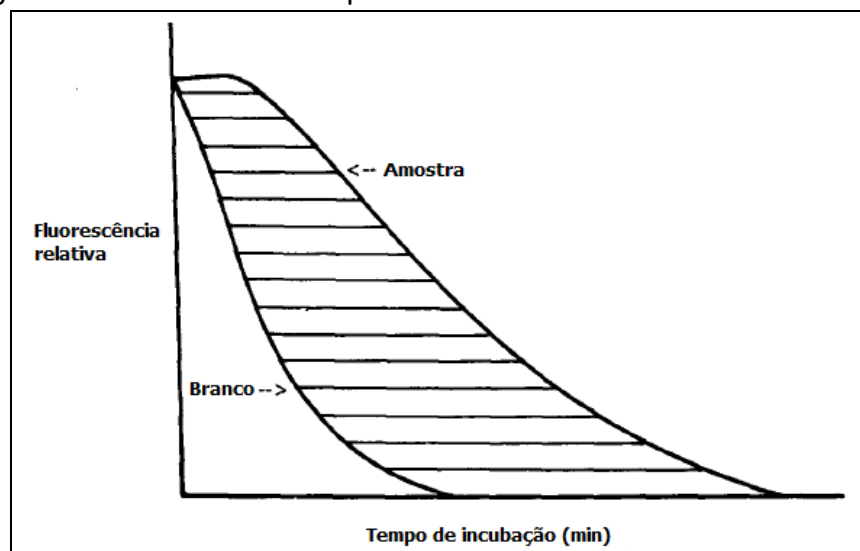
2.4.3.4 ORAC

O ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) tem sido reconhecido como um relevante instrumento para se avaliar o potencial antioxidante de uma amostra (TOMER et al, 2007; CAVAR et al, 2012). É capaz de mensurar a ação de compostos hidrofílicos sobre o radical peroxila e, desta forma, constitui uma forma de se verificar a ação antioxidante sobre uma ERO. Devido a isto, fornece uma estimativa da capacidade das amostras para interromper uma cadeia de ação dos radicais livres e seus produtos tóxicos (GEORGIEV et al, 2010).

Método sensível e confiável, o ORAC se baseia em uma reação de oxidação que envolve a mistura de uma molécula fluorescente e compostos geradores de radicais livres, como os azo-iniciadores. Estes compostos carregam o grupo funcional $R_1-N=N-R_2$, sendo R_1 e R_2 um grupo arila ou um alquila. Eles produzem o radical peroxila depois de serem submetidos ao aquecimento e, neste momento, danificam a molécula fluorescente. Se a amostra em teste for capaz de proteger a molécula fluorescente da ação do azo-iniciador, ela será considerada um bom antioxidante. Isto se mede pelo tempo em que a fluorescência se mantém. Quanto maior o poder antioxidante da amostra, mais íntegra ficará a molécula fluorescente e, conseqüentemente, por mais tempo continuará fluorescendo.

Além disso, ocorre naturalmente uma diminuição da fluorescência da molécula. Por isso, este decaimento deve ser medido com um branco de reagentes (curva obtida sem o antioxidante padrão ou amostra). Este resultado é plotado juntamente com a curva obtida na análise do antioxidante (amostra) e a área entre essas curvas é calculada (Figura 13). Tal área é denominada “AUC net” (do inglês “*Area under the curve*”) (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993; TOMER et al, 2007; GÜLÇİN, et al., 2010).

Figura 13 - Curva utilizada para o cálculo do valor de ORAC.



Fonte: CAO; ALESSIO; CUTLER (1993) - adaptado.

Nota: O valor ORAC é obtido pelo cálculo:

$$\text{ORAC} = (\text{Amostra} - \text{Branco}) / (\text{Trolox} - \text{Branco}).$$

Nos testes ORAC realizados atualmente, emprega-se o AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-midinopropano)) como iniciador da reação e a fluoresceína como molécula fluorescente. Inicialmente, utilizava-se a β -ficoeritrina como componente fluorescente, mas com o tempo ela veio sendo trocada pela fluoresceína, pois esta tem um preço menor e não reage com outros compostos além dos de interesse. Como padrão para o ensaio ORAC é utilizado o Trolox (análogo sintético da vitamina E) e por meio dele também são expressos os resultados (μmol de Trolox por grama de amostra) (TOMER et al, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar própolis produzidas por abelhas sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia* quanto à sua composição química e potencial biológico.

3.2 Objetivo específico

Avaliação das própolis de *Frieseomelitta varia*, coletadas em locais e épocas diferentes, quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa, verificando se as amostras obtidas nas diversas coletas fornecem resultados distintos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta das amostras de própolis de *Frieseomelitta varia*

Esta etapa foi realizada sob a supervisão do Sr. Marcelo Ayres de Araújo, instrutor de apicultura e meliponicultura do SENAR-MG (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural).

As amostras de própolis das abelhas *Frieseomelitta varia* foram obtidas de dois diferentes meliponários nos arredores do município de Alfenas-MG. Em um deles, situado em local com coordenadas geográficas 21° 27' 2.23"S, 46° 0' 7.90"W, foram feitas duas coletas em períodos diferentes. A primeira ocorreu no mês de setembro do ano de 2011 e a segunda em abril de 2012, retiradas de quatro colmeias (caixas identificadas como 1, 2, 3 e 4) (Figura14). As própolis obtidas nestas quatro caixas foram reunidas para constituir uma única amostra, denominada Fv1 na primeira coleta e Fv2 na segunda.

Além destas, houve ainda uma caixa de localização distante das anteriores situada em local com coordenadas geográficas 21° 26' 11.84"S, 45° 56' 14.22" W, da qual a própolis foi retirada somente em abril de 2012 (FvA) por se tratar de colmeia recente (Figura 15).

As coletas foram realizadas raspando-se as própolis nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia, bem como nas paredes das caixas (Figura 16). Após a raspagem, o material coletado foi acondicionado em saco plástico devidamente etiquetado e armazenado em freezer (-8°C) até o momento da sua utilização. Antes do processo de extração, as amostras foram examinadas criteriosamente para a retirada de eventuais impurezas.

Figura 14 - Caixas das abelhas *F. varia* com resina característica depositada sobre suas paredes externas.



Fonte: Próprio autor.

Nota: Fotos 1 a 4 mostram as caixas das quais foram obtidas as amostras de própolis denominadas Fv1 e Fv2. Fotos 5 e 6 mostram detalhes do interior das colmeias.

Figura 15 - Caixa contendo colmeia de onde foi obtida a amostra de própolis denominada FvA.



Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Processo de coleta das amostras de própolis por meio de raspagem das tampas das caixas com espátula.

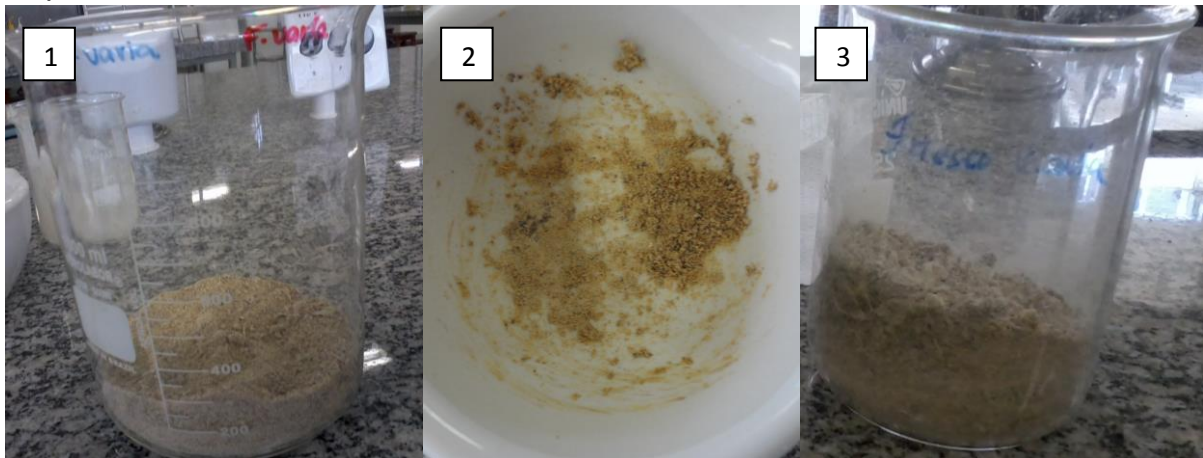


Fonte: Próprio autor.

4.2 Obtenção do extrato etanólico de própolis

Cada uma das própolis brutas (amostras Fv1, Fv2 e FvA) foi submetida a nitrogênio líquido e, imediatamente após, trituradas em gral e pistilo. O aspecto de cada amostra após esta etapa pode ser visualizado na Figura 17.

Figura 17 - Aspecto das própolis de *F. varia* após processo de pulverização em grau e pistilo.



Fonte: Próprio autor.

Nota: As fotos identificadas com os números 1, 2 e 3 se referem às amostras Fv1, FvA e Fv2, respectivamente.

À massa total de própolis triturada se acrescentou etanol 96% (proporção de 15mL de etanol 96% para cada 2g de própolis triturada). Esta mistura foi colocada em banho-maria a 70°C, com agitação, por 30 minutos. Neste período se fez a primeira extração e o extrato obtido foi centrifugado a 8.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante reservado. Ao sedimento desta centrifugação, foi adicionado etanol 96% na proporção de 10mL para cada 2g de sedimento. Esta mistura foi submetida aos mesmos processos de extração e centrifugação descritos anteriormente.

Os sobrenadantes provenientes da primeira e da segunda extração foram reunidos para se obter o extrato etanólico de própolis total. Este foi concentrado em rotaevaporador até que o solvente fosse totalmente evaporado. Após esta etapa, foi ainda submetido à liofilização para a retirada de água eventualmente presente. Ao finalizar este processo, obteve-se, então, o extrato seco de cada amostra de própolis (rendimentos de 60,02%, 58,61% e 65,19% para Fv1, Fv2 e FvA, respectivamente).

4.3 Análises químicas

4.3.1 Espectrofotometria na região ultravioleta visível

Foram preparadas soluções etanólicas (etanol absoluto) com os extratos secos de própolis (Fv1, Fv2 e FvA) na concentração de 200µg/mL. Estas foram submetidas à avaliação da absorção da luz ultravioleta visível nos comprimentos de onda entre 200 a 500nm (T80+UV/Vis Spectromether PG Instruments Ltd, Leicestershire, Inglaterra).

4.3.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos totais foi desenvolvida de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Woisky & Salatino (1998), utilizando o ácido gálico como padrão.

Soluções etanólicas nas concentrações de 2000µg/mL foram preparadas a partir dos extratos secos de própolis (Fv1, Fv2 e FvA). Os testes foram realizados em microplacas incolores de 96 poços. Nestas foram adicionados 20µL de amostra, 100µL do reagente Folin-Ciocalteu em solução aquosa a 10% e 75µL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 4%. O branco foi constituído de 195µL de água destilada. A leitura foi feita a 740nm, após 40 minutos de repouso no escuro e a temperatura ambiente.

Os mesmos procedimentos foram realizados com ácido gálico em solução, nas concentrações de 10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL e 80µg/mL, a fim de se obter uma curva de calibração ($y = 0,0065x + 0,0018$, $R^2 = 0,9998$) a partir da qual a quantidade de fenóis totais nas própolis seria determinada em termos de ácido gálico. Portanto, os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extrato seco de própolis).

4.3.3 Determinação quantitativa de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chang et al (2002) com algumas modificações.

A partir dos extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA foram feitas soluções a 2000µg/mL em etanol e avaliadas por método espectrofotométrico, tomando como padrão a quercetina.

Para a realização dos testes, 0,5mL destas soluções foram misturadas com 4,3mL de etanol 80%, 0,1mL de solução de Al(NO₃)₃ a 10% e 0,1mL de acetato de potássio em solução a 1M. Foi realizada uma série controle paralelamente, onde se utilizou 0,1mL de etanol 80% em substituição ao Al(NO₃)₃. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 415nm. Realizaram-se os mesmos procedimentos com quercetina em solução, nas concentrações de 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL, 50µg/mL e 60µg/mL, a fim de construir curva analítica ($y = 0,0021x + 0,0483$, $R^2 = 0,9997$) e determinar a quantidade de flavonoides presente nas amostras por meio da equação da reta.

Desta forma, os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de extrato seco de própolis).

4.3.4 Cromatografia em camada delgada

Soluções dos extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA foram preparadas em etanol absoluto na concentração de 2µg/ml. Aplicaram-se 5µL destas soluções em placas cromatográficas de alumínio pré-revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel GmbH & Co, Dueren, Alemanha), usadas como fase estacionária.

Avaliaram-se diversas fases móveis comumente utilizadas para análise de própolis, conforme descrição em literatura. Entre elas, estão incluídas: diclorometano e metanol (95:5); éter de petróleo e acetato de etila (70:30); *n*-hexano, acetato de

etila e ácido acético (60:40:30); acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26); etanol e água (55:45).

Os cromatogramas foram visualizados por luz ultravioleta a 254nm e 365nm, bem como por meio de diferentes soluções reveladoras, tais como NP/PEG (solução metanólica com 1% de 2-aminoetil-difenilborato (p/v) + solução etanólica com 5% de polietilenoglicol (p/v)), anisaldeído e vanilina sulfúrica. No cromatograma revelado com esta última solução, também se aplicaram 5µL de soluções a 2µg/ml de amostras de outras própolis de meliponíneos (*Melipona quadrifasciata* e *Melipona bicolor*), cujos extratos foram feitos da mesma forma realizada com as própolis de *F. varia*. Soluções-padrão de quercetina, rutina, cumarina, ácido gálico e ácido ascórbico na concentração de a 1µg/ml também foram empregadas nesta placa.

4.4 Determinação das atividades biológicas

4.4.1 Atividade antimicrobiana

Para os testes de determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados diversos micro-organismos, cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos, que foram gentilmente cedidos pelos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Bacteriologia Clínica e LACEN (Laboratório Central de Análises Clínicas) da Unifal-MG.

4.4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na avaliação da atividade bacteriostática, os extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA foram testados nas concentrações de 1,95µg/mL, 3,9µg/mL, 7,8µg/mL, 15,62µg/mL, 31,25µg/mL, 62,5µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL e

1000µg/mL, preparadas em etanol absoluto. Como controle positivo, utilizou-se o antibiótico Cloranfenicol, nas mesmas concentrações. Também foi feito um controle com o solvente (solução preparada da mesma forma que os extratos, porém em seu lugar colocou-se apenas o solvente), a fim de verificar se o mesmo influenciava no crescimento dos micro-organismos.

Os experimentos foram realizados com cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas provenientes de isolados clínicos (*Serratia marcescens*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus agalactiae* e 8 diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina), bem como de cepas padrão ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus cereus* ATCC 11778).

Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M07-A8 desenvolvido pelo *Clinical Laboratories Standardization Institute* (CLSI, 2009).

Desta forma, em microplacas de 96 poços, foram colocados 50µL de caldo Müeller-Hinton em cada compartimento, testando-se cada concentração de amostra/padrão em triplicata. Adicionaram-se 50µL das soluções dos extratos/Cloranfenicol e foram realizadas as diluições subsequentes. Por fim, acrescentaram-se 50µL da suspensão bacteriana, preparada em solução salina a partir de cultura recente. A turbidez desta suspensão deveria estar de acordo com a escala 0,5 de MacFarland e isto foi mensurado em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660nm.

As microplacas foram levadas à estufa bacteriológica a 35°C, com o tempo de incubação variando conforme a cepa em teste.

Na avaliação da atividade fungistática, utilizou-se a microdiluição em caldo segundo o protocolo M27-A2 (CLSI, 2008), com modificações. A ação dos extratos Fv1, Fv2 e FvA foi verificada contra a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Neste ensaio, utilizou-se a Anfotericina B como controle positivo nas concentrações de 0,19µg/mL, 0,39µg/mL, 0,78µg/mL, 1,56µg/mL, 3,12µg/mL, 6,25µg/mL, 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. As amostras, no entanto, foram

avaliadas nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de determinação da atividade bacteriostática. O controle do solvente também foi feito.

Os mesmos procedimentos realizados nos testes antibacterianos foram realizados na avaliação da atividade antifúngica. Exceção ocorreu em relação ao meio de cultura, pois empregou o caldo Müeller-Hinton adicionado de 2% de extrato de levedura. A leitura do teste foi realizada após 48h de incubação.

Considerou-se como CIM a faixa de concentração com menor valor, na qual não foi detectado o crescimento microbiano. Tal crescimento foi visualizado com o auxílio do revelador resazurina, conforme indicam alguns autores (SARKER; NAHARB; KUMARASAMYC, 2007; MANN; MARKHAM, 1998). A solução de resazurina (Sigma Aldrich®) foi preparada dissolvendo 10mg em 400mL de água destilada. Para a revelação das placas, adicionaram-se 50µL da mesma em cada poço da microplaca e após 2 horas de incubação (na mesma temperatura usada no ensaio) foi feita a leitura. Os poços que estavam com a cor rosa indicavam que houve crescimento microbiano e, com a cor azul, a ausência dele.

4.4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Baseando-se nos resultados obtidos no teste de CIM, as suspensões provenientes dos poços em que não houve crescimento microbiano foram utilizadas para avaliar a atividade microcida. Desta forma, 10µL destas suspensões foram inoculadas em placas de ágar Müeller Hinton (nos testes com bactérias) e ágar Sabouraud (nos testes com fungo), em triplicata, e incubadas a 35°C por 24h. As concentrações bactericida e fungicida mínimas foram consideradas como a menor concentração das frações testadas que não permitiu crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado, ou seja, 99,9% de morte microbiana.

4.4.2 Atividades antioxidantes

4.4.2.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009), com modificações. Em microplacas incolores de 96 poços, a mistura de reação se constituiu em 66µL da amostra/padrão e 134µL do radical DPPH a 0,15 mM. Incubou-se esta mistura por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este período, a leitura foi realizada a 517nm em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices).

As amostras constituíram em soluções etanólicas a 3000µg/mL preparadas a partir dos extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA.

Foi realizada curva analítica com o padrão Trolox (análogo sintético da vitamina E) nas concentrações de 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM e 100µM ($y = -0.0034x + 0.5065$, $R^2 = 0,9971$).

O controle negativo foi realizado substituindo o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

A atividade antirradical foi determinada na forma de Atividade Antioxidante (AA), pela equação (5):

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ab = absorvância do branco

Ac = absorvância do controle negativo

4.4.2.2 Atividade sequestrante do radical ABTS

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009), com algumas modificações. Os testes foram realizados em microplacas incolores de 96 poços.

O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi produzido pela reação da solução aquosa de ABTS a 7mM com persulfato de potássio a 140mM. Esta mistura foi armazenada por 12 a 16h antes da sua utilização, no escuro e à temperatura ambiente. No momento da realização do ensaio, esta solução foi diluída até se obter uma absorbância de 0,7 a 730nm. A solução-teste, nas microplacas, foi constituída por 220 μ L desta solução e 20 μ L da solução da amostra (soluções etanólicas dos extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA na concentração de 400 μ g/mL) ou do padrão. Após 6 minutos do preparo desta mistura, a leitura foi feita a 730nm em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices). O branco do teste foi a solução tampão fosfato.

Como padrão, utilizou-se o Trolox construindo curva analítica ($y = -0,0015x + 0,3674$, $R^2 = 0,997$) com as concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M. Desta forma, os resultados de atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos como equivalente Trolox (μ M de Trolox/g de extrato seco de própolis).

4.4.2.3 Potencial de redução de Ferro (FRAP)

Este ensaio foi feito em microescala, uma adaptação do método descrito por Griffin e Bhagooli (2004). Nas microplacas incolores de 96 poços foram adicionados 20 μ L da amostra/padrão, 30 μ L de água destilada e 200 μ L do reagente FRAP. Esta mistura foi incubada a 37°C por 8 minutos. Após este tempo, a absorbância foi lida a 595nm de comprimento de onda em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices).

As amostras foram constituídas por soluções etanólicas preparadas a partir dos extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA, na concentração de 3200 μ g/mL.

Utilizou-se como padrão o sulfato ferroso para construir uma curva analítica ($y = 0,0013x - 0,0285$, $R^2 = 0,9995$) com as concentrações de 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M e 600 μ M.

O reagente FRAP foi preparado usando a proporção de 1:1:10 partes de cloreto férrico (solução a 20mM, preparada em água destilada), 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (solução a 10mM, preparada em ácido clorídrico a 40mM) e tampão acetato (mistura de acetato de sódio e ácido acético glacial, pH 3,6), respectivamente. O branco do teste foi preparado com o 20 μ L de etanol, 30 μ L de água destilada e 200 μ L do reagente FRAP.

Os resultados foram expressos em equivalente sulfato ferroso (μ M Fe^{2+} /g de extrato seco de própolis).

4.4.2.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O método ORAC utilizado aqui foi uma adaptação daquele descrito por Chisté et al (2011).

Utilizaram-se microplacas opacas com 96 poços. A solução-teste foi constituída de 30 μ L de amostra/padrão, 60 μ L de fluoresceína (na concentração de 4,066mM, preparada em tampão-fosfato pH 7,4) e 110 μ L de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) na concentração de 76nM, preparada em tampão-fosfato pH 7,4). O branco do teste foi apenas 200 μ L de tampão de fosfato. Um controle foi feito com 30 μ L de tampão fosfato, 60 μ L de fluoresceína e 110 μ L de AAPH. As leituras foram feitas em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, dispositivos moleculares), em condições específicas de temperatura (37°C), tempo (2 horas de incubação) e fluorescência (excitação 485nm, emissão 528nm).

As amostras foram testadas na concentração de 100 μ g/mL. Estas constituíram diluições feitas em tampão fosfato pH7,4 a partir de soluções etanólicas preparadas com os extratos secos de Fv1, Fv2 e FvA, na concentração de 1000 μ g/mL.

Trolox foi o padrão do teste e uma curva analítica ($y = 35721x + 896887$, $R^2 = 0,9918$) foi feita nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 400 μ M. A proteção fornecida pelos extratos (ou padrão) foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo software, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica e os resultados de atividade antioxidante foram, então, expressos em equivalente Trolox (μ mol de Trolox/g de extrato seco de própolis).

4.4.3 Atividade antiproliferativa

O extrato etanólico de própolis foi avaliado quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da Sulforodamina B (SRB) para avaliação do crescimento celular de acordo com Monks et al (1991).

Empregaram-se oito linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem de célula humana normal imortalizada (queratinócito) (Tabela 1). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo National Cancer Institute e mantidas no laboratório de cultura de células do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA/UNICAMP, Paulínia-SP, onde foram realizados os ensaios, em frascos de 25cm³ com 5mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24h desta incubação, foram adicionados 100 μ L da suspensão de células, numa densidade de 3x10⁴ e 6,5x10⁴ cel/mL, em cada compartimento das microplacas de 96 compartimentos. Estas suspensões foram adicionadas nas placas contendo meio RPMI/SFB acrescido de 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina previamente. As amostras (extratos secos de própolis, Fv1, Fv2 e FvA) foram testadas em quatro concentrações distintas de 0,25 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 25 μ g/mL e 250 μ g/mL.

Tabela 1- Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária
U251	SNC; glioma	Ectoderme
HaCat ¹	Queratinócito humano	Ectoderme
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES ²	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme
K-562	Leucemia;	Endoderme

Nota: ¹ linhagem cedida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

² linhagem com resistência a múltiplos fármacos.

Para a preparação das amostras, uma alíquota de 10mg do extrato seco foi dissolvido em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50µL dessa solução-mãe foi disperso em 950µL de meio RPMI/ 5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para a obtenção das concentrações finais de 0,25µg/mL; 2,5µg/mL; 2 µg/mL e 250µg/mL.

Como controle positivo, foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025µg/mL; 0,25µg/mL; 2,5µg/mL e 25µg/mL. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T₀, que permitiu determinar a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio de cultura, SFB e metabólitos secundários.

Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético a 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração do extrato, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas:

- Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular;
- Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$;
- Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$;

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula;

T₁ = absorbância do branco de células;

T₀ = absorbância do controle de células na placa T₀.

Os gráficos da porcentagem de crescimento em função da concentração do extrato foram gerados para cada uma das linhagens testadas. TGI (do inglês *total growth inhibition*), concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular, foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

4.5 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados de atividades antioxidantes, quantificação total de compostos fenólicos e flavonoides foram

expressos como média \pm desvio padrão. Estes foram avaliados por Análise de Variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott em nível de 95% de confiança, software Sisvar 5.3 (Sistema de Análise de Variância).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigação da composição química

5.1.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

Comparando-se os espectros de absorção da luz UV, entre Fv1 e Fv2 não foi encontrada diferença significativa. FvA demonstrou um perfil semelhante a estas amostras, porém seus picos tiveram menor intensidade (os espectros de absorção podem ser visualizados na Figura 18).

Não há ainda uma legislação específica para própolis de meliponíneos que descreva os aspectos físico-químicos fundamentais das mesmas. Desta forma, atualmente é seguida a Instrução Normativa nº3 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que regulamenta produtos de *Apis mellifera*, entre eles própolis e seu extrato. Esta determina que o espectro de absorção da radiação UV-visível do extrato de própolis deve apresentar picos característicos das principais classes de flavonoides, o que ocorre entre os comprimentos de onda 200nm e 400nm. Este é considerado um requisito físico-químico para este produto, no caso de abelhas melíferas, mediante o regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis.

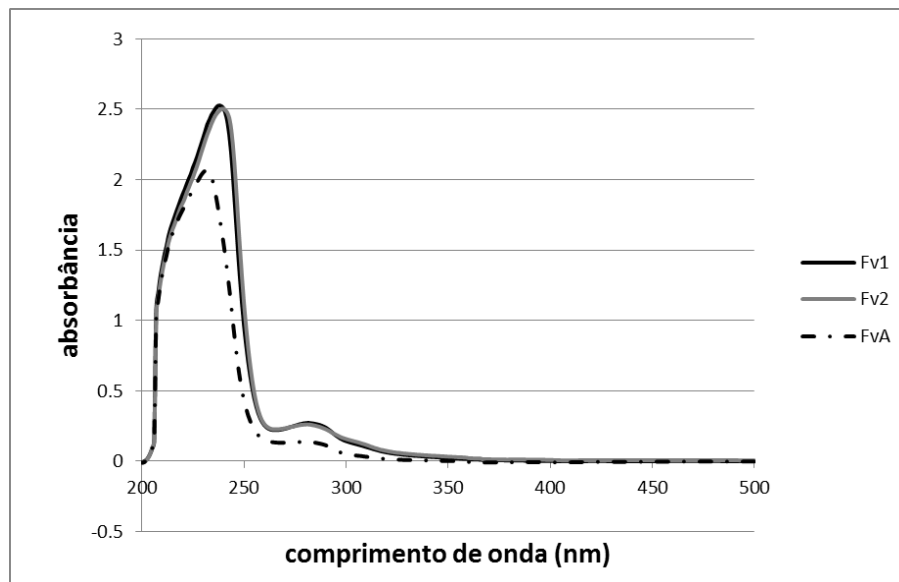
Segundo Mabry, Markham e Thomas (1970), na faixa de comprimento de onda entre 220 e 350nm ocorre a absorção da luz UV pelos compostos fenólicos. Entre estes também se encontram os flavonoides, porém de uma forma específica, descrevem sua ocorrência na faixa de 281 a 284nm.

Diante do exposto, pode-se inferir que foram detectados picos de absorção típicos para fenólicos totais e flavonoides nas própolis de *F. varia*. Quanto aos fenólicos, houve um máximo de absorção nos comprimentos de onda 238nm, 240nm e 233nm para Fv1, Fv2 e FvA, respectivamente. No que diz respeito aos flavonoides, verificaram-se picos em todas as amostras. Seus pontos máximos

ocorreram em 281nm para Fv1 e Fv2. No extrato FvA, este máximo ocorreu em 280nm.

A absorção da luz UV por eles apresentada é, conhecidamente, devido à presença das duplas ligações entre os carbonos encontrados nos anéis aromáticos em suas estruturas químicas (MARKHAM, 1982). Deve-se salientar que apesar de terem sido obtidos espectros contendo picos de absorção máxima em comprimentos de onda previstos para fenólicos e flavonoides, isto não reflete somente a presença destas classes químicas. Isto se sustenta, pois outros compostos químicos podem conter anéis aromáticos ou insaturações, no mínimo duas, que também promovam a absorção da luz ultravioleta. Desta forma, acrescentando informações à respeito da composição química das própolis de *F. varia*, realizaram-se testes espectrofotométricos quantitativos para fenólicos e flavonoides, descritos nos tópicos 5.1.2 e 5.1.3.

Figura 18 - Espectros de absorção da luz ultravioleta visível obtidos nas análises das amostras Fv1, Fv2 e FvA.



Nota: As soluções das amostras foram preparadas na concentração de 200µg/mL.

5.1.2 Conteúdo de compostos fenólicos

Os resultados mostraram que as amostras Fv1, Fv2 e FvA se diferiram ($p=0,0356$) quanto ao conteúdo de fenólicos com base em ácido gálico (os valores médios encontrados estão dispostos na Tabela 2).

Tabela 2 - Médias das quantificações de compostos fenólicos em extratos secos (Fv1, Fv2 e FvA) de própolis produzidas pelas abelhas *Frieseomelitta varia*.

Amostra	Fenólicos (mg ácido gálico/g de extrato seco de própolis \pm desvio padrão)*
FvA	18,37 \pm 0,35 ^a
Fv1	16,32 \pm 1,51 ^b
Fv2	15,50 \pm 0,89 ^b

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($\alpha=0,05$).

Como se pode observar na Tabela 2, as própolis obtidas em locais diferentes mostraram quantidades divergentes de fenólicos. O maior conteúdo destes foi verificado em FvA. Originárias de um mesmo local, Fv1 e Fv2 não se diferenciaram na quantidade dos polifenóis, ainda que não tenham sido coletadas em um mesmo período do ano.

Avaliando os resultados de forma geral, verifica-se que foram detectadas baixas quantidades de compostos fenólicos nestas própolis. Se forem confrontadas com os valores obtidos em outros tipos de própolis do Brasil, bem como de outros países, nota-se que comumente ultrapassam 100mg de ácido gálico/amostra (GÜLÇİN et al, 2010; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2011; SILVA et al, 2011; MAVRI et al, 2012).

Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), trabalhando com própolis de origens diversas, verificaram que em extratos etanólicos de própolis brasileiras houve uma baixa quantidade de fenólicos, diferente do que ocorreu com própolis chinesa e europeia, nas quais geralmente se encontra grande quantidade dos

mesmos. Em tal pesquisa, mostraram ainda que paralelamente a uma baixa quantidade de polifenóis totais, obtinham baixos valores de absorvidade para estas mesmas própolis no espectro de absorção da luz UV-visível. Esta informação está de acordo com os achados aqui obtidos na avaliação das própolis de *F. varia*.

Dependendo do processo de extração ao qual a amostra é submetida e dos solventes utilizados, um incremento na quantidade de compostos fenólicos pode ser alcançado. Isto ocorre, por exemplo, quando se usa uma mistura hidro alcoólica nas proporções de 70:30 ou 80:20 (etanol:água, v/v) como solvente (MAVRI et al., 2012). Mas em casos como o da própolis de *F. varia*, acredita-se que seria possível apenas um pequeno aumento, visto que a própria vegetação dos locais onde as colmeias estavam podem ter fornecido maiores quantidades de outros compostos fitoquímicos em detrimento dos fenólicos. Nas proximidades das colmeias de onde se obtiveram Fv1 e Fv2, encontraram-se muitos pinheiros (*Pinus* sp), cuja composição é majoritariamente composta por óleos essenciais. Com relação à FvA, vegetação mais diversificada pode ser observada.

Entretanto, independente de outros fatores, a quantificação destes compostos é comum entre os diversos tipos de própolis e vem sendo correlacionada às atividades biológicas, sobretudo a antioxidante. Em muitos casos, chegou-se a considerar que eles foram os principais responsáveis por tal atividade (CABRAL et al, 2009). Por outro lado, há casos em que isto não ocorre, mostrando que nem sempre se pode considerar esta relação (YANG et al, 2011). O mesmo pode ser estendido para atividade antimicrobiana, que também já foi considerada de pouca relação com fenólicos (CABRAL et al, 2009).

5.1.3 Conteúdo de flavonoides

Como exposto anteriormente, a averiguação da presença e da quantidade de flavonoides em própolis é esperada e regulamentada como requisito de identidade e qualidade de própolis de abelhas africanizadas. Por este motivo, torna-se interessante avaliar a composição das própolis de abelhas sem ferrão neste âmbito.

Assim, a avaliação do conteúdo de flavonoides foi realizada nos extratos de própolis de *F. varia* e ela revelou baixas quantidades dos mesmos em todas as amostras. Entretanto, detectaram-se diferenças entre os extratos ($p < 0,001$), sendo os maiores valores encontrados em Fv1 e Fv2 (dados apresentados na Tabela 3). Estes apresentaram resultados diferentes de FvA, porém iguais entre si. Tais dados corroboram com as informações encontradas nos outros testes relacionados a flavonoides, como UV-visível e fenólicos totais, confirmando sua quantificação reduzida. Entretanto, é relevante notar que os valores aqui encontrados são em relação a um único tipo de flavonoide, a quercetina, não excluindo a possibilidade de haver nestas própolis a presença de outros componentes de tal classe fitoquímica.

Tabela 3 - Médias das quantificações de flavonoides em extratos secos (Fv1, Fv2 e FvA) de própolis produzidas pelas abelhas *Frieseomelitta varia*.

Amostra	Flavonoides (mg quercetina/g de extrato seco de própolis \pm desvio padrão)
Fv1	7,38 \pm 0,75 ^a
Fv2	8,98 \pm 1,04 ^a
FvA	3,24 \pm 0,32 ^b

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

Sobre os valores frequentemente encontrados em outras própolis, Righi et al. (2011) afirmam que as própolis dos países da América do Sul contêm flavonoides em quantidades que vão de 3 a 55mg de quercetina/g de própolis. Na própolis vermelha brasileira, estes mesmos autores alegam que 32,91mg de quercetina/g de própolis foram quantificados e nas própolis europeias chegaram a 223mg de quercetina/g de própolis.

Assim como ocorre com os compostos fenólicos, comumente, uma correlação positiva é verificada entre o conteúdo de flavonoides e as atividades biológicas. Porém, apesar das baixas quantidades de compostos fenólicos e flavonoides nas própolis tropicais, outros compostos químicos as constituem e atividades biológicas interessantes podem ser encontradas.

5.1.4 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um teste que permite obter informações sobre uma amostra em pouco tempo, sendo necessárias pequenas quantidades das mesmas, além de ter um custo reduzido. Assim, na avaliação dos perfis químicos dos extratos de própolis de *F. varia* por CCD, diversas fases móveis foram usadas. Dentre elas, a mistura de etanol e água (55:45, v/v) foi a única que permitiu eluição adequada das amostras. Uma vez selecionada esta fase móvel, realizaram-se várias outras corridas cromatográficas e em cada cromatograma foi utilizado um determinado revelador.

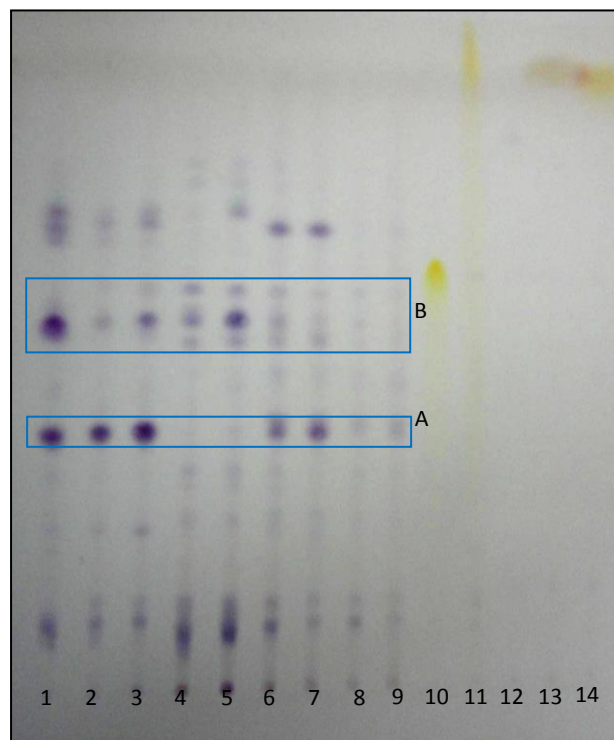
Como na composição de própolis frequentemente se encontram flavonoides, usou-se o revelador NP/PEG, indicado para sua detecção segundo Wagner e Bladt (1996). Se houvesse manchas amarelas na placa visualizada sob luz UV a 365nm, conferir-se-ia presença de flavonoides. Entretanto, não foi possível detectá-las nas amostras Fv1, Fv2 e FvA. Isto provavelmente ocorreu devido às quantidades muito reduzidas dos flavonoides nas mesmas.

A vanilina sulfúrica, por outro lado, é um revelador amplamente utilizado na visualização de cromatogramas quando se analisam produtos naturais. Desta forma, ele também foi empregado e, após a nebulização com o mesmo, a placa foi aquecida durante 10 minutos em estufa na temperatura de 100°C e, em seguida, houve o aparecimento de manchas de cor violeta. A título de curiosidade e complementação das informações sobre própolis de abelhas sem ferrão, as amostras Fv1, Fv2 e FvA foram analisadas, nesta corrida cromatográfica, em conjunto com própolis de meliponíneos de outras espécies (*Melipona bicolor* e *Melipona quadrifasciata*, também provenientes de locais e épocas diferentes) e com alguns padrões, entre eles quercetina, rutina, cumarina, ácido gálico e ácido ascórbico.

Como se pode notar na Figura 19, as própolis de *F. varia* e das outras espécies de meliponíneos não apresentaram semelhança aos padrões, tanto com relação às cores das manchas quanto aos valores de R_f, que foram de 0,63 (quercetina), 0,9(rutina), 0,88(cumarina), 0,888 (ácido gálico) e 0,88(ácido

ascórbico). Por outro lado, as própolis apresentaram semelhança nos seus perfis, com manchas de cor violeta, indicando presença de terpenoides. Entre as amostras Fv1, Fv2 e FvA, bem como entre estas e as de outros meliponíneos, verificou-se mesmo valor de Rf em alguns pontos, alterando apenas a sua intensidade. Estas estão demarcadas na Figura 19, como A (Rf = 0,38) e B (de forma ascendente, Rf 0,53; 0,56 e 0,61). Uma vez que estas manchas tiveram valores de Rf inferiores ao da quercetina, pode-se inferir que os terpenoides presentes nestas própolis são bastante polares, possivelmente glicosilados.

Figura 19 - Cromatograma contendo diferentes amostras de meliponíneos e padrões.



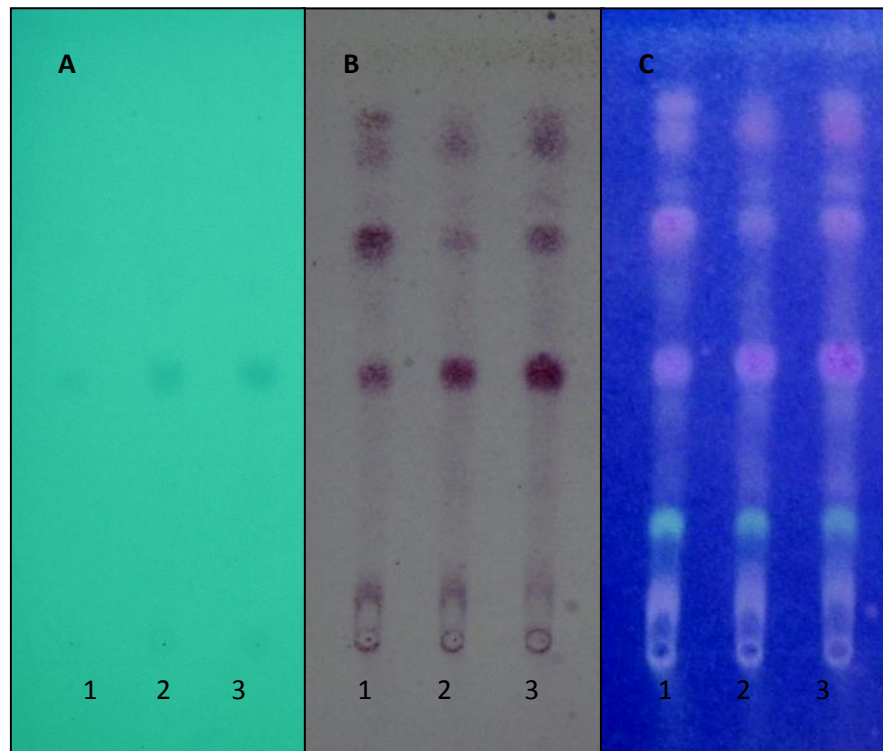
Nota: 1(FvA), 2(Fv1), 3(Fv2), 4(*Melipona bicolor*, amostra1), 5(*Melipona bicolor*, amostra 2), 6(*Melipona quadrifasciata*, amostra1, Alfenas), 7(*Melipona quadrifasciata*, amostra 2, Alfenas), 8 (*Melipona quadrifasciata*, amostra1, Fama), 9(*Melipona quadrifasciata*, amostra 2, Fama), 10(padão quercetina), 11(padão rutina), 12 (padão cumarina), 13 (padão ácido gálico) e 14 (padão ácido ascórbico). As áreas em destaque (A e B) demarcam as semelhanças encontradas entre as própolis. FE: Sílica gel 60, F₂₅₄. FM: etanol e água (55: 45, v/v). Revelação: vanilina sulfúrica com aquecimento a 110°C, 10min.

Pode-se observar, que o perfil químico das própolis produzidas pelas abelhas *F. varia* e *M. quadrifasciata* foram semelhantes, com manchas de mesmo Rf em vários pontos. A respeito disto, Velikova et al (2000) analisaram própolis de 12 diferentes espécies de meliponíneos e verificaram que a composição química das mesmas não mostrava grande variação. Seus constituintes se delimitaram em classes como diterpenos e triterpenos. Isto ocorreu independente da espécie que as produziam e da região em que eram coletadas. A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de origens diversas, analisadas por Dutra et al (2008) também apresentou CCD com manchas semelhantes as encontradas no presente trabalho. Em suas amostras havia presença de compostos fenólicos, triterpenos e saponinas. A quantidade ou presença destes dois últimos variaram entre as diferentes amostras, mas o perfil cromatográfico foi semelhante entre elas. Estes achados corroboram com aqueles aqui encontrados.

Segundo Wagner e Bladt (1996), a vanilina é capaz de detectar compostos terpênicos e fenilpropanoides, que geralmente compõem óleos essenciais das plantas. Balestrin (2006) afirma que manchas sutilmente violetas obtidas nas placas cromatográficas quando reveladas com vanilina sulfúrica refletiram presença de triterpenos, uma classe de terpenoides então analisada. Estas informações levam a suspeita da presença de compostos desta classe nas amostras de *F. varia* aqui analisadas.

Além dos reveladores mencionados anteriormente, em uma das placas cromatográficas também se usou o anisaldeído sulfúrico. Após a nebulização com este, tais placas foram submetidas ao aquecimento a 110°C por 10 minutos. Este revelador também pode fornecer um indicativo da presença de terpenoides nas amostras quando são alcançadas manchas avermelhadas após aquecimento, fato que ocorreu neste trabalho como pode ser visto na Figura 20. Além disso, manchas semelhantes e com o mesmo valor de Rf foram detectadas, da mesma forma que ocorreu no cromatograma visualizado com vanilina sulfúrica. Estes resultados revelaram, portanto, que as amostras de própolis de *F. varia* coletadas em locais e tempos diferentes mostraram perfis químicos semelhantes, com indicativo da presença de terpenoides.

Figura 20 - Placa cromatográfica contendo amostras de *F. varia*.



Nota: Os números 1, 2 e 3 se referem às amostras FvA, Fv1 e Fv2, respectivamente. FE: Sílica gel 60, F₂₅₄. FM: etanol e água (55: 45, v/v). A – placa sob luz UV a 254nm. B – placa reveladas com anisaldeído sulfúrico com aquecimento. As manchas avermelhadas foram visualmente observadas após a revelação. C - placa sob luz UV a 365nm.

Autores também constataram que geoprópolis, obtida de abelhas sem ferrão do estado do Maranhão, é rica em substâncias químicas das classes dos compostos fenólicos, mas também dos triterpenos (DUTRA et al, 2008). Bankova et al (1995) concluíram que as própolis brasileiras têm uma baixa concentração de flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos.

Análises mais aprofundadas em adição às feitas por cromatografia em camada delgada são necessárias para confirmar a presença destes compostos. Neste aspecto, a cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) tem sido amplamente utilizada para determinar a composição química de própolis. Em um trabalho realizado por Nunes et al (2009), os resultados de CG-EM demonstraram que os metabólitos secundários majoritários das própolis avaliadas

foram os derivados fenólicos (flavonoides, antraquinonas) e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides), além da presença de açúcares em própolis vermelha.

Sobre meliponíneos e pontualmente o gênero aqui tratado, no estudo realizado por Patricio et al (2002) com três espécies de abelhas do gênero *Frieseomelitta*, foram avaliadas as resinas frescas por elas coletadas, que naturalmente ficavam presas nas tíbias das abelhas. Tais amostras foram analisadas por meio de CG-EM a fim de verificar sua composição química. Os cromatogramas obtidos mostraram presença de monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos. Quanto à *F. varia*, especificamente coletadas no Rio Grande do Norte, nas abelhas onde havia resina presente nas tíbias, todas estavam compostas por terpenos. Entre eles, os mais abundantes foram os monoterpenos α -pineno e sesquiterpenos α -cubebeno e δ -cadineno. Foram ainda detectados os terpenos β -pineno, canfeno, 3-careno, terpinen-4-ol, α -copaeno, α -gurjuneno, γ -elemeno, simulareno, trans- β -farneseno, α -amorfenol, entre outros. Os resultados por eles encontrados mostraram que as diferentes espécies do gênero *Frieseomelitta* continham diferentes classes de terpenos. No caso da espécie *F. silvestrii* teve um composto isolado, manool, cuja fonte foi comprovadamente o pinheiro amarelo.

Em relação a este tipo de fonte vegetal, sabe-se que o gênero *Pinus* spp produz em seus canais secretores uma oleoresina chamada trementina. Esta possui predominantemente hidrocarbonetos monoterpênicos: (+)- y (-)- α -pinenos, (-)- β -pineno, canfeno, β -felandreno, e sua resina contém principalmente ácidos diterpênicos: ácido (+)-pimárico e ácido abiético (BRUNETON, 2001).

Estas colocações, em conjunto com os dados obtidos em trabalhos científicos, vêm sustentar a hipótese de que havia compostos terpenoides nas amostras de *Frieseomelitta varia* aqui analisadas. Isto se confirma, não somente pelos aspectos obtidos nos cromatogramas, mas também pela característica da vegetação existente nos locais onde as própolis foram coletadas. O meliponário do qual foram obtidas as amostras Fv1 e Fv2, em especial, contém grande quantidade de pinheiros. Ao se manipularem as amostras de própolis, pôde-se perceber o odor característico dos voláteis emitidos pelos *Pinus* spp, principalmente durante a etapa de pulverização das própolis brutas para obtenção do extrato.

5.2 Determinação das atividades biológicas

5.2.1 Atividades antioxidantes

5.2.1.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

Na Tabela 4 estão expressos os dados obtidos na avaliação das amostras, soluções etanólicas dos extratos secos de própolis na concentração 3000 μ g/mL, e do padrão Trolox (60 μ g/mL) pelo método de sequestro do radical DPPH. Segundo os resultados encontrados, houve variação entre Fv1, Fv2 e FvA ($p=0,0025$).

Tabela 4 - Atividade antioxidante pelo método DPPH do padrão Trolox e extratos secos (Fv1, Fv2, FvA) de própolis produzidas pelas abelhas *Frieseomelitta varia*.

Amostras	Atividade Antioxidante (%) \pm desvio padrão*
Padrão Trolox	39,23 \pm 0,30 ^a
Fv1	37,84 \pm 4,22 ^a
Fv2	34,12 \pm 3,04 ^a
FvA	23,11 \pm 0,63 ^b

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($\alpha=0,05$).

Diferentes de FvA, os extratos Fv1 e Fv2 tiveram um maior potencial sequestrante e foram iguais entre si. Além disso, para fins de se comparação, também se verificou que Fv1 e Fv2 mostraram mesmo percentual de atividade que o padrão Trolox quando testadas em uma concentração cinquenta vezes maior que o mesmo. Desta forma, se percebe que as soluções dos extratos devem estar em uma

concentração muito elevada para que seja alcançada uma melhor atividade sequestrante do radical.

Independente da diferença ocorrida entre as própolis provenientes de locais distintos, todos os extratos contiveram uma baixa atividade antioxidante se for considerada a concentração em que foram testados. Isto se confirma por dados observados em outros tipos de própolis, como as produzidas por abelhas *Apis mellifera* e obtidas em Minas Gerais, nas quais foi encontrada atividade antioxidante de 40% em soluções de extratos a 20µg/mL (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Em própolis vermelha brasileira (produzida por *Apis mellifera*), classificada recentemente e cujos estudos começaram há alguns anos, o potencial para sequestrar DPPH foi de 39,12% em amostras a 25µg/mL (RIGHI et al, 2011). Em outros países, Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) reportam que esta porcentagem atingiu valores mais altos, chegando a 80% em alguns tipos de própolis (soluções na concentração de 20µg/mL). Na Argentina, foram encontradas atividades acima de 90% em amostras obtidas em todos os meses do ano em concentrações que variaram de 2,5 a 30µg/mL (ISLA et al, 2009).

Comumente, a relação entre atividade antioxidante e a composição das própolis por fenólicos e flavonoides é realizada. Em uma pesquisa desenvolvida por Siripatrawan, Vitchayakitti e Sanguandeeikul (2012), a atividade sequestrante de DPPH aumentou conforme incremento de compostos fenólicos nas amostras (extrato etanólico de própolis em solução de etanol a 70%) chegando a 94,21% de atividade. Yang et al (2011) afirmam que os estudos por eles realizados demonstram uma contribuição significativa dos compostos fenólicos para a atividade antioxidante de própolis na China. Kalogeropoulos et al (2009) verificaram boa correlação entre os dados obtidos no teste DPPH e conteúdo de polifenóis. Silva et al (2006) também observaram uma correlação positiva de forma generalizada entre conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos de própolis e a atividade sequestrante de DPPH. Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) citam que analisando própolis provenientes de diversos países e as própolis brasileiras puderam concluir que a alta atividade antioxidante nelas observada foi devido à presença de grande quantidade de flavonoides, obtendo alta absorção de UV-visível em comprimentos de onda

característicos para os mesmos, bem como elevadas concentrações de fenólicos totais e conteúdo de flavonoides nos testes quantitativos.

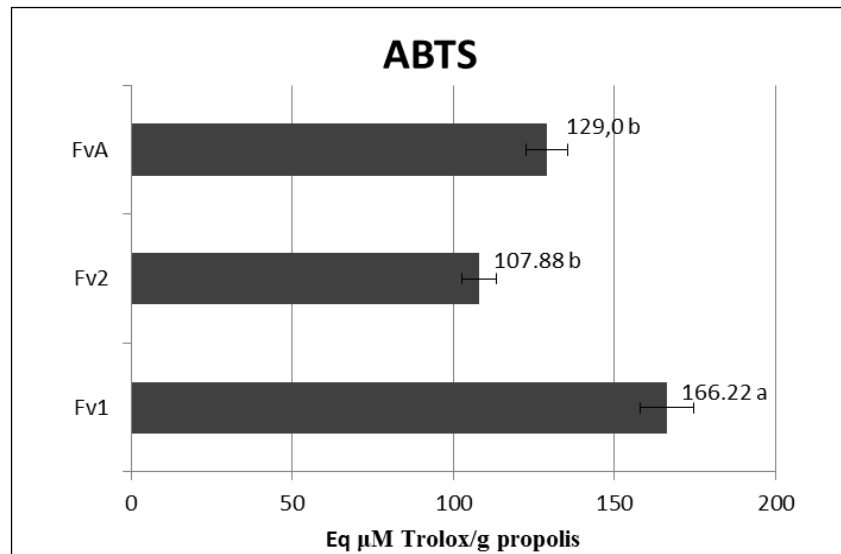
Esta relação encontrada por diversos pesquisadores (quantidade de compostos fenólicos/flavonoides e a intensidade da atividade antioxidante) foi observada nos estudos aqui realizados. Houve absorção baixa no UV-visível quanto aos flavonoides e, nos testes quantitativos, estes e fenólicos foram encontrados em quantidades reduzidas. Acompanhando este perfil, baixa atividade sequestrante do radical DPPH foi detectada.

Ainda envolvendo o estudo de composição química e atividade biológica, Teixeira et al (2008) detectaram um total de 40 compostos em própolis, entre eles encontraram derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, triterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Essas amostras apresentaram principalmente triterpenoides, tinham uma quantidade ínfima de substâncias fenólicas e desempenharam praticamente nenhuma atividade antioxidante. Estes fatores se aproximam das características encontradas nas própolis de *F. varia* e vem sustentar, mais uma vez, a importância dos compostos fenólicos no desempenho antioxidante de um produto natural quanto ao sequestro do radical DPPH.

5.2.1.2 Atividade sequestrante do radical ABTS

Embora os métodos DPPH e ABTS sejam baseados no mesmo princípio, (transferência de elétron da molécula antioxidante para estes radicais) os dados de uma mesma amostra obtidos nestes testes podem se mostrar diferentes (CAVAR et al, 2012). Como se pode observar na Figura 21, isto ocorreu no presente trabalho. No método ABTS, Fv1 conteve atividade antioxidante superior a Fv2 e, por outro lado, no ensaio DPPH ambas as amostras tiveram mesmo potencial antioxidante. A diferença entre as própolis coletadas de locais distintos continuou ocorrendo quando se comparou FvA com Fv1 ($p=0,0163$), mas o mesmo não foi válido quando confrontada com Fv2.

Figura 21- Atividade antioxidante de própolis de *Frieseomelitta varia* pelo ensaio ABTS.



Nota: Os resultados estão expressos em equivalente Trolox (μM de Trolox/g de própolis). Os números inscritos nas barras se referem ao valor médio encontrado e aqueles que estão seguidos de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($\alpha=0.05$).

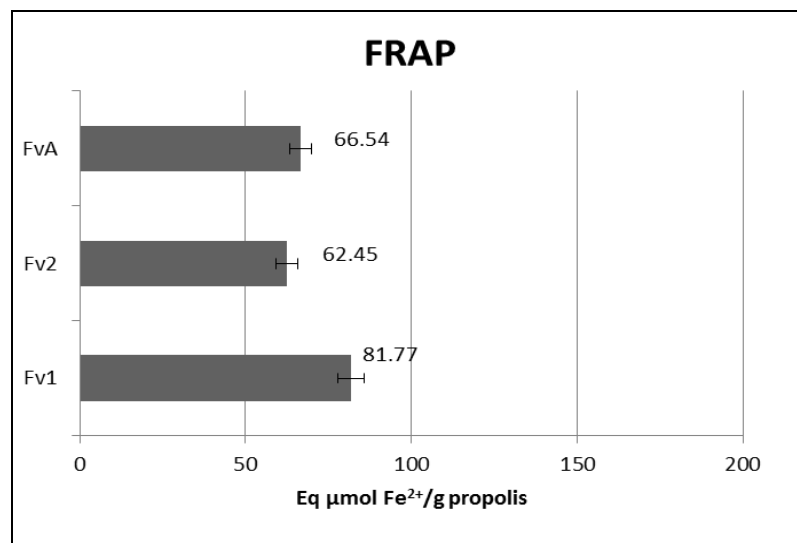
Comparando-se os dados de ABTS aqui encontrados com alguns trabalhos, percebeu-se que as própolis de outras origens possuíam potencial antioxidante superior às produzidas por *F. varia*. Valores de 560 a 1430 μmol Trolox/g em extrato etanólico de propolis foram encontrados na Espanha (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2011). Isla et al (2009), trabalhando com própolis Argentina obtidas em épocas diferentes do ano, detectaram valores de 867,85 a 809,58 μmol de Trolox/g de amostra nos meses de outubro a dezembro e de 570 a 600 μmol de Trolox/g de amostra nos meses de abril a julho. Possivelmente, altos conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides podem ter favorecido o potencial antioxidante destas própolis, assim como foi citado na discussão dos resultados obtidos pelo teste DPPH. Corroborando esta proposição, Miguel et al (2010) encontraram correlação entre a atividade antioxidante das própolis portuguesas e a quantidade de fenólicos/flavonoides. Leite-Legatti et al (2012) que detectaram valores bastante altos na atividade antioxidante por ABTS (9458 μmol de Trolox/g de amostra), quantificaram alto valor de compostos fenólicos totais na casca do fruto da jabuticaba.

Desta forma, seriam esperados valores superiores de atividade antioxidante por ABTS nas própolis de *F. varia* se elas contivessem maiores quantidades de compostos fenólicos e/ou flavonoides.

5.2.1.3 Potencial redutor do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante das própolis de *F. varia* mensurada pelo método FRAP não demonstrou haver significativas diferenças entre elas ($p=0,0592$). Os valores alcançados estão dispostos na Figura 22.

Figura 22 - Atividade antioxidante de própolis de *Frieseomelitta varia* pelo ensaio FRAP.



Nota: Os resultados estão expressos em equivalente Fe^{2+} (μM de Fe^{2+}/g de própolis).

Estes resultados parecem denotar uma fraca ação redutora destas própolis, uma vez que forte atividade foi atribuída àquelas estudadas na Espanha, as quais atingiram valores de 2312 a 4669 μmol sulfato ferroso/g de amostra (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2011). Na própolis verde brasileira foi encontrada atividade de $2078,57 \pm 14,56$ μmol sulfato ferroso/g de amostra (MELLO; HUBINGER, 2012). A

amostra utilizada por estes autores consistiu em extrato etanólico a 80% das própolis e a solução teste do extrato foi preparada de 1000 a 2000µg/mL.

Torna-se interessante mencionar em que consistiu a amostra e como ela foi preparada, pois os resultados podem variar conforme o solvente e o método utilizado na extração. Avaliando este aspecto, Cottica et al (2011) obtiveram um resultado proeminente ($1365 \pm 2 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ extrato) quando usaram uma combinação de alta concentração de própolis e baixa quantidade de álcool. Por outro lado, em uma própolis da Eslovênia submetida a processo de extração em etanol a 96%, obtiveram valor de $65,1 \pm 0,9 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (MAVRI et al, 2012). Estes resultados se aproximam dos aqui obtidos nas própolis de *F. varia*, bem como o solvente usado no processo de extração.

Da mesma forma que foi relatada na discussão dos resultados nos demais métodos, a correlação entre a intensidade da atividade antioxidante por FRAP e conteúdo de compostos fenólicos existe (COTTICA et al, 2011; KALOGEROPOULOS et al, 2009).

5.2.1.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

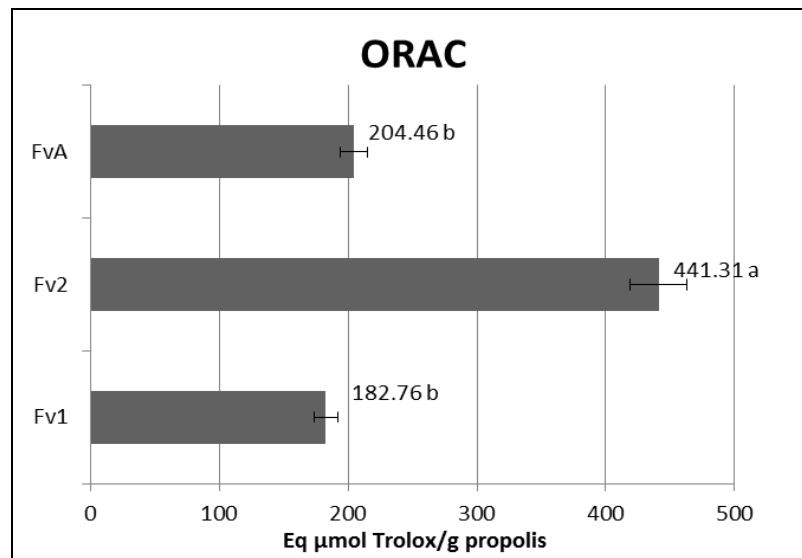
Os dados obtidos no ensaio ORAC estão dispostos na Figura 23. Nesta, pode-se notar que Fv2 conteve a maior atividade antioxidante, se diferindo de Fv1 e FvA ($p=0,0006$).

Os resultados aqui encontrados foram significativos, porém não muito acentuados se forem considerados outros produtos cuja atividade atingiu valores bastante elevados. Em muitos alimentos e produtos naturais, a capacidade de absorver o radical oxigênio atingiu a casa dos milhares.

Em uma própolis do Uruguai, o valor máximo de atividade antioxidante encontrado foi de 8000 µmol de Trolox/g de própolis (SILVA et al, 2011). Este resultado foi atribuído à mistura de polifenóis presente nestas própolis, conferindo a elas uma atividade superior a outros produtos naturais, como as frutas vermelhas, que geralmente estão classificadas entre os alimentos com maior relevância em

potencial antioxidante. Paralelamente a este achado, vale relatar que um máximo de absorção de luz UV nas concentrações de 290 a 295nm foi notado nas propolis uruguaianas e também houve uma boa correlação entre esta absorção e a quantificação dos flavonoides.

Figura 23 - Atividade antioxidante de própolis de *Frieseomelitta varia* pelo ensaio ORAC.



Nota: Os resultados estão expressos em equivalente Trolox (μmol de Trolox/g de própolis). Os números inscritos nas barras se referem ao valor médio encontrado e aqueles que estão seguidos de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($\alpha=0,05$).

Valores de ORAC ainda superiores ao relatado anteriormente foram encontrados em outras ocasiões. Em um trabalho realizado por Dudonné et al (2011), a análise do extrato de broto de *Populus nigra* permitiu a identificação de alguns ácidos fenólicos cujos valores de ORAC foram de $41639 \pm 233 \mu\text{mol Trolox/g}$ extrato (ácido cafeico), $38429 \pm 69 \mu\text{mol Trolox/g}$ extrato (ácido *p*-cumárico), $30821 \pm 132 \mu\text{mol Trolox/g}$ extrato (ácido isofelúrico), $23836 \pm 327 \mu\text{mol Trolox/g}$ extrato (ácido felúrico) e $20083 \pm 667 \mu\text{mol Trolox/g}$ extrato na mistura de todos estes compostos fitoquímicos reunidos. É válido lembrar que *Populus* sp constitui a principal fonte de resina usada pelas abelhas *Apis mellifera* na produção de própolis

em locais onde o clima é temperado, em zonas subtropicais (TEIXEIRA et al, 2008; KALOGEROPOULOS et al; 2009).

Também relacionando a alta atividade antioxidante com compostos fenólicos, Leite-Legatti et al (2012) pesquisaram casca de jabuticaba e encontraram valor de $25514,24 \pm 3037,24$ $\mu\text{mol Trolox/g}$. Os flavonoides foram definidos como os principais responsáveis por esta atividade antioxidante, sobretudo as antocianinas. E, por fim, de acordo com Nagai et al (2003), 24 flavonoides presentes em extratos etanólicos de própolis sequestraram radicais em estágios iniciais da peroxidação lipídica e, posteriormente, reagiram com radicais peróxido de ácidos graxos poli-insaturados, conseguindo impedir a continuação da cadeia de reações de formação de radicais livres.

Diante destas colocações, levanta-se a hipótese de que a atividade antioxidante por ORAC nas própolis de *F. varia* poderia ser mais elevada se nelas houvesse uma quantidade superior de compostos fenólicos, sobretudo os flavonoides. A avaliação por CCD destas própolis forneceu um indicativo da presença de terpenoides e estes parecem não exercer elevada ação antioxidante. Corroborando esta informação, Cavar et al (2012) pesquisaram a composição química e as propriedades biológicas de óleo essencial de *Artemisia annua*, verificando nela uma abundância de monoterpenoides e reafirmando o conhecido potencial antioxidante relativamente baixo da mesma.

Analisando extratos, frações e compostos puros de cultura de células de *Harpagophytum procumbens*, Georgiev et al (2010) não encontraram atividade antioxidante pelo método DPPH na fração contendo terpenoides e na avaliação por ORAC esta mesma fração teve o menor valor entre as diversas amostras analisadas (843 ± 65 $\mu\text{mol Trolox/g}$), quando o maior valor encontrado atingiu 20277 ± 857 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (detectado no composto isolado leucosceptosídeo A).

De qualquer modo, não somente uma classe química pode ser responsável por atividade biológica, como, por exemplo, os fenólicos. A atividade medida por ORAC já foi afirmada como sendo resultado do sinergismo de uma série de compostos, como fenólicos, peptídeos, ácidos orgânicos e outros componentes minoritários (MUÑOZ et al, 2007).

Se for observada a quantificação de flavonoides nas própolis de *F. varia*, nota-se que Fv1 e Fv2 tinham a mesma quantidade (estatisticamente iguais), mas esta última apresentou atividade antioxidante mais elevada que aquela. Deste modo, evidencia-se a necessidade de aprofundar os estudos de composição química e sua verdadeira relação com a atividade proposta.

Sobre os resultados obtidos em diversas metodologias de avaliação antioxidante, em muitos casos, como o ocorrido no trabalho de Georgiev et al (2010) citado anteriormente, diferenças são observadas nos resultados obtidos. No trabalho realizado por Tomer et al (2007), estudando sorgo, os valores de ORAC chegaram a ser três a quatro vezes maior que os resultados de DPPH e ABTS. Segundo a explicação mencionada por Georgiev et al (2010), isto pode estar relacionado às diferenças na natureza dos radicais e na forma como são gerados. O radical usado no teste ORAC possui alta reatividade com compostos aromáticos e substâncias que não agem como doadoras de elétrons. Por outro lado, nos testes DPPH, ABTS e FRAP, a atividade antioxidante é medida justamente pela capacidade de doar elétrons da amostra em análise. Adicionalmente, as discrepâncias nos resultados destes ensaios antioxidantes e ORAC é relatada por Dudonné et al (2011) como consequência da ação antioxidante cinética empregada neste último método, e não usada nos demais.

5.2.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados de atividade antibacteriana (CIM e CBM) estão na Tabela 5. Como se pode notar, as própolis de *F. varia* foram bastante ativas contra as

Tabela 5 - Atividade antibacteriana do padrão Cloranfenicol e extratos secos (Fv1, Fv2, FvA) de própolis produzidas pelas abelhas *Frieseomelitta varia*.

Cepas		Fv1		Cloranfenicol 1		Fv2		Cloranfenicol 2		FvA	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Gram-negativa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	< 1,95	-	-	-	< 1,95	500-1000	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	< 1,95	250 - 500	-	-	< 1,95	-	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	3,9 - 7,8	-	-	-	< 1,95	125-250	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	3,9 - 7,8	-	-	-	7,8 - 15,625	125-250	-	-
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	-	1,95 - 3,9	-	-	-	1,95 - 3,9	-	-	-
	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	3,9 - 7,8	-	15,625 - 31,25	-	< 1,95	-	250 - 500	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	< 1,95	-	-	-	31,25-62,5	-	-	-
Gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	250 - 500	-	1,95 - 3,9	250 - 500	250 - 500	-	1,95 - 3,9	250 - 500	500-1000	-
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	31,25 - 62,5	-	< 1,95	125 - 250	15,625 - 31,25	-	< 1,95	125 - 250	250 - 500	-
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	500 - 1000	-	3,9 - 7,8	-	31,25-62,5	-	< 1,95	-	250 - 500	-
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	-	15,625 - 31,25	-	250 - 500	-	7,8 - 15,625	-	-	-
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	15,62-31,25	15,62-31,25	< 1,95	31,25-62,5	-	-	7,8 - 15,625	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 82	-	-	7,8 - 15,625	-	-	-	7,8 - 15,625	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 83	-	-	7,8 - 15,625	-	-	-	15,625 - 31,25	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 107	250 - 500	-	31,25 - 62,5	-	31,25-62,5	-	15,625 - 31,25	-	250 - 500	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 127	-	-	3,9 - 7,8	-	-	-	31,25-62,5	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 93	-	-	3,9 - 7,8	-	-	-	31,25-62,5	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 99	-	-	3,9 - 7,8	-	-	-	7,8 - 15,625	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 124	500 - 1000	500 - 1000	15,625 - 31,25	250 - 500	31,25-62,5	-	7,8 - 15,625	-	250 - 500	-
<i>Staphylococcus aureus</i> OX res. 155	-	-	15,625 - 31,25	250 - 500	-	-	31,25-62,5	-	-	-	

Nota: "Cloranfenicol 1" foi utilizado como padrão no ensaio com a amostra Fv1 e "Cloranfenicol 2", no teste com Fv2 e FvA.

bactérias Gram-positivas, uma vez que exerceram ação bacteriostática contra a maioria das cepas testadas.

Ao se compararem as atividades das amostras coletadas em locais e épocas distintas, verificou-se que Fv1 e Fv2 (coletadas em épocas distintas em um mesmo local) tiveram valores iguais de CIM para *S. aureus* ATCC 6538 e foram mais ativas que FvA. Contra a bactéria *Bacillus cereus* ATCC 11778, Fv2 teve a maior atividade, seguida de Fv1 e por último FvA. Nos testes com *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e duas das oito cepas de *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistente (cepas números 107 e 124), a amostra Fv2 também possuiu valores de CIM inferiores às demais amostras, ou seja, aparentemente apresentou melhor atividade. Entretanto, não se pode considerar que Fv2 teve maior poder bacteriostático, pois as cepas destas bactérias estavam mais sensíveis no ensaio em que Fv2 e FvA foram testadas. Isto pode ser identificado mediante a comparação dos valores de CIM obtidos nos controles positivos de cada teste (antibiótico Cloranfenicol).

Atividade bactericida também ocorreu contra *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistente 124 e *S. agalactiae*. Sobre esta última, a amostra Fv1 teve um resultado proeminente, uma vez que o valor de CBM foi abaixo de 100µg/mL (15,62 – 31,25 µg/mL). É válido, ainda, destacar que este foi inferior ao CBM do Cloranfenicol (31,25 – 62,5 µg/mL), antibiótico padrão utilizado nos testes.

Com relação às bactérias Gram-negativas, contra *S. marcescens*, Fv2 se destacou com um baixo valor de CIM (15,625 – 31,25 µg/mL). A amostra FvA não teve ação bacteriostática tão relevante quanto Fv2. O extrato Fv1, por sua vez, não demonstrou atividade. Sobre as demais cepas, as amostras (Fv1, Fv2 e FvA) não foram ativas.

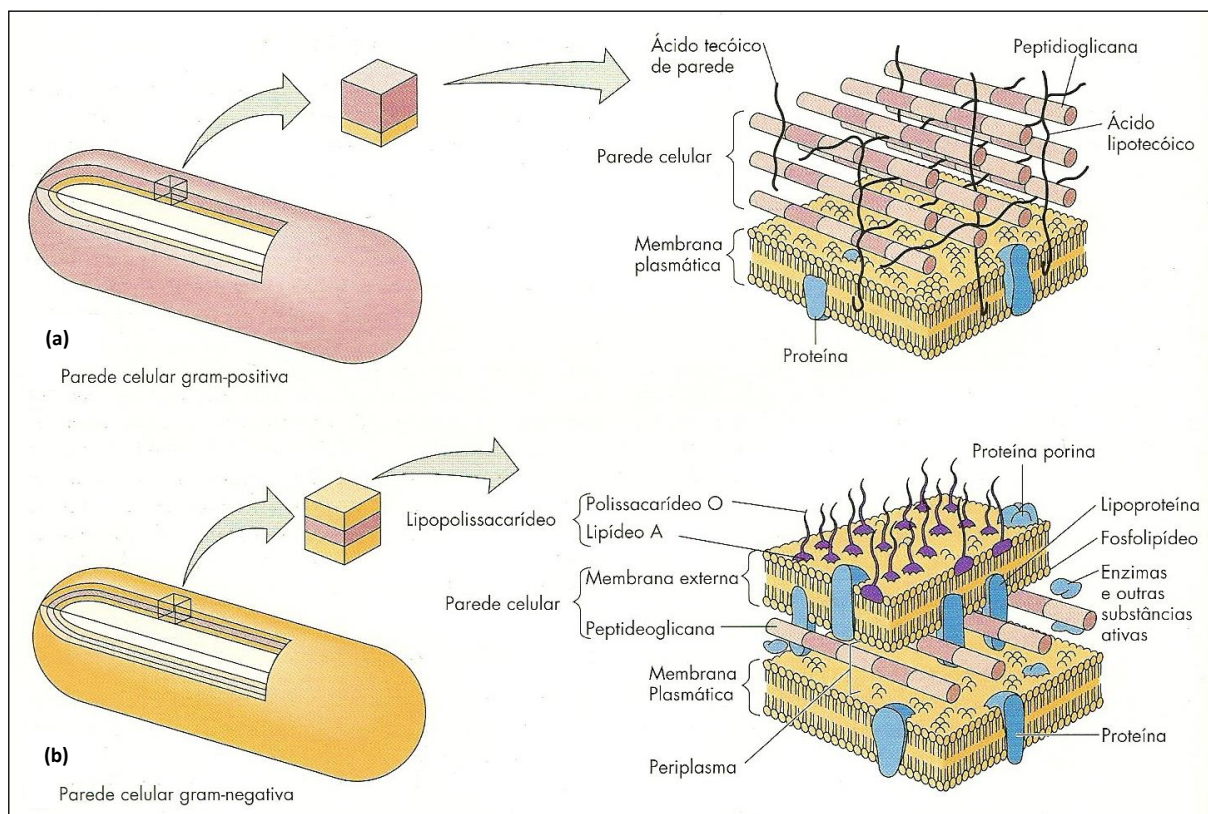
Quanto aos ensaios com a levedura *Candida albicans* ATCC 10231, nenhuma atividade (fungistática ou fungicida) foi detectada.

Estes achados estão de acordo com a maioria dos resultados obtidos na avaliação de outros tipos de própolis, sejam elas produzidas por outras espécies de abelhas (*Apis mellifera* ou abelhas sem ferrão) ou provenientes de regiões e épocas diferentes. Independente destas variáveis, grande parte dos testes antimicrobianos demonstra que as própolis inibem mais facilmente as bactérias Gram-positivas e geralmente são inativas, ou pouco ativas, contra as Gram-negativas e leveduras

(VARDAR-ÜNLÜ; SILICI; ÜNLÜ, 2008; BURIOL 2009; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI; SANGUANDEEKUL, 2012).

Este perfil de ação deve ocorrer, provavelmente, devido às diferenças estruturais destes micro-organismos. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular quimicamente mais complexa do que as Gram-positivas, com um teor lipídico maior, gerando resistência à ação dos compostos fitoquímicos (VARGAS et al, 2004)(Figura 24). A estrutura complexa das leveduras também pode constituir uma barreira para a atuação dos mesmos.

Figura 24 - Estruturas das paredes celulares de bactérias.



Fonte: TORTORA, FUNKE e CASE (2006), adaptado.

Nota: Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).

No que diz respeito à relação da composição química com a atividade biológica, a literatura frequentemente descreve a contribuição de um alto conteúdo

de compostos fenólicos e flavonoides para a atividade antimicrobiana. Em própolis de *Apis mellífera* esta correlação tem se mostrado positiva (LUSTOSA et al, 2008).

Estudando mais amplamente este assunto, Silva et al (2006) fizeram testes antimicrobianos com extratos de própolis comerciais de diversas localidades do Brasil e relacionaram os resultados com o conteúdo de fenólicos e flavonoides encontrados nas mesmas unidades experimentais. Verificaram que todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e que houve uma correlação positiva fraca entre esta atividade antimicrobiana e a quantidade de fenólicos. Sobre os flavonoides, houve uma correlação positiva média entre eles e a atividade antimicrobiana de uma forma geral. Segundo os autores, os flavonoides teriam um papel importante na ação bacteriostática dos extratos, verificando alta correlação entre eles no Grupo A e também no grupo B, quando este foi comparado aos dados de fenólicos.

No presente trabalho foi encontrado um baixo teor de compostos fenólicos e flavonoides. Isto ocorreu simultaneamente a uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Portanto, os dados aqui apresentados corroboram com aqueles encontrados para os extratos de própolis do Grupo B de Silva et al (2006).

Estas informações permitem entender que as quantificações de fenólicos e flavonoides são importantes, mas não preveem se a atividade biológica da própolis será alta. Implicam também na necessidade de uma análise mais aprofundada sobre a composição química das própolis. Seus conteúdos são bastante complexos e a restrição na quantificação de compostos fenólicos e flavonoides fazem com que eles não sejam suficientes para sustentar e relacionar as atividades biológicas nelas encontradas. Desta forma, pode-se levantar a hipótese de que mesmo sendo pequena a quantidade de fenólicos e/ou flavonoides, outras classes em conjunto com estes podem resultar em atividade antimicrobiana elevada. Isso provavelmente se deve a um sinergismo que ocorre entre os vários constituintes das própolis (MARCUCCI, 1996).

Acerca desta composição química diversa, Patricio et al (2002) afirmam que a atividade antimicrobiana de própolis de meliponíneos pode ser devido à presença de diterpenos. Velikova et al (2000) também verificou que a maioria das amostras

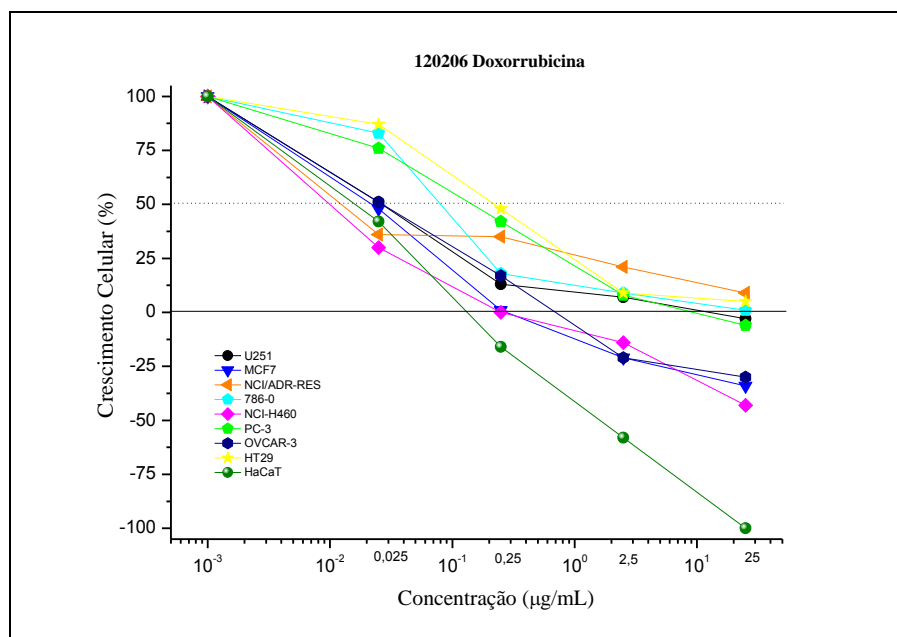
deste tipo de própolis devem sua ação antimicrobiana a ácidos diterpênicos. Estes dados podem refletir a realidade encontrada neste trabalho, visto que os resultados obtidos na análise das própolis de *F. varia* revelam a presença de compostos terpênicos, como discutido anteriormente.

No que se refere à forma de ação, Fernandes Júnior (2005) sugeriu que as própolis poderiam agir sobre os micro-organismos mediante alguns mecanismos, como a inibição da divisão celular; ação em suas paredes ou membranas celulares; bacteriólise e inibição da síntese de proteínas. A inibição da RNA-polimerase pelos compostos obtidos de própolis foram verificados em estudo e puderam explicar parcialmente os sinergismos dos extratos etanólicos de própolis com outras drogas que agem inibindo a síntese de proteínas. Tendo em vista a existência de bactérias cada vez mais resistentes a diversos antimicrobianos, o sinergismo relatado em tal trabalho demonstra grande relevância e reafirma que própolis pode constituir uma fonte de tratamento alternativo contra micro-organismos patogênicos (FERNANDES JÚNIOR, 2005).

5.2.3 Atividade antiproliferativa

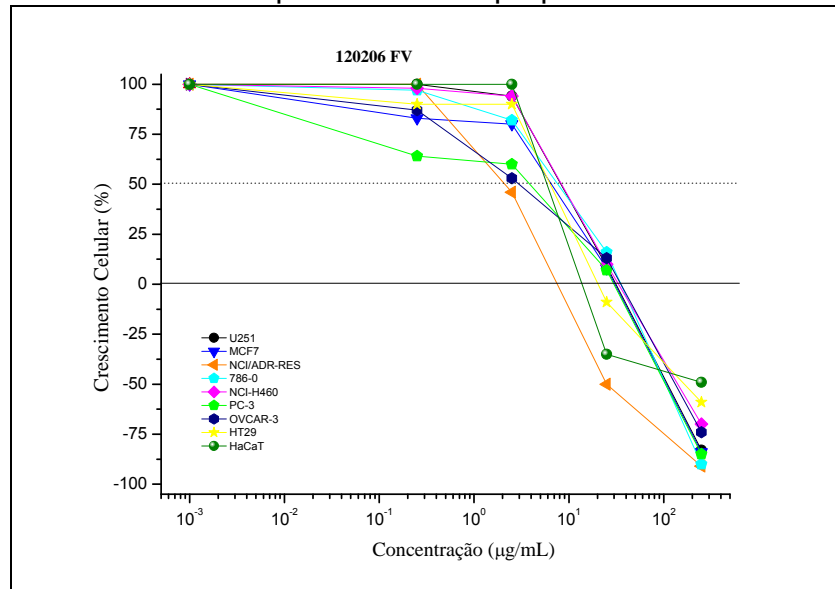
As atividades antiproliferativas exercidas pelas própolis de *F. varia*, em todas as amostras, se mostraram concentração-dependente. Os resultados da inibição do crescimento celular estão dispostos nas Figuras 24, 25, 26, 27,28.

Figura 25 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina 1.



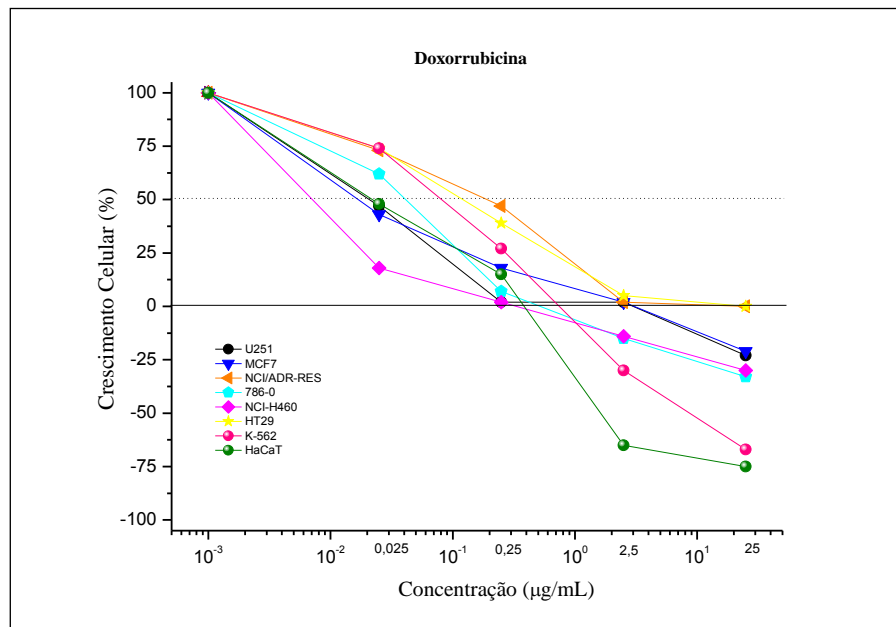
Nota: "Doxorrubicina 1" foi o padrão utilizado no ensaio com a amostra Fv1. Foram testadas as linhagens celulares: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colon); HaCaT (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Figura 26 - Atividade antiproliferativa de própolis de *Frieseomelitta varia* (Fv1).



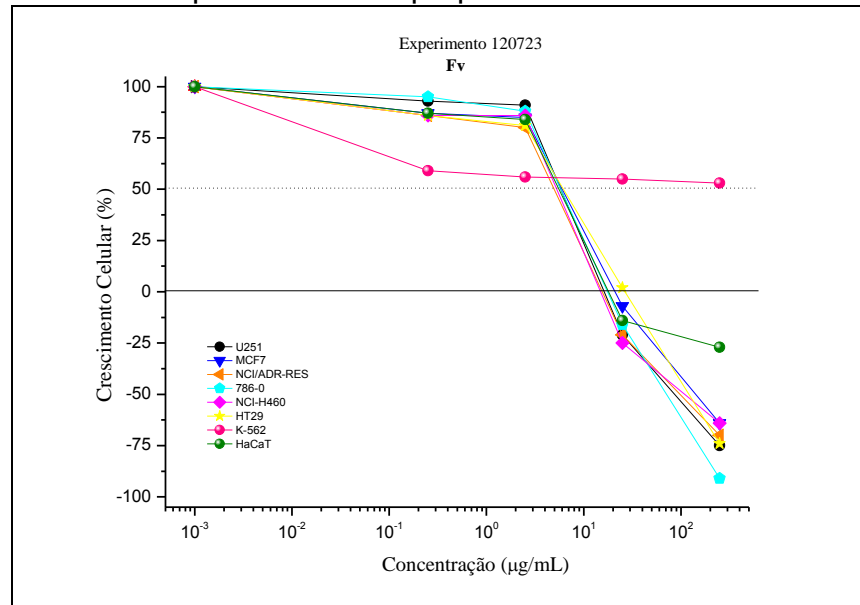
Nota: Linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colon); HaCaT (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Figura 27 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina 2.



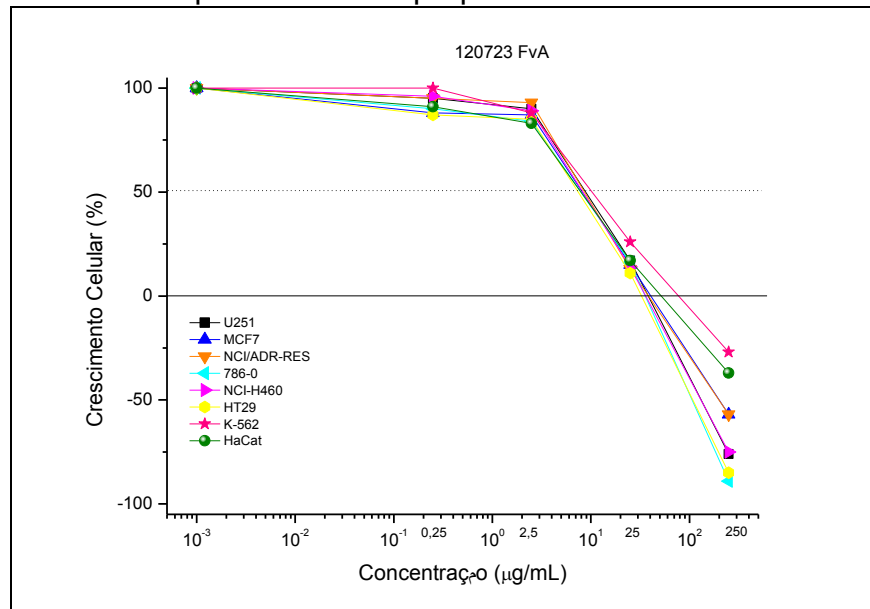
Nota: "Doxorrubicina 2" foi o padrão utilizado no ensaio com as amostras Fv2 e FvA). Testaram-se as linhagens celulares: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colon); K-562 (leucemia); HaCaT (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Figura 28 - Atividade antiproliferativa de própolis de *Frieseomelitta varia* (Fv2).



Nota: Linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colon); K-562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Figura 29 - Atividade antiproliferativa de própolis de *Frieseomelitta varia* (FA2).



Nota: Linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colon); K-562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Na Tabela 6 são encontrados os valores de TGI (inibição total de crescimento, da expressão em inglês “*Total Growth Inhibition*”) encontrados no teste com o padrão Doxorubicina e extratos secos de própolis de *F. varia*. Para analisá-los, foi adotado o critério usado por Fouche et al (2008). De acordo com estes autores, os valores de TGI indicam o potencial antiproliferativo das amostras em determinados intervalos de concentração. São classificadas, então, como: inativas (TGI > 50µg/mL) ou como detentoras de atividade fraca (15µg/mL < TGI < 50µg/mL), moderada (6,25µg/mL < TGI < 15µg/mL) ou potente (TGI < 6,25µg/mL).

Tabela 6 – Concentrações (µg/mL) de Doxorubicina e extratos de própolis de *F. varia* capazes de inibir totalmente o crescimento (TGI-Total Growth Inhibition) das células tumorais e queratinócitos (q).

Amostra/Padrão	2	m	a	7	4	p	o	h	k	q
Doxo 1	8,2	0,65	>25	>25	0,39	9,3	1,08	>25	nt	0,13
Fv1	29,7	27,5	7,6	31,0	33,8	20,0	24,8	27,3	nt	17,8
Doxo 2	1,70	2,58	25,0	1,11	0,32	nt	nt	0,80	25,0	0,27
Fv2	19,1	25,9	18,5	19,5	18,8	nt	nt	26,8	>250	41,5
FvA	35,3	41,5	41,3	31,3	33,8	nt	nt	29,6	84,4	58,1

Nota: 2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (colon); k = K-562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada). Doxo 1 = Padrão de Doxorubicina utilizado no ensaio com Fv1. Doxo 2 = Padrão de Doxorubicina utilizado no ensaio com Fv2 e FvA.

Segundo esta classificação, analisando os valores de TGI das própolis de *F. varia* (Tabela 6), destaque pode ser dado a Fv1. Em tal amostra, detectou-se uma atividade antiproliferativa moderada (TGI de 7,6µg/mL) sobre as células de câncer de ovário multirresistente a fármacos, mostrando maior seletividade e especificidade na sua ação sobre esta linhagem celular. Adicionalmente, comparando-se os valores de TGI de Fv1 e Doxorubicina (padrão utilizado nos testes), percebeu-se que Fv1 tem potencial para inibir totalmente o crescimento destas células em uma

concentração mais baixa. A Doxorubicina desempenhou apenas uma atividade fraca sobre elas, uma vez que esta linhagem também é resistente a tal fármaco.

Este critério de classificação é útil para se triarem as amostras e selecionar aquelas que contêm maior potencial antiproliferativo, para que estas sejam, então, testadas em ensaios *in vivo*. Entretanto, uma análise apenas comparativa entre os valores de TGI pode fornecer informações a respeito da influência das diferentes origens das amostras em suas ações sobre as células.

Desta forma, observou-se que a época e o local em que se coletaram as própolis interferiram no seu potencial em inibir as células não somente contra aquelas de ovário (multirresistente a fármacos), quando Fv1 se destacou entre as demais amostras. Também contra as linhagens celulares de glioma (U-251), rim (786-0) e pulmão (NCI-H460) Fv2 se destacou, possuindo menor valor de TGI. Ressalva também poder ser feita sobre as células de leucemia, onde se verificou inatividade das própolis de *F. varia* (Fv2 e FvA).

Além das linhagens tumorais, células normais imortalizadas de queratinócito humano também foram submetidas à ação dos extratos das própolis. Os resultados (Tabela 6) mostraram que Fv1 e Fv2 exerceram fraca atividade sobre elas. Por outro lado, FvA foi inativa.

Acerca da composição química e da sua influência nas propriedades biológicas, os polifenóis existentes nos produtos naturais têm sido relacionados à proteção contra processos oxidativos (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Tais processos podem causar diversos danos ao organismo, incluindo-se a indução na formação de câncer. Desta forma, pode ser válida a relação feita entre atividade antiproliferativa e o potencial antioxidante de um produto, pois compostos naturais antioxidantes já foram considerados relevantes na atuação em processos de carcinogênese, nas fases de iniciação e promoção (SARIKAYA et al, 2009).

Entretanto, as atividades antioxidantes determinadas por diversas metodologias nas própolis de *F. varia* não se revelaram altas e o conteúdo de compostos fenólicos quantificados nelas também foi reduzido. Por outro lado, o indicativo da presença de terpenoides nestas própolis oferece outra ótica para este contexto e faz emergir a suspeita da sua contribuição na atividade antiproliferativa aqui encontrada.

Respalhando esta suposição, Velikova et al (2000) afirmam que amostras ricas em ácidos diterpênicos possuem uma alta atividade antiproliferativa. Leite-Legatti et al (2012) também afirmam ação sinérgica de terpenos e compostos fenólicos contra células tumorais de diversas linhagens. Kim, Choi e Lee (2012) isolaram três novos compostos triterpênicos em *Berberis koreana* que apresentaram ação citotóxica significativa contra células tumorais humanas de diferentes linhagens.

A respeito da forma de ação antiproliferativa dos terpenos, alguns relatos foram feitos. O taxol, extraído da planta *Taxus brevifolia*, e os taxóides são diterpenos usados no tratamento de câncer de mama, pulmão, ovário e próstata. O mecanismo conferido a eles tem sido o impedimento da proliferação celular mediante ação em microtúbulos (MONTERO et al, 2005). Em *Eucalyptus benthamii* foram isolados monoterpenos, dentre os quais α -pineno e γ -terpineno, que exerceram atividade citotóxica por indução de processo apoptótico em células tumorais (DÖLL-BOSCARDIN et al, 2012).

Estendendo este achado para as própolis de *F. varia*, é possível inferir que que isto possa ter ocorrido, uma vez que terpenos são comumente encontrados em *Pinus* sp, considerada uma provável origem vegetal das resinas usadas pelas abelhas na produção destas própolis.

Yoshida et al (2008), também pesquisando a respeito de mecanismos de ação anticâncer, verificou que terpenoides presentes em pinheiros poderiam agir revertendo a proteína associada a resistência a múltiplas drogas (MRP2) e a glicoproteína-P (P-gp), que são importantes no transporte de drogas e no desenvolvimento de resistência a elas. Isto também poderia configurar uma possível forma de ação de terpenoides presentes em própolis de *F. varia*, especificamente no caso de Fv1, cuja ação sobre células tumorais de ovário resistentes a drogas se mostrou promissora.

6 CONCLUSÃO

Comparando as diferentes amostras de própolis (Fv1, Fv2 e FvA), foram evidenciadas diferenças tanto nas atividades biológicas desempenhadas por elas quanto nas quantidades de fitoquímicos. Não foram detectadas grandes variações nos perfis químicos quando a época de coleta foi avaliada (entre Fv1 e Fv2), mas uma leve variação ocorreu entre estas amostras e FvA, cujo local de obtenção foi diferente das demais. Portanto, estes resultados sugerem que a variação sazonal não influenciou na composição das própolis, mas apenas a localização da colmeia. Porém, de forma geral, o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides foram reduzidos nas própolis de *F. varia* e o perfil cromatográfico (CCD) indicou suspeita de terpenoides em todas elas.

Acerca das atividades biológicas, apresentaram uma atividade antiproliferativa significativa e grande potencial em inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas. Destacando-se entre as amostras, Fv1 mostrou atividade moderada sobre as células tumorais de câncer de ovário resistente a múltiplas drogas, bem como, apresentou ação bactericida sobre *S. agalactie* e *S. aureus* oxilina resistente. Por outro lado, as atividades antioxidantes não foram elevadas nestas própolis.

Destarte, as propriedades biológicas evidenciadas nas própolis de *F. varia* demonstram seu potencial para o incremento da saúde de seus consumidores. De forma a melhor fundamentar tais propriedades, a identificação e o isolamento de compostos químicos destas propolis poderão fornecer informações importantes e auxiliar em investigações sobre mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

AL-DUAIS, M; et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research and Technology**, n. 228, p. 813-821, 2009.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 278–283, 2007.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidante activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ASO, K. et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 727-730, 2004.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 181-189, 2008.

BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades Alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis miquel*, moraceae**. 2006, 117f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. de; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 50, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biological active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2007.

BANSKOTA, A. H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 80, p. 67-73, 2002.

BARBARIC, M. et al. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 772–778, 2011.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, n. 239, p. 70–76, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1387–1395, 2011.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**. v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 3, **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**. Brasília, DF. janeiro, 2001.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Atenção À Saúde. Departamento De Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, DF, p. 13, 2012.

BRUNETON, J. **Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinais**. 2ª ed. Editorial ACRIBIA S. A. España, 2001.

BURIOL, L. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha**. 2008. 95f. Dissertação. (Mestre em Ciências). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAMILO, M. B. B. de O. **Análise da atividade biológica de própolis de urucu (Melipona scutellaris) do Estado da Bahia**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER R. G. Oxygen radical absorbance assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 303-311, 1993.

CASTALDO, S, CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 1–6, 2002.

CAVAR, S. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 479–485, 2012.

CHABNER B. A., ROBERTS Jr, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 65, 2005.

CHANG, C-C et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n.3, p. 178-182, 2002.

CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, n. 127, p. 419-426, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Ninth Edition. M07-A8. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

COTTICA, S. M. et al. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p.929-935, 2011.

CRAGG, G. M. et al. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Natural Products Reports**, v. 29, 2012.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435–441, 2008.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. et al. *In vitro* cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. <doi:10.1155/2012/342652>

DUARTE, S. et al. Effect of a Novel Type of Propolis and its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

DUDONNÉ, S. et al. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4527–4536, 2011.

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.557-562, 2008.

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

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and brazilian stingless bees. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 173-182, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, A. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 563-566, 2005.

FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 119, p. 455–461, 2008.

FRIESEOMELITTA VARIA. 2011. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/beesp/frieseomelitta_varia.htm>. Acesso em: 11 maio, 2011.

GEORGIEV, M. et al. Antioxidant activity of devil's claw cell biomass and its active constituents. **Food Chemistry**, v. 121, p. 967–972, 2010.

GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GRIFFIN, S. P.; BHAGOOLI, R. .Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 302,p. 201-211, 2004.

GÜLÇİN, I. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.

HALIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HALIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1990, 153 p.

HALIWELL, B. et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 1/2, p. 7-20, 1995.

HAYACIBARA, M. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 101, p. 110-115, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.53, p.1841-1856, 2005.

INCA. ESTIMATIVA. 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 02 dez. 2012.

ISLA, M. I. et al. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p. 1334–1342, 2009.

ITO, J. et al. Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, n. 64, p.1278-1281, 2001.

KALOGEROPOULOS, N. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, n. 116, p. 452–461, 2009.

KIM, K. H.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Cytotoxic Triterpenoids from *Berberis koreana*. **Planta Medica**, v 78, p. 86-89, 2012.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF A. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. **Anaerobe**, v. 16, n. 6, p. 566-571, 2010.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329–339, 2004.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LEONHARDT, S. D., SCHMITT, T., BLÜTHGEN, N. Tree Resin Composition, Collection Behavior and Selective Filters Shape Chemical Profiles of Tropical Bees (Apidae: Meliponini). **Plosone**, doi:10.1371/journal.pone.0023445, 2011.

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

MABRY, T. J. MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538–544, 1998.

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

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press, New York, 113p. 1982.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MAVRI, A. et al. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1545-1558, 2012.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 47, p. 2510–2518, 2012.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n. 3, p.405-411, 2005.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2 ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 2007.

MIGUEL, M. G. et al. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3418–3423, 2010.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTERO, A, et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **Lancet Oncology**. v. 6, p. 229-239, 2005.

MUÑOZ, O. et al. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 848-851, 2007.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009.

NUNES, F. M. N.; PEREIRA, P. A. de P.; ANDRADE, J. B. de. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. **Química Nova**, v. 23, n.6, p. 794-804, 2000.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidantes de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A. P. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 121-130, 2010.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.4, p.694- 700, 2005.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, p. 2502-2506, 2002.

PATRICIO, E.F.L.R.A. et al. The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 249–254, 2002.

REIS, C. M. F. et al. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9-10, n.1, p. 43-52, 2000.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, p. 2363–2370, 2011.

ROGINSK, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidante activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n.1, p. 33–38, 2005.

SALOMÃO, K. et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SARIKAYA, A. O. et al. Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*castania sativa* mill.) Honey and propolis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p. 470–481, 2009.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.

SECRETARIA DA SAÚDE. 2012. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/ses/perfil/gestor/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativa-de-incidencia-de-cancer>. Acesso em: 15 dez. 2012.

SERRA, B. D. V. Abundância, distribuição espacial de ninhos de abelhas Meliponina (Hymenoptera, Apidae, Apini) e espécies vegetais utilizadas para nidificação em áreas de cerrado do Maranhão. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 99, n. 1, p. 12-17, 2009.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253–260, 2011.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis and some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 310-315, 2005.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. n. 5, p. 313-316, 2008.

SILVA, J. F. M. et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**. v. 99, p. 431-435, 2006.

SILVA, V. et al. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6430–6437, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIRIPATRAWAN, U., VITCHAYAKITTI, W., SANGUANDEEKUL R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**, 1-6. <doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x>), 2012.

TEIXEIRA, A. F.R.; OLIVEIRA, F. F.; VIANA, B. F. Utilization of Floral Resources by Bees of the Genus *Frieseomelitta* von Ihering (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n.5, p. 675-684, 2007.

TEIXEIRA, W. E. et al. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307–315, 2008.

TOMER; D. P. et al. Comparison of the Total Oxyradical Scavenging Capacity and Oxygen Radical Absorbance Capacity Antioxidant Assays. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 337–344, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed Editora S. A. Porto Alegre-RS, 8. ed., 2006.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Advance Access Publication**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.

VARDAR-Ü NLÜ, G.; SILICI, S.; Ü NLU, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p.1011–1017, 2008.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of própolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 55, p. 785-789, 2000.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Springer, 1996.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n.2, p. 99-105, 1998.

XUAN, H. et al. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 78-85, 2011.

YANG, H. et al. Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. **Molecules**, v. 16, p. 3444-3455, 2011.

YOSHIDA, N. et al. Inhibitory Effects of Terpenoids on Multidrug Resistance-Associated Protein 2- and Breast Cancer Resistance Protein-Mediated Transport. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 1206–1211, 2008.