

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**RODRIGO TEODORO CARTAXO**

Fracionamento bioguiado e caracterização química de  
compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis  
de Uruçu Nordestina: abelha indígena sem ferrão  
*Melipona scutellaris*

Alfenas - MG  
2012

**RODRIGO TEODORO CARTAXO**

Fracionamento bioguiado e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis de Uruçu Nordestina: abelha indígena sem ferrão

*Melipona scutellaris*

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.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Alfenas - MG  
2012

Cartaxo, Rodrigo Teodoro.

Fracionamento bioguiado e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis de Uruçu Nordestina: abelha indígena sem ferrão *Melipona scutellaris* / Rodrigo Teodoro Cartaxo. - Alfenas, 2012.  
78 f. -

Orientador: Masaharu Ikegaki

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas.  
Bibliografia.

1. Abelhas. 2. Própole. 3. Cromatografia. 4. *Staphylococcus aureus*. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD: 638.16

**RODRIGO TEODORO CARTAXO**

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO E CARACTERIZAÇÃO  
QUÍMICA DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS DE URUÇU  
NORDESTINA: ABELHA INDÍGENA SEM FERRÃO  
*MELIPONA SCUTELLARIS***

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: 15/05/12

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

Assinatura: Masaharu Ikegaki

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
Instituição: ESALQ-USP

Assinatura: Severino Matias de Alencar

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Marcelo Aparecido da Silva

**Às razões do meu caminhar amparado em bases sedimentadas de laços familiares indissolúveis, meus pais, Vânia e Rogério, incondicionalmente,**

**Dedico este trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser o guia de tantos momentos incertos, na busca sempre de um equilíbrio de lucidez em meio às tormentas vivenciadas pelo compasso de resistências edificantes.

Aos meus pais, Vânia e Rogério, a quem devo todas as minhas conquistas, por todo o apoio e dedicação compartilhando das minhas lutas, os grandes responsáveis por dar sentido a minha vida.

Ao Prof. Dr. Masaharu Ikegaki, acima de tudo pela confiança no meu trabalho, acreditando em um potencial que muitas vezes só ele conseguia enxergar em mim, e que, por sua orientação, também pude perceber se desenvolvendo e amadurecendo diante dos desafios, os quais me acostumei a superar, aprendendo valiosas lições que passaram a moldar a minha relação com as constantes e renovadas experiências no mundo acadêmico.

Aos Professores Doutores Marcelo Henrique dos Santos e Marcelo Aparecido da Silva que surgiram como referências fundamentais aos meus recorrentes questionamentos imersos nas minúcias da prática experimental cromatográfica, atenciosamente comprometidos com as soluções, e sempre disponíveis a conversas pontuadas por seus conselhos enriquecedores.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela parceria e auxílio, colocando a estrutura de seu laboratório à disposição para os ensaios de fracionamento em cromatógrafo líquido, também na figura das técnicas de laboratório Ivani e Adna, que deram todo o suporte para que as análises se concretizassem.

À Dra. Alexandra Sawaya, pelo desprendimento e receptividade com que tratou as minhas análises de espectrometria de massas sequencial, que se mostraram determinantes para o embasamento dos resultados.

Ao amigo Gustavo Silveira, pela amizade sincera em nossas conversas descompromissadas de laboratório, com quem tive o prazer de conviver, ao menos por pouco tempo, conhecendo uma pessoa de um caráter raro de se encontrar nos dias de hoje; e à minha colega de mestrado e amiga Patrícia, pelos embates de ideias sempre frutuosos que permeavam nossos contatos, nos mantendo afinados com princípios comuns, ainda que aparentemente diversos.

À CAPES pelo financiamento em concessão de bolsa de mestrado.

A todos os demais que estiveram envolvidos nas inconstantes etapas de realização deste trabalho, contribuindo direta ou indiretamente para sua construção.

“O ser humano sempre caminha ao longo de precipícios. Sua maior obrigação é manter o equilíbrio; ainda que seja escalando uma montanha muito alta, para assim descobrir que há muitas outras montanhas a escalar; através das quais se tornam os obstáculos vencidos por muitos a própria grandeza de suas vidas.”

(Bv. Papa João Paulo II; Nelson Mandela; Spurgeon)



## RESUMO

Séculos de relatos históricos dedicados à reverência por distintas civilizações emergem dos últimos 25 anos de estudos científicos sobre abelhas sem ferrão, espécies nativas eusociais de habitat tropical e subtropical, em contraste com a extensão das pesquisas voltadas aos atributos comerciais de *Apis mellifera*. Diferenças das abelhas melíferas incluem arquiteturas de ninhos peculiares, contendo a estrutura comum em cera e resinas vegetais, reforçadas com amálgamas de pólen, sementes ou solo para produzir o geoprópolis, que compartilha a mesma atividade prevalente de própolis contra bactérias gram-positivas, atribuível a derivados terpênicos. O trabalho teve como objetivo empregar um esquema de técnicas aplicadas ao fracionamento bioguiado, para obtenção de compostos ativos contra *Staphylococcus aureus* de geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*. Entre os extratos etanólicos de seis lotes de geoprópolis coletados, aleatoriamente, de um meliponário da Bahia durante um ano, a variedade “marrom-escura” destacou-se pelo poder antiestafilocócico com a mesma atividade apresentada por sua fração acetato de etila (CIM 62,5-31,25 µg/mL), a qual revelou 6 compostos-alvo através da bioautografia, na medida em que conservou o perfil cromatográfico por CLAE-FR-DAD durante a etapa de purificação, motivando o fracionamento do extrato por cromatografia em coluna de sílica, que levou, em vista da baixa eficiência de separação verificada para a fração F1 selecionada (CIM 1,95-0,98 µg/mL), às sub-frações SF2 (3,90-1,95 µg/mL) e SF3 (7,81-3,90 µg/mL) por CLAE-FR-DAD semi-preparativa. Apesar da resistência ao isolamento, os perfis de fragmentação dos compostos em frações, sub-frações e extratos de geoprópolis, determinados por CLAE-FR-ESI-TQ-EM<sup>n</sup>, revelaram componentes intimamente relacionados à estrutura comum de um núcleo diterpênico ligado a um resíduo de ácido cinâmico, coerente com as varreduras espectrais no UV homólogas e ao espectro de <sup>1</sup>H-RMN da fração F2 (7,81-3,90 µg/mL), relativamente mais purificada. Amostras de geoprópolis consistiram, ao contrário, na variabilidade dos espectros de massas, ressaltando características das abelhas nativas, ao mimetizar as *Apis mellifera*, quanto aos comportamentos de coleta heterogêneos relacionados às fontes de resinas disponíveis. Ensaio antibacterianos envolvendo bioautografias e determinações da concentração inibitória/bactericida mínima (CIM/CBM) por microdiluição e revelação com resazurina biomonitaram as etapas do fracionamento, enquanto triagens por CIM/CBM comporam o perfil antimicrobiano do extrato “marrom-escuro” e seus derivados mais ativos contra *S. aureus*, em que um painel de linhagens bacterianas patogênicas padronizadas delineou espécies gram-positivas, em especial de *Micrococcus*, *Bacillus* e *Staphylococcus*, inclusive MRSA, como altamente susceptíveis, em detrimento das gram-negativas, demonstrando o potencial promissor de geoprópolis como repositório de produtos naturais indelévels aos desafios precursores de fármacos na terapêutica.

Palavras-chave: *Melipona*. Geoprópolis. Bioguiado. Cromatografia. *Staphylococcus aureus*. Gram-positivo.

## ABSTRACT

Long historical records of reverence by distinct civilizations emerge from the last 25 years of scientific studies on stingless bees, native eusocial species inhabiting the tropical and subtropical areas of the world, over extensive documentation devoted to the globally widespread *Apis mellifera*. Differences from the honeybees include peculiar nest strengthened architectures built in beeswax and plant resins, amalgamated with pollen, seeds or soil material to produce geopropolis, compositionally dissociated of traditional propolis, even sharing a prevailing activity against gram-positive bacteria, attributable to terpenic derivatives. A bioassay-guided fractionation technique was aimed to separate active compounds against *Staphylococcus aureus* in geopropolis from *Melipona scutellaris*, concerning its potential biological relevance. Among the ethanolic extracts of the six lots of geopropolis randomly collected from a meliponary settled in the Bahia State of Brazil, during a year, the “dark-brown” variety was highlighted by the same antistaphylococcal activity of ethyl acetate fraction (MIC 62,5-31,25µg/mL), which unveiled at least six target compounds from bioautography in the purification step, even because their chromatographic profiles by RP-HPLC-PDA remained equivalent to the original extract, motivating its chromatographic fractionation by Low-Pressure Silica Gel Column Chromatography, followed by preparative RP-HPLC-PDA of the poorly resolved fraction F1 (MIC 1,95 – 0,98 µg/mL), yielding sub-fractions SF2 (3,90-1,95 µg/mL) and SF3 (7,81-3,90 µg/mL). Although escaping from the isolation purpose, the fragmentation profiles of compounds in fractions, sub-fractions and extracts, determined by RP-HPLC-ESI-TQ-MS<sup>n</sup>, allowed propositions of components closely related to the structure of a diterpenic core bonded to a cinnamic acid group, consistent with the homologous UV spectral scans, associated to the <sup>1</sup>H-NMR spectra of fraction F2 (7,81-3,90 µg/mL), relatively the most purified one available. Differing extracts consisted, in contrast, of the variability of mass spectra, suggesting mimics of *Apis mellifera* heterogeneous collecting behavior in the choice for resin sources by native bees. Antibacterial assays involving bioautography and resazurin microtitre plate-based minimum inhibitory, followed by bactericidal, concentrations (MIC/MBC) methods conducted the fractionation process, whilst the screening by MIC/MBC composed the antimicrobial profile of “dark brown” extract and its most active derivatives against *S. aureus*, displaying a panel of standardized human pathogenic bacterial strains, recognized as highly susceptible gram-positive species, in particular *Micrococcus*, *Bacillus* and *Staphylococcus*, including the selected MRSA isolate, over the gram-negative ones, demonstrating the promising potential of geopropolis as a repository of natural products candidates to the challenges of drugs development in the course of health claims.

Keywords: *Melipona*. Geopropolis. Bioassay-guided. Chromatography. *Staphylococcus aureus*. Gram-positive.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1. Meliponíneos .....	14
2.2. Aplicações como Polinizadores .....	15
2.3. Meliponicultura .....	17
2.4. Geoprópolis: Construções e Defesa da Colméia .....	19
2.5. <i>Melipona scutellaris</i> .....	24
2.6. Composição Química e Atividades Biológicas .....	27
3. JUSTIFICATIVA .....	40
4. OBJETIVOS .....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
5.1. Coleta, Processamento e Extração de Geoprópolis .....	43
5.2. Extração Líquido-Líquido .....	43
5.3. Fracionamento por Cromatografia em Coluna de Sílica “Clássica” .....	44
5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR): Análise e Sub-Fracionamento .....	44
5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-FR-EM <sup>n</sup> ) .....	45
5.6. Perfil Espectral por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	46
5.7. Determinação da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> do EEGP, frações e sub-frações .....	47
5.7.1. <i>Microorganismos</i> .....	47
5.7.2. <i>Bioautografia</i> .....	47
5.7.3. <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	48
5.7.4. <i>Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima         (CBFM)</i> .....	49
6. RESULTADOS .....	50
7. DISCUSSÃO .....	60
8. CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Além da história profundamente arraigada das abelhas melíferas no Brasil, um capítulo escrito por meio de sua ampla distribuição por todo o mundo, consumado pelo conhecimento empírico e científico concernente a seus virtuosos produtos de colmeia, desde as aplicações nutricionais do mel, até às propriedades biológicas mais refinadas já descobertas de própolis, emerge um interesse revigorado em espécies intimamente relacionadas, nativas de ambientes tropicais e subtropicais, cujos primeiros relatos de criação datam dos anos 1800 a.C., nas sociedades pré-colombianas, achados abrangentes que implicaram no termo “indígena”, representativo das chamadas abelhas sem ferrão.

Reverenciadas pela apreciação como ícone religioso, cultural e econômico difundido pelos povos Maias, passando pelas bases da etnobiologia dos Caiapós brasileiros (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006), e mesmo perdendo-se das tradições dos Yuquis da Amazônia boliviana pelo processo de aculturação globalizada (STEARMAN et al, 2008), as abelhas sem ferrão, não obstante, receberam, por gerações, pouca atenção da classe científica, provavelmente em razão de seus habitats tropicais terem sido menos acessíveis inicialmente, considerando ainda a diversidade complexa de espécies inventariadas. Reconhecendo as possibilidades vislumbradas nessas abelhas, iniciativas internacionais conjuntas de pesquisadores, em colaboração para promover os estudos de grupos locais, surgiram nos últimos 25 anos, e tem contribuído para alçá-las ao nível potencial das abelhas melíferas no cenário científico (BIESMEIJER; HARTFELDER; IMPERATRIZ-FONSECA, 2006).

A sabedoria dos povos pré-colombianos ou indígenas em torno das propriedades medicinais dos insetos e seus subprodutos representa uma das vertentes, ainda que pouco explorada, de um dos relicários do conhecimento tradicional mais reconhecidos, até os dias de hoje, para a bioprospecção e descoberta de compostos biologicamente ativos derivados de produtos naturais, a etnobiologia (COSTA-NETO, 2002).

Representatividade comprovada pela estatística de que, dos 877 compostos orgânicos introduzidos mundialmente como fármacos no período de 1981-2002, 61% eram produtos naturais, derivados, ou com estruturas mimetizadas destes. Proporções que podem ser explicadas pela inexistência de conhecimentos sobre a

etiologia de muitas doenças humanas, animais e de plantas, tornando complexo o delineamento de compostos ativos para o seu tratamento. Os produtos naturais oferecem então propriedades complementares às abordagens sintéticas em termos de composição, peso, tamanho, grupos funcionais e complexidade estrutural e estereoquímica, que podem inferir funções em sistemas biológicos específicos, como pela modulação em receptores proteicos (GHISALBERTI, 2008).

Embora as plantas medicinais e seus constituintes derivados respondam pela maioria dos ingredientes descritos no receituário praticado na cultura das medicinas tradicionais, atraindo, portanto, o foco dos interesses científicos monitorado pelas indústrias farmacêuticas, os produtos apícolas revelam-se um componente integral dos costumes da região Nordeste brasileira, em especial no reduto semi-árido, onde, em conjunto, propiciam alternativas aos precários sistemas de assistência médica disponíveis nessas áreas, o que motiva ainda seu aproveitamento cultural como fonte de renda (ALVES et al, 2008, FERREIRA et al, 2009).

Nesse contexto, as pesquisas envolvendo própolis atribuem-se pela revelação das potencialidades de substâncias previamente isoladas de plantas, assim como pelo seu papel inestimável na descoberta de substâncias de origem vegetal valiosas, que, detectadas pelas abelhas na natureza, dificilmente seriam conhecidas por outros meios (SALATINO et al., 2005). Roteiro seguido para as variedades de própolis de *Apis mellifera*, que contabilizavam cerca de 300 compostos caracterizados já em 1995 (MARCUCCI, 1995, BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000), responsáveis por atividades como antivirais, cicatrizantes, antiinflamatórias, imunoestimulantes, antioxidantes, citotóxicas e antimicrobianas (SALATINO et al, 2011).

Durante muitos anos, a maioria dos químicos de produtos naturais se dedicou ao estudo do metabolismo secundário vegetal sem, no entanto, considerar seu potencial biológico. Com a evolução das técnicas cromatográficas e espectroscópicas modernas, constantemente superando níveis de sensibilidade e sofisticação, os pesquisadores passaram a conciliar o isolamento de metabólitos, monitorado por ensaios de atividade biológica (bio-guiado), a sua elucidação estrutural, voltando as atenções para as origens da bioatividade (GHISALBERTI, 2008).

No Brasil, própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão são preconizadas, na medicina popular, para disfunções digestivas (gastrites),

respiratórias, visuais, de fertilidade feminina e cutâneas (FREITAS et al., 2008), cicatrização, e inclusive como antibacterianos, função sustentada pelos estudos de seus extratos brutos (BANKOVA; POPOVA, 2007). Enquanto as pesquisas encontram-se em fase inicial, definidas pela caracterização prospectiva do perfil químico desses extratos através de técnicas hífenadas envolvendo a espectrometria de massas – com vistas a comparações inter-espécies que procuram estabelecer uma classificação, a nível nacional, de tipos de própolis (BANKOVA et al. 1998a, VELIKOVA et al. 2000a, SAWAYA et al., 2007), a exemplo da realizada para *Apis mellifera* (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000) – outros trabalhos independentes dedicam-se à triagem primária de atividades biológicas, ainda tenuamente associada aos componentes de cada própolis (PEREIRA; BICALHO; NETO, 2003, MIORIN et al., 2003, MANRIQUE; SANTANA, 2008, FARNESI et al., 2009), ou paralelamente à determinação da composição absoluta de determinada amostra, pela avaliação dos compostos isolados (VELIKOVA et al., 2000b). Abordagens de isolamento bioguiado, ainda incipientes em estudos das abelhas sem ferrão (CAMPOS et al., 2011), surgem assim como uma ponte entre a elucidação estrutural efetiva de compostos, indicativos de sua correlação em outras espécies, e o rastreamento de bioatividades potenciais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Meliponíneos

Os insetos constituem um grande Filo zoológico, dividido em várias Ordens. Dentre elas, a Hymenoptera compreende além das formigas e vespas, as abelhas, que podem ser reunidas na superfamília Apoidea, sendo a imensa maioria das espécies identificadas por basear sua dieta no néctar e no pólen das flores como sua principal fonte, respectivamente, de energia e de proteínas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Entre as diversas famílias destacam-se as linhagens de abelhas amplamente estudadas pelo interesse específico em seu comportamento social, representado por agrupamentos de indivíduos em colônias, descritos pelo termo eusocialidade, que constitui característica da divisão reprodutiva de funções comunitárias, manutenção cooperativa das ninhadas e sobreposição de gerações, considerada como um dos eventos-chave da dominância de formigas, abelhas e cupins nos ecossistemas terrestres. Como organismos modelo para estudos da organização e evolução social das abelhas, referenciados ainda por fatores de estoque de mel coletável e manejo limitante aplicável à polinização agrícola, as respectivas espécies são divididas entre quatro sub-famílias de Apidae: os altamente eusociais Apíneos (*Apis mellifera*) e Meliponíneos (abelhas sem ferrão), os eusociais primitivos Bombíneos (mamangabas), e os alternantes de solitários a socialmente rudimentares Euglossíneos (abelhas das orquídeas), que, em geral, compreendem diferenças evolutivas na morfologia de rainhas e operárias, e na fundação de novos ninhos variando das abelhas solitárias até os refinamentos da enxameação (CARDINAL; DANFORTH, 2011).

Meliponíneos são as abelhas indígenas sem ferrão que habitam o planeta desde o período Cretáceo, há 65 milhões de anos (NATES-PARRA, 2001), bem antes do gênero *Apis*, possuindo, em relação a este, 50 vezes mais espécies, totalizando atualmente 600 delas distribuídas em 56 gêneros, ocupando grande parte das regiões de clima tropical e subtropical; das quais, cerca de 400 são típicas da região neotropical, ou seja, presentes na maioria do território latino-americano, onde estima-se que existam ainda mais de 100 a serem descobertas (NOGUEIRA-NETO, 1997, CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006). A criação de abelhas sem ferrão

constitui a meliponicultura, termo preconizado pelo Professor Paulo Nogueira-Neto em 1953 (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas sem ferrão são caracterizadas pela presença de um ferrão atrofiado, razão pela qual desenvolveram outras formas de defesa (NATES-PARRA, 2001), sendo que algumas espécies usam suas mandíbulas para infligir pequenas abrasões cutâneas, enquanto podem aplicar resinas pegajosas, ou se lançam com precisão a emaranhar-se em meio aos pêlos de invasores oportunistas, como primatas, ursos, mustelídeos, tamanduás e outros vertebrados (*Partamona*, *Trigona*), e atingir diretamente seus olhos, ouvidos e boca (ROUBIK, 2006). Durante o ataque, abelhas dessa natureza também emitem odores desagradáveis de suas secreções mandibulares, e sons que atordoam e afugentam os invasores. Os indivíduos do gênero *Oxytrigona* são capazes de secretar pequenas quantidades de ácido fórmico que, dependendo da intensidade do ataque, leva desde a queimaduras superficiais até a formação de flictenas ou lesões bolhosas (ROUBIK, 2006, STEARMAN et al, 2008). Segundo Kerr, Carvalho e Nascimento (1996) outro mecanismo de defesa de várias espécies de meliponíneos, dentre eles a *Melipona scutellaris*, é conseguir imitar a coloração de outros insetos agressivos, estando, dessa maneira, protegidos contra os ataques dos inimigos. Distinguem-se ainda, em nível anatômico, pela baixa nervação das asas e ausência de pelagem ocular, além de sua engenhosidade na composição das arquiteturas ornamentais dos ninhos (ROUBIK, 2006), especialmente em relação às peculiares estruturas que delimitam os tubos de acesso ao interior da colônia, algumas, inclusive, empregadas como parâmetro na identificação das espécies (NATES-PARRA, 2001).

## **2.2. Aplicações como Polinizadores**

Razões para apreensão no mercado internacional do agronegócio, em relação aos serviços de polinização em plantações comerciais, giram em torno da dependência mantida por anos das abelhas melíferas, em atual estágio de declínio populacional devido às baixas taxas de diversificação, como polinizadores tradicionais, aplicação que gera um valor econômico agregado consideravelmente superior ao da comercialização de seus produtos apícolas. Fatores como destruição ou alteração de habitats, uso excessivo de pesticidas, e principalmente doenças



infeciosas e parasitárias, tem sido argumentados para a renovação do panorama de esquemas de polinização mundiais (SLAA et al, 2006).

Nesse contexto, as abelhas sem ferrão surgem como candidatos viáveis para futuras alternativas nesse campo, tendo em vista a grande diversidade e abundância de espécies encontradas, permitindo a seleção da compatibilidade mais apropriada entre as estruturas reprodutivas de diversas plantas, para produção de alimentos e ornamentais, e o método de polinização característico de cada espécie, de modo a contornar as limitações das abelhas melíferas, tendo-se ainda: colônias perenes, das quais há forrageamento (visitas às plantas) o ano todo; ausência de ferrão funcional, adequado para plantações em áreas habitadas e estufas (alternativa para cultivos em climas temperados), excetuando-se as espécies mais agressivas e territoriais de *Oxytrigona* e *Trigona*; e resistência às doenças e parasitas comuns ao gênero *Apis* (SLAA et al, 2006, CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006).

Por apresentarem atividade ininterrupta durante todo o ano, e um raio de alcance de vôo limitante, de no máximo 500 metros (VELIKOVA et al, 2000a), as abelhas sem ferrão tornaram-se generalistas obrigatórias na seleção das fontes de néctar e pólen, obedecendo aos períodos de floração correspondentes a cada estação, podendo visitar, ao todo, até 100 espécies vegetais. Em cada período, porém, tende a ocorrer uma especialização, a nível individual, para determinada espécie fanerógama, comportamento descrito como constância floral, o que leva a transferências de pólen mais seletivas, reduzindo interferências expúrias à reprodução vegetal, constituindo-se, atrelado à flexibilidade generalista, em agentes polinizadores relativamente eficientes. Por isso mesmo, uma série de estudos têm comprovado a importância das abelhas sem ferrão na produtividade de plantações com reconhecido valor econômico, como de café, abacate, morango, rambutan, pimentão, tomate, pepino e sálvia, além daquelas parcialmente polinizadas, laranja Calamondin (ornamental), abóbora e rabanete (SLAA et al, 2006).

Esforços recentes para o desenvolvimento de áreas rurais no Estado de Rondônia, que tem sofrido constante impacto do desmatamento ilegal por cerca de 20 a 30 anos, incluíram, entre outros, incentivos ao estabelecimento de apicultores, que, apesar da iniciativa, acabaram tendo de abandonar a atividade pela viabilidade insuficiente das *Apis mellifera* em ambientes intactos de clima úmido tropical. A partir de então, as espécies de *Melipona*, com a crescente valorização de seus serviços de polinização, em grande parte pelas características de forrageamento generalista

tanto em áreas de floresta intocada como em ambientes alterados, além de atuarem como polinizadores essenciais de 40-90% das árvores nativas brasileiras (KERR, CARVALHO; NASCIMENTO, 1996), revelaram-se alternativas patentes. A introdução conservativa de colméias artificiais, assim como a aproximação de plantações de matas nativas, contribuiria então duplamente no desenvolvimento regional: por um lado as espécies ameaçadas de extinção, existentes em locais de derrubada de árvores, implicam na recuperação da vegetação, mesmo que incipiente no início, dado o suprimento reduzido de locais de nidificação, estabelecendo, afinal, bases para a meliponicultura; por outro viabilizaria rendimentos superiores em áreas agrícolas anexas, que seriam responsáveis por estimular a reprodução e diversificação da fauna meliponícola, fechando o ciclo (SLAA et al, 2006, CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006). Por conseguinte, considerados verdadeiros bio-indicadores do desmatamento, *Melipona* spp. são apontadas como alvos potenciais para políticas de desenvolvimento sustentável, baseadas no contexto sócio-econômico de sistemas co-dependentes agroecológicos (BROWN; ALBRECHT, 2001).

### **2.3. Meliponicultura**

A criação de abelhas sem ferrão em áreas urbanas e rurais no Brasil relegava-se, até pouco tempo, a um baixo nível técnico de manejo, em princípio, como em tradições familiares de coleta na natureza, para recreação, renda complementar ou propósitos educacionais. Avanços, porém, na divulgação de manuais de orientação por todo o país, elaborados por especialistas de referência no assunto, suscitaram o interesse científico sobre as potencialidades dos meliponíneos, além de projetos sociais de grande apelo internacional, patrocinados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola (EMPRAPA) na Bacia Amazônica, relacionados à geração de renda com práticas agrícolas alternativas e sustentáveis (BROWN; ALBRECHT, 2001), contribuindo para colocar em evidência a meliponicultura nacional (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006). A consciência da relevância ecológica depreendida das interações simbióticas entre abelhas e plantas nativas, com eventuais ameaças de extinção mútua, levou o governo brasileiro a introduzir, em 2004, uma resolução através do Conselho Nacional do Ministério do Meio Ambiente (CONAMA), que coíbe práticas extrativistas, prevendo a proteção e

uso dessas espécies em meliponários estruturados, apesar de ainda não reconhecer sua relação, como agentes polinizadores, na conservação da biodiversidade (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006, PEREIRA, 2005).

A extração do mel representa a principal fonte de renda dos meliponicultores, seguido pelo cerume e própolis (item 2.4.), que geram divisas secundárias na obtenção dos lucros, além da venda de colônias para outros estabelecimentos ou produtores autônomos. Como acontece em outros países da América Latina, o mel produzido pelos meliponíneos é muito mais apreciado por suas aplicações terapêuticas do que pelo uso culinário, e, por isso, saiu da produção estritamente caseira, ganhando, na última década, os comércios locais da região Nordeste brasileira, estabelecendo um nicho de mercado lucrativo, com preços supervalorizados em relação ao mel de *Apis*, que chegam a uma diferença de dez vezes nos grandes centros urbanos (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006).

Em geral, o desenvolvimento da meliponicultura no país passa por gargalos de melhoramento produtivo, incluindo métodos específicos de conservação do mel, devido ao elevado teor de umidade que propicia sua fermentação (principalmente o que se destina à comercialização e decorrentes fiscalizações sanitárias); a criação de colônias em larga escala, pela falta de técnicas que garantam a produção em massa das abelhas; a prevenção de contaminações por pesticidas; o uso de seus serviços de polinização para a própria conservação de suas populações, empregando-se boas práticas de manutenção dos meliponários; ao passo em que sejam difundidos programas de treinamento para qualificação dos meliponicultores, condicionados aos níveis de atividade praticados (SLAA et al., 2006, CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006).

Muitos fatores contribuem para a redução das populações de meliponíneos, como a destruição dos habitats, dos ninhos pela ação predatória de meleiros, e aplicação de inseticidas ou de outros agrotóxicos próximo a colônias selvagens, ainda que as colméias artificiais possam ser remanejadas (CARVALHO-ZILSE et al., 2009). Os efeitos sobre o organismo das abelhas de menor porte podem atingir níveis mais nocivos que aqueles já documentados, em comparação às representantes do gênero *Apis*, potencializando o impacto negativo sobre as populações de espécies indígenas, caracterizadas pelas lentas taxas de reprodução (SLAA et al., 2006), decorrentes de um processo prolongado de transferência entre as colônias mãe e filhas, de suprimentos e operárias antes, culminando com a

assunção da nova colônia por uma rainha virgem, que chega escoltada por enxameamento de operárias (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006) – motivo esse da grande limitação encontrada na criação dessas abelhas em escala comercial (SLAA et al, 2006). A dispersão do enxame fica então espacialmente restrita, comprometendo, portanto, a diversidade genética, que aumenta, por consequência, a susceptibilidade aos ataques de patógenos. A manutenção de uma força operária geneticamente variável diverge das abelhas melíferas, sendo reprimida, adicionalmente, pela estrutura social derivada do acasalamento de uma única rainha por colônia (MAKERT; PAXTON; HARTFELDER, 2006).

#### **2.4. Geoprópolis: Construções e Defesa da Colméia**

Enquanto as abelhas melíferas fundam as construções de seus ninhos utilizando como matéria-prima predominante a cera, as espécies nativas produzem em suas glândulas dorsais (ROUBIK, 2006) um produto bem mais simples em composição, friável e de baixo ponto de fusão. Atributo específico que pode contribuir para a necessidade dos meliponíneos de acrescentar resinas vegetais e vários outros elementos de preenchimento complementares, encontrados no ambiente na forma de pólen, sementes ou mesmo resíduos de lama e fezes, de modo a reforçar e consolidar as estruturas que compõem o ambiente interno do ninho, mantendo sua estabilidade (PATRICIO et al., 2002, STEARMAN et al, 2008). A resistência térmica compreende outra variável influente nos climas tropicais mais rigorosos, suprida pelos componentes da cera, cerca de quatro vezes mais rígida que as resinas, especialmente em temperaturas superiores a 35°C, mas que forma com essas um cimento de ponto de fusão mais elevado, contribuindo ainda para o isolamento térmico da colônia juntamente com os substratos de solo (madeira, terra, pedras) incorporados na estrutura externa (ROUBIK, 2006).

A arquitetura da colônia reside primariamente em combinações de cera-resina denominadas cerume, moldadas para a formação dos notáveis arranjos de tubos de entrada, além dos favos de cria e potes de mel e pólen, que estabelecem a configuração básica para o suprimento das necessidades reprodutivas, alimentares e de defesa. A formação do cerume ocorre pela mistura de materiais frescos, retirados de depósitos separados de cera e resina puros, dispostos aleatoriamente pelo ninho, que as abelhas realizam com suas mandíbulas, permanecendo com

maior maleabilidade por um período prolongado, e aplicável em reparos de emergência de danos provocados por inimigos naturais (ROUBIK, 2006, STEARMAN et al, 2008).

Mais do que um mero material para a construção dos ninhos, as resinas constituem verdadeiras barreiras químicas ao ataque de organismos invasores. Induzidas pelo seu comportamento instintivo, abelhas operárias adultas de todo tipo coletam resinas de ápices vegetativos, como brotos de árvores e arbustos e nós de folhas, inflorescências, exudatos de ferimentos em caules lenhosos, retirando porções com suas mandíbulas e transferindo, assim como o faz com o pólen, para um receptáculo em forma de cesta, revestido por uma camada pilosa (rastelo), acessório à tíbia das patas traseiras, conhecido como corbícula, onde fica armazenado durante o transporte de volta à colmeia (PATRICIO et al., 2002, STEARMAN et al., 2008).

Depósitos de resina fresca revestindo o orifício do tubo de entrada do ninho são dispostas como armadilhas para aprisionar e deter, podendo até serem combinados com uma estreita passagem construída para se ajustar ao tamanho das operárias, a invasão de formigas e cupins (ROUBIK, 2006), o que permite ainda a preferência dessas espécies pelos mais diversos locais de nidificação, como cavidades em árvores, paredes rochosas e subterrâneas (deixadas por colônias extintas de outros insetos), cabaças de cerâmica, e mesmo expostos no interior de ninhos ativos de insetos ou pendendo de galhos de árvores (NATES-PARRA, 2001). As atividades biológicas se estendem também para uma segunda linha de defesa, ligada à manutenção de um ambiente interno asséptico, prevenindo o desenvolvimento e a disseminação de infecções bacterianas e fúngicas (STEARMAN et al, 2008). No gênero *Melipona*, os limites das colônias são encerrados por placas de amálgamas resistentes, formadas de detritos de solo (barro e pequenas pedras), e resinas, que recebem o nome de batumes, provendo uma cobertura externa robusta, com camadas espessas, em constante trabalho de reparo para vedação de fissuras e amoldamento de superfícies irregulares, que atua como um escudo, protegendo o núcleo frágil dos intemperismos (COSTA, 2008).

As propriedades dissuasivas das resinas vegetais, secretadas por inúmeras espécies arbóreas, naturalmente em estruturas jovens da planta ou em resposta a injúrias e infecções (LEONHARDT; BLÜTHGEN, 2009), são devidas a sua composição em terpenos, especialmente, mono-, sesqui- e triterpenos, alguns dos

quais constituem mecanismos de defesa contra herbívoros, parasitas ou microorganismos, assim como insetos fitófagos, que são afastados em razão das características adesivas e viscosas encontradas nesses exudatos (DUANGPHAKDEE et al, 2009). Entretanto, as espécies de meliponíneos do Sudeste Asiático (região paleotropical formada também pelo continente africano e Índia) se adaptam a tais compostos chegando até mesmo a incorporá-los em seus revestimentos cuticulares em adição à cobertura cerosa proveniente de suas glândulas dorsais (ROUBIK, 2006), aplicadas também na construção dos ninhos, potencialmente compondo trilhas de reconhecimento social especializadas, como parte do sistema de comunicação espécie e colônia-específicos, que rege as interações de sinalização das fontes de resinas, formando assim as bases da ecologia química. Na medida em que os terpenóides são completamente ausentes nos perfis cerosos de superfície corporal das abelhas melíferas, ou qualquer outro inseto social, mesmo estando também ausente nas espécies neotropicais (América Latina), admite-se que representem recursos de auto-defesa na repelência de predadores e inibição do crescimento de fungos e bactérias, que são favorecidos pelas condições de temperatura e umidade dos climas tropicais e disponibilidade de nutrientes das ninhadas e estoques de pólen e mel, desempenhando uma função crítica para a sobrevivência das abelhas nativas (LEONHARDT; BLÜTHGEN; SCHMITT, 2009, 2011, LEONHARDT; WALLACE; SCHMITT, 2011). Embora ocorra transferência direta das resinas coletadas para aplicação no interior dos ninhos, sua abundante composição terpênica varia pela intensa redução dos perfis químicos, induzidos na construção das estruturas internas e na aquisição sobre a superfície corpórea das abelhas, sugerindo a influência de um componente genético precursor de mecanismos equivalentes à “filtragem” de compostos derivados de resinas, com tendência excludente a classes de terpenóides como os sesquiterpenos, encontrados alternando do cerume de algumas espécies às cutículas de outras. Condicionadas por adaptações evolutivas de interações eusociais avançadas, as restrições seletivas do conteúdo terpênico cuticular, não obstante, implicam em uma diversidade química acentuada em relação a outros himenópteros – comparável apenas à coleta especializada de fragrâncias de acasalamento específicas pelos Euglossíneos – aos quais estão associados pela combinação deste perfil com hidrocarbonetos geneticamente determinados (LEONHARDT; SCHMITT; BLÜTHGEN, 2011).

Constituições químicas das túbias corbiculares das espécies de *Frieseomelitta* de diferentes partes do Brasil, detectadas por CG-EM com inserção direta de amostra, ilustram as evidências seletoras na relação dos meliponíneos com as resinas vegetais, assinalando proporções variáveis do monoterpeneo  $\alpha$ -pineno, dos sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -muuroleno,  $\gamma$ -cadineno, germacreno-D e elemol, e diterpenos manool e totarol, além de triterpenos como  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, os quais mantiveram o mesmo padrão de distribuição no cerume das respectivas colônias dessas abelhas, sendo este diverso, por outro lado, na retenção de  $\gamma$ -cadineno, isômeros de manool e outros diterpenos em atribuição à volatilidade dos monoterpenos, excedida por se tratar de combinações de diferentes fontes resinosas coletadas através do tempo, tornando passível ainda a degradação pelas insaturações de determinados terpenos (PATRICIO et al., 2002).

Desde que as resinas tornaram-se um recurso evolutivo essencial à nidificação entre as abelhas tropicais, algumas plantas também adaptaram mecanismos para produzir resinas como recompensa floral, ao invés do néctar, na atração de polinizadores, exemplificado pela relação específica documentada entre *Trigona pallens* e as flores secretoras de resina de *Clusia odorata*, assim como espécies de *Dalechampia* sp. e *Clusia* sp. são consideradas pelo perfil de visitas sugestivo de uma série de outros meliponíneos (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Fenômeno difundido tanto entre Apíneos quanto Meliponíneos refere-se ao embalsamento ou mumificação de predadores de pequeno porte ou parasitas que tentam atacar os ninhos. Animais como roedores, pequenos lagartos ou cobras (SALATINO et al, 2005), e insetos maiores como besouros, que, devido ao seu tamanho, não podem ser removidos após serem mortos pelas abelhas, são recobertos com própolis, no caso de *Apis mellifera*, ou batume, conforme relatado para a espécie *Trigona carbonaria*, a fim de proteger a colônia de contaminações decorrentes do seu processo de decomposição (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Séculos de conhecimentos sobre a organização social das abelhas, calcada na resistência química conferida pelas resinas, mimetizando os mecanismos vegetais de defesa, permeiam o sentido do termo geoprópolis, idealizado primeiramente pelo Professor Paulo Nogueira-Neto (NOGUEIRA-NETO, 1997), que

acrescentou o prefixo “geo” (em referência a incorporação de terra, própria dos meliponíneos), à expressão “própolis”, de origem na Grécia Antiga, derivada de “pro”, em defesa de, e “polis”, cidade ou comunidade, que representa um termo apícola (relacionado à *Apis mellifera*) para as resinas quando inseridas como arcabouço defensivo das colmeias (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010, BURDOCK, 1998).

Independente da abundância de resina produzida ou proximidade das origens botânicas disponíveis, sejam elas naturais ou induzidas, observou-se, em um estudo abordando florestas do Sudeste Asiático em Bornéu, Malásia (LEONHARDT; BLÜTHGEN, 2009) que as abelhas sem ferrão demonstravam preferência por espécies de dipterocarpos, árvores típicas da região e altamente produtoras de resina – conhecida pela inibição de fungos associados ao pólen – além de conservarem uma especificidade aparente para *Agathis borneensis*, uma variedade de pinheiro de montanha, em que um número notável de espécies concentrava suas coletas. Assim como são defendidos os recursos florais mais atrativos pelas concentrações de néctar, as abelhas podem assumir um comportamento agressivo também na disputa por fontes limitadas de resinas, que são avidamente buscadas durante a ocorrência de ataques de invasores, uma vez que, coletadas de exudatos recentes, provavelmente apresentam maior conteúdo de monoterpenos, que seriam necessários a uma defesa do ninho mais eficiente. Dessa forma, as resinas são apontadas como recursos determinantes para o tamanho da colônia e o crescimento das abelhas, enfatizando o seu potencial significado para a evolução da eussocialidade nas abelhas tropicais.

Evidências recentes indicam que própolis pode induzir à supressão gênica da resposta imune inata, a nível individual, ao funcionar como um mecanismo de defesa imune externa à colônia, descaracterizando o princípio conhecido como “auto-medicação” inicialmente sugerido, o qual define-se, principalmente em relação aos vertebrados, como a exploração induzível de substâncias biologicamente ativas de outras espécies contra agentes infecciosos ou parasitários. O balanço entre os custos energéticos de resistência aos processos patogênicos instalados e incorporação de resinas no sistema de defesa, associada aos seus benefícios antimicrobianos, favorece a seleção para a constância na sua coleta, protegendo a interdependência das relações intra-colônia de surtos infecciosos e evolução de parasitas especializados, em uma operação conjunta para preservar o que se



convencionou denominar de imunidade social (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Combinações de cera de abelha ou cerume e resinas vegetais frescos, substâncias que, em conjunto, produzem um material com resistência e maleabilidade variáveis, encontra aplicações nas atividades humanas desde épocas remotas, ditadas pelos conhecimentos ancestrais dos primeiros povos mediterrâneos, que envernizavam seus navios com a chamada fórmula de “cera seladora”, conferindo aos cascos de madeira um revestimento à prova de água; mesma utilidade de um produto comercializado posteriormente na Europa para reparo de mobílias, conhecido por *beaumontage*; evolução tal que alcançou a fina arte dos mestres-artesãos de violinos, referenciados pelo seu principal expoente, Stradivarius, cujas peças simbolizaram a supremacia na fabricação dos instrumentos de corda. Civilizações pré-colombianas, entre elas as culturas nativas da Amazônia, como o povo Yuquí na região da Bolívia, também fabricavam flechas de caça com a chamada “cera negra”, preparada a partir do cozimento, a elevadas temperaturas, do cerume, tradição essa que vem se perdendo pelo processo de aculturação das novas gerações trazido pela globalização (STEARMAN et al, 2008).

## **2.5. *Melipona scutellaris***

Adaptadas ao habitat da zona da mata do litoral baiano e nordestino, as abelhas que permeavam a cultura dos povos nativos nesta região muito antes da chegada dos colonizadores, em função das quais se desenvolveu um sistema de criação arcaico para utilização dos seus produtos de colméia, eram conhecidas por Uruçu, palavra de origem no dialeto tupi, "eiru'su", que significa "abelha grande", mais tarde classificada entre os meliponíneos como a espécie *Melipona scutellaris*. No entanto, atribuía-se também o nome uruçu a diversas abelhas do mesmo gênero, encontradas não só no Nordeste, mas também na região amazônica, razão pela qual os meliponicultores convencionaram denominar a espécie em questão de Uruçu Nordestina ou Verdadeira (A ABELHA URUÇU, 2004).

Em comparação com outras abelhas da região e as suas primas melíferas, destacam-se pelo seu porte avantajado (semelhante à *Apis*), pela produção de mel expressiva e pela facilidade de manejo. Fatores que contribuíram para a perpetuação dos conhecimentos tradicionais sobre essas abelhas através de

gerações, motivando pesquisadores e meliponicultores a se dedicar, com êxito, aos trabalhos de extensão e manejo, incentivando populações rurais, assentados e interessados na criação de abelhas nativas (A ABELHA URUÇU, 2004).

A criação de abelhas sem ferrão constitui, assim, prática desenvolvida por pequenos e médios produtores, seguindo a tendência de quase todas as regiões do Brasil, e despertando grande interesse devido ao alto valor dos produtos no mercado, propiciando retorno garantido do investimento com relação custo-benefício favorável (ALVES; CARVALHO; SOUZA, 2005). Na região do litoral norte do Estado da Bahia, ninhos desta espécie ainda são encontrados com certa freqüência em seu habitat natural ou em cortiços, sendo aproveitados por agricultores locais que visam a sua criação para a produção de mel, o ecoturismo e a própria preservação da espécie (RODRIGUES; DANTAS; FERRAZ, 2004).

A principal referência que se faz à Uruçu Nordestina exalta a particularidade do mel que produz. Considerado medicinal em boa parte da zona rural nordestina, apesar de alguns estudos atestarem minimamente seu potencial antimicrobiano, o mel dessas abelhas é altamente balsâmico e infinitamente mais rico em princípios aromáticos do que o mel de *Apis mellifera* (A ABELHA URUÇU, 2004), o que confere um sabor apreciável e estimula seu emprego como alimento pelas famílias dos produtores, além de gerar rendimentos pelos preços elevados a que são comercializados – sendo até 20 vezes mais caros que o mel apícola – refletindo a relativa raridade desse mel e a conseqüente reputação que atrai consumidores de diversas partes do país.

Um estudo sobre a criação de *M. scutellaris* em uma área de reserva da Mata Atlântica do Estado de Alagoas, com remanescentes de pradarias e o crescimento de áreas de mangue nas proximidades, foi realizado por Silva e Lages (2001), e constatou, no entanto, o baixo nível técnico da meliponicultura praticada na região, com retorno financeiro negativo devido a deficiências no manejo das colônias e na produtividade de mel. Os autores propuseram então a exploração otimizada de produtos, além do mel, como pólen e própolis de *M. scutellaris*, que representam um alto valor agregado como alimentos funcionais, em associação com a polinização cruzada de plantas nativas exóticas, destacando-se *Anacardium occidentale*, *Eugenia uniflora*, *Coccus nucifera*, *Citrus* sp., entre outras. Dessa maneira, haveria bases para o reconhecimento da atividade em temáticas de política pública, cuja principal vertente seria a formulação de estratégias para o desenvolvimento sustentável da

meliponicultura, levando-se em consideração seu potencial como fonte de renda alternativa e oportunidades de emprego para a região, compatível com a proteção da biodiversidade, podendo até mesmo se estender a nível de produção industrial.

A preferência por locais de nidificação ocorre em áreas de mata úmida, que oferecem condições ideais para a sobrevivência desta espécie, onde esta encontra também árvores de grande porte com floradas muito abundantes, que são seus principais recursos tróficos (A ABELHA URUÇU, 2004), tornando os fragmentos de Mata Atlântica seu habitat natural no litoral nordestino (RODRIGUES; DANTAS; FERRAZ, 2004), além de serem tipicamente encontradas na microrregião do brejo no Estado da Paraíba e na região do Seridó do Rio Grande do Norte (MARINHO et al, 2002).

Como a maioria dos meliponíneos, o papel ecológico desempenhado por *M. scutellaris* concentra-se na polinização de flores durante suas atividades de coleta do néctar, o que contribui para a manutenção do ecossistema com a produção de frutos e sementes (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Entre os recursos alimentares disponíveis, apresentam-se bastante seletivas para vegetação característica de Mata Atlântica e capoeira, em detrimento da vegetação de campo, sugeridas aos meliponicultores para formação do pasto melipônico, compreendendo as famílias Mimosaceae, Caesalpinaceae e Myrtaceae (A ABELHA URUÇU, 2004, EVANGELISTA-RODRIGUES et al, 2003). Da mesma forma que também são consideradas como polinizadores potenciais de determinadas monoculturas na Bahia: *Eugenia aquea* (maçã aguada rosa); *E. jambosa* (maçã rosa, jambo); *E. uniflora* (pitanga); *Grewia anatica* (falsa); *Persea americana* (abacate); *Psidium guajava* (goiaba); *Talisia esculenta* (pitomba) e *Eryobotrya japônica* (nêspera).

Apesar da conservação indireta da espécie em focos de vegetação original, que abrigam redutos de criação praticados em bases técnicas mais estruturadas, como em Pernambuco (EVANGELISTA-RODRIGUES et al, 2003), o desmatamento, a especulação imobiliária, a exploração irracional das colméias, a expansão transitória da abelha africanizada, o reflorestamento e o uso indiscriminado de agrotóxicos reduzem a cobertura de vegetação e a disponibilidade inerente dos ocos de árvores com dimensões consideradas adequadas à instalação das colônias naturais, ameaçando sua prevalência nesses ambientes. (MARINHO et al, 2002,

RODRIGUES; DANTAS; FERRAZ, 2004, KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

Entre os usos medicinais de *Melipona scutellaris*, o mel destaca-se como um dos subprodutos mais apreciados nas feiras livres que ocorrem no estado da Bahia, sendo empregado como fortificante e afrodisíaco, e para o tratamento de gripes, bronquite e coqueluche, além de seu reconhecimento, pelos índios Pankararé, como curativo para picadas de cobra e mordidas de cães portadores de raiva (COSTA-NETO, 2002). Levantamentos realizados em outras localidades reúnem uma miríade de outras aplicações do mel desta espécie, conforme relatado: fadiga, problemas sexuais, tosse e câncer, no município de Santa Cruz do Capibaribe, estado de Pernambuco (ALVES et al., 2008); amebíase e gripe, em comunidades de pescadores da Paraíba (ALVES; ROSA, 2007a); cicatrizante, inflamação de garganta, tosse e asma (obtidas da extração do mel juntamente com a cera), na bioregião da Chapada do Araripe, no Ceará (FERREIRA et al., 2009); gripe, amebíase, trombose, catarata, tuberculose e rouquidão, nos municípios de Belém (Pará), São Luís (Maranhão) e Campina Grande (Paraíba) (ALVES; ROSA, 2007b); fadiga, úlcera e gastrite, em Caruaru, Pernambuco (ALVES et al., 2009); cicatrizante e gripe, na região metropolitana de Natal, Rio Grande do Norte (OLIVEIRA et al., 2010); cefaléia, enxaqueca, acidente vascular cerebral (AVC), verminoses, dor de estômago, tosse, tuberculose, impotência sexual, hemorragia pós-parto, catarata, micose oral, gripe e câncer, no estado de Alagoas (COSTA-NETO, 2002).

## 2.6. Composição Química e Atividades Biológicas

O primeiro trabalho relatando constituintes químicos de própolis melipônica foi publicado em 1993, em que amostras de cinco espécies de Meliponinae indígenas da Venezuela, *Firesomellita varia*, *Melipona favosa*, *Melipona compressipes*, *Scaptotrigona depilis* e *Paratrigona anduzei*, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com a detecção de benzofenonas polipreniladas, provenientes de *Clusia* sp., como componentes principais, embora não resultantes de isolamento; verificou-se ainda baixos teores ou traços de flavonóides em amostras de *A. mellifera* e *M. favosa* (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993).

Ao final da década de 1990, retomou-se o progresso das pesquisas envolvendo geoprópolis, a maioria conduzida por meio de acoplamentos entre a cromatografia gasosa e a espectrometria de massas (CG-EM) para análise de extratos etanólicos e de componentes voláteis, que levaram à identificação de inúmeras estruturas químicas (BANKOVA; POPOVA, 2007).

Evidências catalogadas por Bankova et al. (1998a) indicaram *p*-hidróxi-acetofenona e flavonóides apenas em amostras de *Melipona compressipes* do Piauí, além de cerca de 50 outros compostos identificados por CG-EM, entre eles os ácidos cinâmico e diterpênico e alcoóis triterpênicos, presentes em própolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* coletadas no estado do Paraná. Considerando os dados publicados até então, sugeriu-se que a composição da própolis de meliponíneos nativos brasileiros divergia das variantes venezuelanas devido à flora disponível para coleta nas diferentes localidades geográficas (FREITAS et al., 2008).

Compostos isolados foram obtidos posteriormente por Velikova et al. (2000b), que elucidaram, pela primeira vez, estruturas de ácidos diterpênicos do tipo caureno: ácido caurenóico (responsável pela atividade inibitória de *Staphylococcus aureus* atribuída ao extrato de própolis), ácido *ent*-15 $\beta$ -(3-metilbutanoilóxi)-16-cauren-19-óico e ácido *ent*-15 $\beta$ -hidróxi-16-cauren-19-óico, encontrados em própolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* criadas no estado brasileiro do Paraná.

Estudos iniciais, relacionando o comportamento coletor de abelhas melíferas e meliponíneos, investigaram a composição química das própolis de *A. mellifera* e *T. angustula*, produzidas em um apiário localizado no centro do estado de São Paulo, Brasil, por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT-EM). Extratos diclorometânicos de ambas as amostras revelaram cromatogramas análogos, sugerindo origens botânicas correlatas com base na diversidade da flora disponível para coleta das abelhas, relacionada à elevada proporção de triterpenos pentacíclicos, principalmente lupeol e lupenona, constituindo mais de 35% dos produtos de extração. Compostos polares também puderam ser detectados pela extração seqüencial em acetona e metanol, como aminoácidos em 0,2% do extrato metanólico da própolis de *A. mellifera*, além de açúcares e polióis, com destaque para o eritritose e eritritol, divergentes em predominância entre os dois tipos de própolis considerados (PEREIRA; BICALHO; AQUINO NETO, 2003).

Corroboraram tais dados a pesquisa de Velikova et al. (2000a), em que 21 amostras de própolis produzidas por doze espécies diferentes de meliponíneos foram coletadas em municípios do sudeste brasileiro e analisadas por CG-EM, que definiu três grupos de geoprópolis com base em seus compostos prevalentes: tipo ácido gálico, diterpênico e triterpênico. Os resultados confirmaram que as variáveis espécie de abelha e localidade geográfica não influíram na composição das amostras, nem na preferência botânica das abelhas, o que julgou-se ser decorrente da flora disponível dentro dos limites encontrados na curta distância de voo (500 metros) desenvolvida pelos meliponíneos.

Apesar do sucesso alcançado com as técnicas de CG-EM, implementadas para análise de componentes voláteis ou semi-voláteis de própolis durante muitos anos, o arcabouço químico deste produto apícola encontrava-se ainda parcialmente inexplorado, visto a incompatibilidade de substâncias não-voláteis às altas temperaturas de volatilização, mesmo quando derivatizadas. Revoluções no desenvolvimento de interfaces de ionização à pressão atmosférica, como o *Electrospray Ionization* (ESI), permitiram assim a abertura de novos campos para espectrometria de massas, definidos pela aplicabilidade promissora na tipificação de matrizes complexas contendo classes de moléculas termolábeis, polares e de altos pesos moleculares (SAWAYA, et al. 2004, 2006, 2007).

A fonte ESI ioniza com maior eficiência compostos polares de natureza ácida (modo íon negativo), relevantes na análise de própolis, cujos componentes fenólicos representam as principais moléculas biologicamente ativas, e básica (modo íon positivo). De forma que, em associação às condições de ionização, pH da solução e efeitos de matriz, impõe-se um limite à visualização abrangente do espectro químico amostral (analitos de baixa polaridade), permitindo entretanto distinguir diferentes tipos de própolis, em nível qualitativo, através de propriedades químicas moduladas por características particulares envolvidas em sua produção: espécies de abelhas, origens botânicas, zonas geográficas e sazonalidade (SAWAYA et al., 2004).

Espectros ESI(-)-EM de impressão digital (*fingerprint* no modo negativo), de amostras de própolis de *A. mellifera* e *T. angustula* forneceram as intensidades relativas dos sinais inseridos como variáveis no sistema de análise estatística multivariada por componentes principais (PCA), delimitado pelas regiões de coleta localizadas no nordeste, sudeste e sul do Brasil. As representantes melíferas confirmaram uma adaptação geográfica a diversas fontes vegetais de resinas,

precursoras de tipos variados de própolis, como anteriormente descrito por Sawaya et al. (2004). Comportamento oposto foi descrito para meliponíneos, cujas própolis regionais apresentaram perfis químicos homogêneos divergentes de todas as variedades de *A. mellifera*, fundamentados por uma origem botânica preferencial, visitada pela espécie independentemente da flora local. Conforme relatos de apicultores e informações espectrais de alta resolução por ESI-EM/EM acerca dos vegetais no raio de alcance das abelhas, determinou-se a correlação química (íons diagnóstico) entre os extratos de flores e frutos da espécie sul-americana *Schinus terebenthifolius* (Anacardiaceae), com distribuição geográfica ampla no Brasil, onde é conhecida como aroeira vermelha, e o extrato metanólico da própolis de *T. angustula*, comprovada pela presença, em ambos, dos ácidos masticadienóico e masticadienólico, além de outros terpenos afins (SAWAYA et al. 2006).

Abordagem extensiva à confrontação dos padrões químicos referentes à própolis de *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Plebeia remota*, *Plebeia droryana*, *Plebeia* sp., *Lestrimelitta* spp., *Tetragona clavipes*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona favosa* e *Apis mellifera*, atribuídos a determinados precursores vegetais de resinas conhecidos, foi aprimorada pelo mesmo grupo de pesquisadores, englobando todas as regiões do território brasileiro. Dados de *fingerprint* (perfil espectral) por ESI(-)-EM foram coletados para cada amostra e submetidos à análise quimiométrica (PCA), que revelou três grupos distintos de própolis. Íons diagnóstico, característicos, de *S. terebenthifolius* predominaram entre as amostras do grupo 1, apesar de ausentes em somente três das vinte e seis própolis amostradas, informações consistentes com os relatos do trabalho anterior, que apontou a espécie como principal fonte vegetal de resinas para as abelhas sem ferrão nativas brasileiras. No entanto, descobriu-se que, em regiões de flora diversa, os meliponíneos são capazes de se adaptar a outras plantas, como às árvores de *Araucaria* no sul do país (grupo 2), embora pareçam ignorar certos alvos potenciais compartilhados com *A. mellifera*, especialmente o arbusto comum do sudeste *Baccharis dracunculifolia*, origem botânica da própolis verde, que é a representante mais expressiva dos produtos apícolas brasileiros no mercado mundial (SAWAYA et al., 2007).

Correlatos em associações fitogeográficas de produtos apícolas, as análises palinológicas incluem métodos primários de classificação e controle de qualidade comercial implementados por apicultores, estabelecendo tipificações morfológicas

quantitativas de sedimentos como: grãos de pólen, constantes de depósitos na colmeia, ou concomitantes na produção do mel, além de outros elementos figurados compreendendo hifas e esporos de fungos, grãos de amido, tricomas, cerdas de insetos, células de algas e cera, que aparecem como contaminantes de própolis, com acréscimos de argila e terra em geoprópolis (BARTH, 2004), sendo resultado da coleta de tecidos e exudatos resinosos (sugestivos da origem botânica) e da dupla função de transporte pelas corbículas de pólen e resinas, geralmente relacionados a propósitos independentes de forrageamento – o que denota a aplicação questionável dessas análises na investigação dos diferentes tipos de (geo)própolis (SALATINO et al., 2005). Dados pouco explorados na literatura apontam padrões regionais inespecíficos de geoprópolis da região sudeste brasileira, demonstrando a predominância de estruturas de *Schinus* sp. nas espécies *Trigona unguolata* e *Tetragonisca angustula*, enquanto ausentes no gênero *Melipona*, caracterizado pelos espectros de Arecaceae, Combretaceae, Melastomataceae e Myrtaceae. Em comparação às abelhas do gênero *Apis*, os meliponíneos apresentaram maior variabilidade de tipos polínicos, correspondentes a um perfil generalista de coleta, e ausência de tricomas, diferindo ainda da preferência das abelhas melíferas por culturas agrícolas de *Eucalyptus*, *Citrus*, *Coffea* e espécies de Asteraceae, como fontes de pólen dominantes (BARTH; LUZ, 2003).

Marcadores químicos comparativos de *S. terebenthifolius* por ESI(-)-EM predominaram em amostras de diferentes espécies de *Scaptotrigona*, que variaram conforme a distribuição geográfica entre os estados de São Paulo, em que se observou influências flutuantes de íons diagnóstico das resinas de pinheiro, e do Maranhão; sendo avaliados com base em amostragens mensais que verificaram a sazonalidade da composição bioativa antioxidante dos extratos etanólicos (método do radical livre DPPH, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), deficiente em relação a própolis de abelhas melíferas brasileiras, concentrada nos meses de outubro a novembro, durante a primavera (SAWAYA et al., 2009).

Enquanto prospectos de compilação de informações espectrais abrangem análises combinatórias extensivas de conjuntos amplamente representativos de dados, o atual estágio de desenvolvimento tecnológico nas áreas da espectrometria ainda não dispõe de grandes avanços no conceito de ferramentas de “mapeamento” químico aplicável a leituras coordenadas da flora, capazes de propiciar o rastreamento de produtos naturais que integrem complexos bancos de dados



prospectivos. Fundamentos compatíveis com o processo de descoberta das origens botânicas, estabelecido conforme o relato mais recente da inter-relação entre a resina avermelhada de *Dalbergia ecastophyllum* a um novo tipo de própolis comum a regiões de mangue do nordeste brasileiro (SILVA et al., 2008), baseado na abordagem pontual associativa da caracterização química de determinada variedade, referenciada pelo padrão de coleta preferencial entre as espécies disponíveis dentro do alcance de voo das abelhas. Inicialmente motivada pela necessidade mercadológica de se obter produtos de qualidade contínua, a observação da atividade coletora das abelhas fornece indicadores para a formação do chamado pasto apícola, princípio também adaptado como ponto de partida na exploração científica das relações abelha-planta, adicionando-se propósitos de caracterização, classificação ou triagem bioativa de própolis. No entanto, o pasto apícola, apesar de favorável às abelhas melíferas, não encontra, por outro lado, aplicação nos meliponíneos, que se desenvolvem em ambientes nativos com maior biodiversidade, o que torna ainda menos acessível a definição das prováveis fontes de resina. Mesmo assim, as características de coleta podem ser determinantes nessas inferências, como descrito para a abelha sem ferrão *Trigona spinipes* ocorrendo em Fortaleza, Ceará, que se destaca por perfurar o tronco de espécimens cultivados de *Eucalyptus citriodora* para a produção de exudatos. Investigações químicas aprofundadas do extrato etanólico de cerume do ninho de *T. spinipes* foram além dos estudos de *fingerprinting*, realizando análises comparativas absolutas através do isolamento cromatográfico, compreendendo além dos triterpenos cicloartanos ácido magniferólico e ácido 3b-hidróxi-24-metilenocicloartan-26-óico, os flavonóides 3-metil-quercetina, tricetina, assim como os marcadores sakuranetina, éter 7-metil campferol e éter 7-metil aromadendrina, em comum com os exudatos de *Eucalyptus citriodora*, comprovantes de um comportamento seletivo, ainda sem paralelo com outros meliponíneos definidos por suas relações ecológicas (FREITAS et al., 2008).

Otimizações dos métodos de análise para o cerume de *Tetragonula carbonaria*, proveniente do sudeste de Queensland, Austrália, atestaram a extração de compostos polares através de sistema metanol:hexano, excluindo interferências analíticas dos componentes de cera; o fracionamento por partição, separando classes químicas por grupos de polaridade; e identificação de moléculas voláteis, retomando as atribuições da técnica de CG-EM na determinação de perfis

cromatográficos (*fingerprints*) referenciais, baseados em parâmetros comparativos de análise dos constituintes fenólicos característicos das tinturas padronizadas de própolis de *Apis mellifera*. A composição química do cerume de *T. carbonaria* associou-se ao tipo diterpênico pimárico e abiético misto, pelo qual ácido gálico, ácido pimárico e seu isômero foram selecionados como respectivos marcadores químicos, envolvidos ainda na atividade inibitória da 5-lipoxigenase, enzima conhecida por catalisar a produção de mediadores pró-inflamatórios, com menor intensidade que própolis de *Apis mellifera* ou padrão de ácido gálico, resultando na supressão do catabolismo de ácido linoleico, o que sugere a contribuição dos compostos polares extraídos para integridade das membranas celulares (MASSARO et al., 2011).

A caracterização do espectro antimicrobiano de geoprópolis tem sido largamente descrita por diferentes autores em trabalhos extensos, compreendendo espécies representativas em que predominam perfis de atividade mais intensos contra bactérias gram-positivas, porém inexpressivos para gram-negativos e fungos.

Fernandes Júnior et al. (2001) verificaram o efeito antibacteriano evidenciado para própolis de abelhas melíferas e meliponíneas das espécies *Nannotrigona testaceicornis* ("Iraí"), *Tetragonisca angustula* ("Jataí"), *Trigona spinipes* ("Arapuá"), *Scaptotrigona* sp. ("Tiúba"), encontradas no estado de Pernambuco, e *Partamona* sp. ("Cupira"), *Melipona scutellaris* ("Uruçu", sic), *Melipona* sp ("Manduri"), e *Melipona mandaçaia* ("Mandaçaia"), do estado de São Paulo, por meio de testes de sensibilidade dos respectivos extratos etanólicos (EEP), utilizando-se cepas de *S. aureus*, *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli* isoladas de infecções humanas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM 90%) dos extratos permitiram agrupar os resultados em ordem de atividade quanto aos patógenos inibidos: *S. aureus* - "Cupira" > "Manduri" = *A. mellifera* > "Uruçu" > "Mandaçaia" > "Iraí" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Etanol; *Enterococcus* sp - "Cupira" > "Manduri" > *A. mellifera* > "Mandaçaia" > "Uruçu" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Etanol; *E. coli* - "Manduri" > "Jataí" > Etanol > *A. mellifera* > "Uruçu" > "Cupira" > "Iraí". Bactérias gram-positivas demonstraram-se mais suscetíveis às atividades dos extratos em relação à cepa gram-negativa, destacadas pela proeminência das própolis de "Cupira" e "Manduri" em detrimento de *A. mellifera*, ressaltando critérios de distinção entre as abelhas e seus produtos.

Determinações qualitativas envolvendo o método da bioautografia de própolis verde de abelhas africanizadas melíferas (derivado resinoso do alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*) e de meliponíneos foram desenvolvidos por Farnesi et al. (2009). Componentes de média e alta polaridade presentes na própolis de *Scaptotrigona* sp. e *Melipona quadrifasciata* inibiram o crescimento de *Micrococcus luteus* e *S. aureus*, enquanto derivados da própolis de *A. mellifera*, equivalentes em propriedades físico-químicas, apresentaram inibição mais efetiva das culturas estafilocócicas, além de interferirem no crescimento de *M. luteus*, atividade também desencadeada pelos compostos menos polares. O extrato bruto de própolis verde revelou-se deletério para colônias de *E. coli*, assim como frações polares da própolis de *Scaptotrigona* sp.. Padrão de atividade semelhante foi encontrado para amostras de *M. quadrifasciata* e *A. mellifera*, respectivamente, contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Avaliações do teor de flavonóides totais, atividade antibacteriana e antioxidante de própolis meliponínicas brasileiras e venezuelanas produzidas por *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona* sp., coletadas durante um ano, foram realizadas pelo ensaio dos extratos etanólicos (EEP) associados a culturas de *S. aureus* e *M. luteus*. Estimou-se a concentração de flavonóides entre 0,19 e 0,32%, valores abaixo dos encontrados para própolis de *A. mellifera* e sujeitos a variações sazonais e interespecíficas, atribuíveis às floras de ecossistemas diversos. Observou-se elevada capacidade antioxidante pelo método do permanganato de potássio, atingindo níveis acentuadamente superiores aos encontrados para própolis de *Apis*, com diferenças estatísticas entre os extratos relativos a cada espécie, apontando a maior relevância da própolis de *M. quadrifasciata*. Todas as amostras mostraram elevada atividade antibacteriana, também marcada pela influência sazonal, produzindo halos de inibição entre 11 e 30 mm para *S. aureus* e *M. luteus*, sendo que a própolis de *Nannotrigona* sp. assinalou propriedades inibitórias mais efetivas, seguida de *T. angustula*, em relação às outras duas espécies. Correlações entre a proporção de flavonóides e as atividades biológicas e antioxidantes não puderam ser estabelecidas para própolis de meliponíneos como para as de abelhas melíferas, visto que são capazes de atuar de forma mais intensa, em decorrência de variáveis na composição química responsáveis por tais efeitos (MANRIQUE; SANTANA, 2008).

Elevadas concentrações de ácidos diterpênicos foram relacionadas a significativas atividades antioxidantes e antibacterianas contra *S. aureus*, enquanto *E. coli* e *C. albicans* permaneceram resistentes aos geoprópolis referenciados por Velikova et al. (2000a).

Bioautografias das amostras obtidas por Pereira, Bicalho e Neto (2003) determinaram potenciais antibacterianos equivalentes contra *S. aureus* para todas as frações preparadas, ao passo que apenas o extrato acetônico de própolis de *A. mellifera* demonstrou-se ativo contra *E. coli* e *Bacillus subtilis*, provavelmente devido a alta concentração dos ácidos aromáticos caféico e *p*-cumárico quantificados.

Amostras de mel e própolis de *A. mellifera* e *T. angustula* coletadas nos estados do Paraná e Minas Gerais, Brasil, foram avaliadas pela correlação entre atividade antiestafilocócica e caracterização química por CLAE em fase reversa, variáveis aplicadas em análise estatística por PCA. Todos os extratos fenólicos de mel apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de *S. aureus* similares, embora pouco significativos devido ao efeito cem vezes menor que o encontrado para os extratos etanólicos de própolis, atividade relacionada aos derivados do ácido benzóico e do cumarano e ácido *p*-cumárico em amostras de ambos os Estados. Por outro lado, abelhas *A. mellifera* produziram própolis com atividade biológica estatisticamente maior que a de *T. angustula*, efeito de elevadas concentrações também detectadas de ácido caféico, e outros derivados do ácido cinâmico e do canferol, enquanto os constituintes ativos da própolis de *T. angustula* não puderam ser identificados pelo método analítico empregado (MIORIN et al., 2003).

Oposto aos resultados alcançados por Patricio et al. (2002), que determinaram apenas compostos terpênicos, detectáveis através de CG-EM, nas relações de coleta de resinas pelas espécies de *Frieseomelitta*, Campos et al. (2011) relataram o isolamento do derivado ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, conhecido como um dos marcadores da própolis de *Apis mellifera* brasileira, empregado, inclusive, no Japão para o tratamento de tumores sob o nome comercial de Artepillin C (MARCUCCI, 2006), que foi associado às atividades antibacterianas efetivas de própolis de *Frieseomelitta varia*, do estado de Minas Gerais, a níveis de 62,5 e 250 µg/mL para inibição de *B. subtilis* e *S. aureus*, respectivamente.

Ensaio biológico *in vivo* avaliou a ação antibacteriana de enxaguatórios bucais contendo extrato de geoprópolis de *Melipona compressipes fasciculata*, frente

à colonização de *Streptococcus mutans* na cavidade oral de pacientes jovens. Os resultados indicaram uma redução no número de *S. mutans*, devido ao efeito inibitório da própolis sobre o crescimento bacteriano tanto no início quanto ao término do tratamento. Estabeleceu-se também, por análise de variância, relação significativa entre o número de bochechos com o enxaguante e a contagem de células do patógeno, concluindo-se então que o presente extrato, possuindo atividade *in vivo* contra *S. mutans*, pode constituir medida alternativa na prevenção de cáries (DUALIBE; GONÇALVES; AHID, 2007). Seguindo uma ordem lógica de comprovação *in vitro* do espectro de atividades que resultaram no efeito observado *in vivo*, a sequência de trabalho desenvolvida por Liberio et al. (2011), com extratos etanólicos de geoprópolis da mesma espécie *M. fasciculata*, obtida na micro-região de planície noroeste do estado do Maranhão, apontaram para propriedades inibitórias significativas contra *S. mutans*, relevantes ainda pelo poder bactericida contra altas densidades celulares, geralmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos, implicadas no processo cariogênico dos biofilmes, e *C. albicans*, associadas a concentrações elevadas de flavonóides e à presença de triterpenos. Parâmetros histológicos e bioquímicos revisitados por ensaios *in vivo*, assim como em própolis de *Apis mellifera*, não encontraram qualquer indicação de toxicidade em ratos a uma formulação a base de gel, a qual manteve as atividades antimicrobianas definidas para os extratos de geoprópolis; além de demonstrarem seus efeitos imunomodulatórios pelo aumento de citocinas (IL-4 e IL-10) anti-inflamatórias, propondo-se então à aplicação terapêutica de produtos formulados a partir de geoprópolis de *M. fasciculata* na prevenção do desenvolvimento de cáries e no tratamento de candidíase oral.

Destoante ao padrão antimicrobiano reconhecido em termos de própolis, algumas espécies de meliponíneos se relacionam com uma atividade expressiva também contra gram-negativos e fungos, como as abelhas do gênero *Trigona* do oeste da Índia, cujos extratos brutos de própolis conservaram o efeito inibitório prevalente contra gram-positivos, destacado pela susceptibilidade representativa de *S. aureus*, juntamente com *Bacillus subtilis* (CIM 4,87 – 1,21 µg/mL), além de níveis equiparáveis em relação a *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* e *E.coli*, variando as CIMs no intervalo de 4,87 – 9,75 µg/mL, assim como incomuns para *Candida glabrata*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans* (CIM 4,87 – 1,21 µg/mL). A potente atividade antimicrobiana do extrato, composto por alcanos,

ácidos tiofílicos, aromáticos e alifáticos, açúcares, ésteres e terpenos, revelou-se ainda mais incisiva pelas propriedades microbidas tempo-dependentes, funcionais já nas primeiras horas de incubação, a exceção de *C. glabrata*, considerando-se também o efeito inibitório prolongado em resposta a tratamentos de curta exposição (CHOUDHARI et al., 2012). Inversamente, a abelha sem ferrão *Dactylurina schimidti* encontrada nas florestas litorâneas do Quênia, no leste do continente africano, produz uma variedade de própolis que se notabiliza pela ausência de atividade contra *S. aureus*, enquanto inibe o crescimento, em ordem decrescente de intensidade, de *Salmonella typhi*, *C. albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*; no entanto, ainda mantendo o perfil preponderante contra gram-positivos, detectado por *B. subtilis*, que, pelo mesmo estudo, foi a única linhagem utilizada sensível a diferentes concentrações de mel, extraído das mesmas colônias amostradas para própolis em paralelo (MULI; MAINGI; MACHARIA, 2008).

Na Tailândia, o manejo comercial de *Trigona laeviceps*, espécie nativa da região, está relacionado à maior capacidade produtora de própolis pela comparação às proporções obtidas com *Apis* spp, contribuindo diretamente para a redução de impactos ambientais decorrentes da atividade coletora em colméias selvagens. Extratos aquosos e metanólicos brutos de própolis, obtidos separadamente a partir de amostras de *T. laeviceps*, exibiram atividade antibacteriana mais intensa contra *S. aureus* em relação a *E. coli*, enquanto as culturas de *Candida albicans* sofreram reduzida inibição, que provou-se inexistente para *Aspergillus niger*. Observou-se ainda atividades citotóxicas e antiproliferativas em cultura de células da linhagem SW620 associadas a câncer de cólon. Destacam-se aqui os resultados alcançados pelo extrato aquoso em relação ao metanólico, provavelmente devido à solubilização de compostos de maior polaridade ou hidrossolubilidade atrelados à eficiência bioativa (UMTHONG; PUTHONG; CHANCHAO, 2009).

Com ênfase na atividade antiproliferativa, o mesmo grupo de pesquisadores concentrou-se em uma abordagem de fracionamento bioguiado do extrato etanólico de própolis de *T. laeviceps* tailandesa, produzindo frações de baixa polaridade parcialmente purificadas, que desencadearam efeitos inibitórios, destacáveis a nível seletivo, nas linhagens celulares tumorais compreendidas pelo estudo, derivadas de câncer de colon (SW620), mamário (BT474), hepático (Hep-G2), pulmonar (Chago) e de estômago (Kato-III), ou inespecífico, pela atividade citotóxica adicional contra as linhagens controle, compostas por células normais hepáticas (CH-liver) e

fibroblastos (HS-27). Projetando-se frente às deficiências de agentes quimioterápicos no tratamento das resistências adquiridas que superem os índices alarmantes de mortalidade pelo câncer, os compostos detectados surgem como modelos viáveis para o delineamento de fármacos (UMTHONG et al., 2011).

Os primeiros estudos antitumorais envolvendo própolis de meliponíneo foram realizados em modelos experimentais de tumores sólidos de Ehrlich (adenocarcinoma mamário) de camundongos, pelo tratamento com extratos hidroalcoólicos de amostras de *Scaptotrigona* aff. *postica* (região central do Maranhão), que inibiram a progressão do tumor pós-inóculo, provavelmente devido à produção reduzida de NO nas células tumorais, responsável pelo maior aporte sanguíneo para o seu desenvolvimento por favorecer a permeabilidade vascular, além de limitar a proliferação e infiltração de leucócitos. Precursores de trabalhos futuros, esses resultados tornam-se ainda mais relevantes na compação com a extensa literatura dedicada a propolis de *Apis mellifera*, que, em geral, exercem o efeito investigado sob condições prolongadas de tratamentos com altas doses de extrato ou mesmo compostos isolados, divergindo das atividades antitumorais e promotoras da resposta imune periférica, atribuídas aos derivados di- e triterpênicos do extrato de própolis de *S. postica* a doses inferiores de administração única (ARAÚJO et al., 2010).

Iniciativas no sentido de promover o consumo e a pesquisa de geoprópolis no Brasil limitam-se ainda a manobras administrativas comedidas, que desempenham, porém, papel fundamental na repercussão dessas atividades no cenário econômico e científico nacional.

A intersecção entre economia e ciência pode ser visualizada no trabalho de Dutra et al. (2008), em que estabeleceu-se dados para o controle de qualidade e padronização farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba), coletado em meliponários de municípios da Baixada maranhense. Considerando que a região é uma grande produtora de mel, produto base do negócio apícola e meliponícula, aprimorados há séculos pela população indígena, o conhecimento do perfil de qualidade agrega valores a mais um produto deste setor, contribuindo para o desenvolvimento do agronegócio e da agricultura familiar no estado do Maranhão.

Dessa forma, a metodologia utilizada constou de análises sensoriais, abordagem química, perfis cromatográficos e determinação dos teores de

flavonóides. Os resultados demonstram que geoprópolis apresenta características sensoriais similares às encontradas para própolis de *Apis mellifera*, presença de compostos fenólicos em maior concentração, além de substâncias da classe dos terpenos e saponinas e ausência de alcalóides. Os perfis cromatográficos indicaram que a composição e concentração das substâncias são diferentes entre as amostras. Os teores de flavonóides variaram de 0,17 a 2,6%, os quais, para a maioria das amostras, apresentaram valores acima do mínimo exigido pela legislação brasileira para própolis de *Apis mellifera*, ressaltando-se a falta de regulamentação para produtos de outras espécies de abelhas. Os dados encontrados compreenderam as variações qualitativa e quantitativa de flavonóides e outros constituintes químicos no geoprópolis, atreladas à flora visitada pelas abelhas, localização geográfica e fatores ambientais (DUTRA et al. 2008).

Tendência equiparável parece tornar-se realidade também no México, que ocupa posição de destaque no comércio mundial de mel, exportando boa parte da produção nacional obtida de *A. mellifera* criadas principalmente na península de Yucatán, onde se desenvolvem projetos comerciais paralelos para meliponíneos da espécie *Melipona beechei*. Nesse contexto, Pino et al. (2006) objetivou comparar os componentes voláteis presentes em amostras de própolis das espécies predominantes nessa região, oferecendo dados até então escassos na literatura, e permitindo relacionar os valores agregados de ambos os produtos. Análises por CG-EM determinaram diferenças qualitativas e quantitativas entre as amostras pela identificação de 120 substâncias, das quais 99 em própolis de abelhas melíferas e 92 de meliponíneos, com rendimentos extrativos de 16 e 465 mg/Kg respectivamente (ainda que contraditório pela elevada proporção dos materiais de solo encontrados em geoprópolis). Verificou-se então que os constituintes químicos comuns, representados pelo  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, trans-verbenol,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bourboneno,  $\beta$ -cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno, perfizeram as maiores concentrações em geoprópolis apesar da vegetação homogênea na área de coleta.



### 3. JUSTIFICATIVA

O comércio dos popularmente reconhecidos “remédios naturais” movimentam pequenos mercados públicos por todo o país, sendo vendidos em bancas de ervas e animais medicinais ou por curandeiros, que os indicam para a cura ou alívio dos mais variados problemas de saúde, de acordo com as crenças de cada cultura local. Embora a captura desses espécimes na natureza ocorra por meios extrativistas de pequena escala, esta prática pode se sobrepor aos impactos conjuntos de pressões antropogênicas de degradação ambiental, gerando efeitos negativos cumulativos sobre um número considerável de espécies ameaçadas de extinção na região nordestina. Nesse sentido, o uso social da exploração de princípios ativos naturais compreende o envolvimento intrínseco entre os elementos da tríade fauna/flora local – tradições folclóricas – valor econômico, que atrelado ao clamor etnocientífico, deve ser balanceado por políticas de manejo sustentável, consciente e adaptado às culturas oriundas de cada ecossistema, perpetuando assim os conhecimentos das propriedades medicinais extraídas da relação conservativa com a biodiversidade, capazes de garantir ainda, por muitos anos, campo fértil para o direcionamento da pesquisa farmacêutica aplicada à descoberta potencial de novos fármacos, além dos estudos clínicos necessários à constatação da segurança e eficácia das receitas populares, em retorno a essas populações.

Nesse sentido, as pesquisas com geoprópolis de *Melipona scutellaris* propõem-se a contribuir para a valoração dos meliponíneos como reservas científicas intangíveis, especialmente na descoberta de produtos naturais com prováveis aplicações terapêuticas – como demonstrado no trabalho de triagem precursor deste, pela atividade antiestafilocócica pujante (CAMILO, 2008) chegando a níveis de unidade de ppm – que atraiam a atenção de iniciativas públicas mantenedoras do equilíbrio entre a sustentabilidade e a regularização do comércio deste produto como fonte de renda alternativa às populações locais.

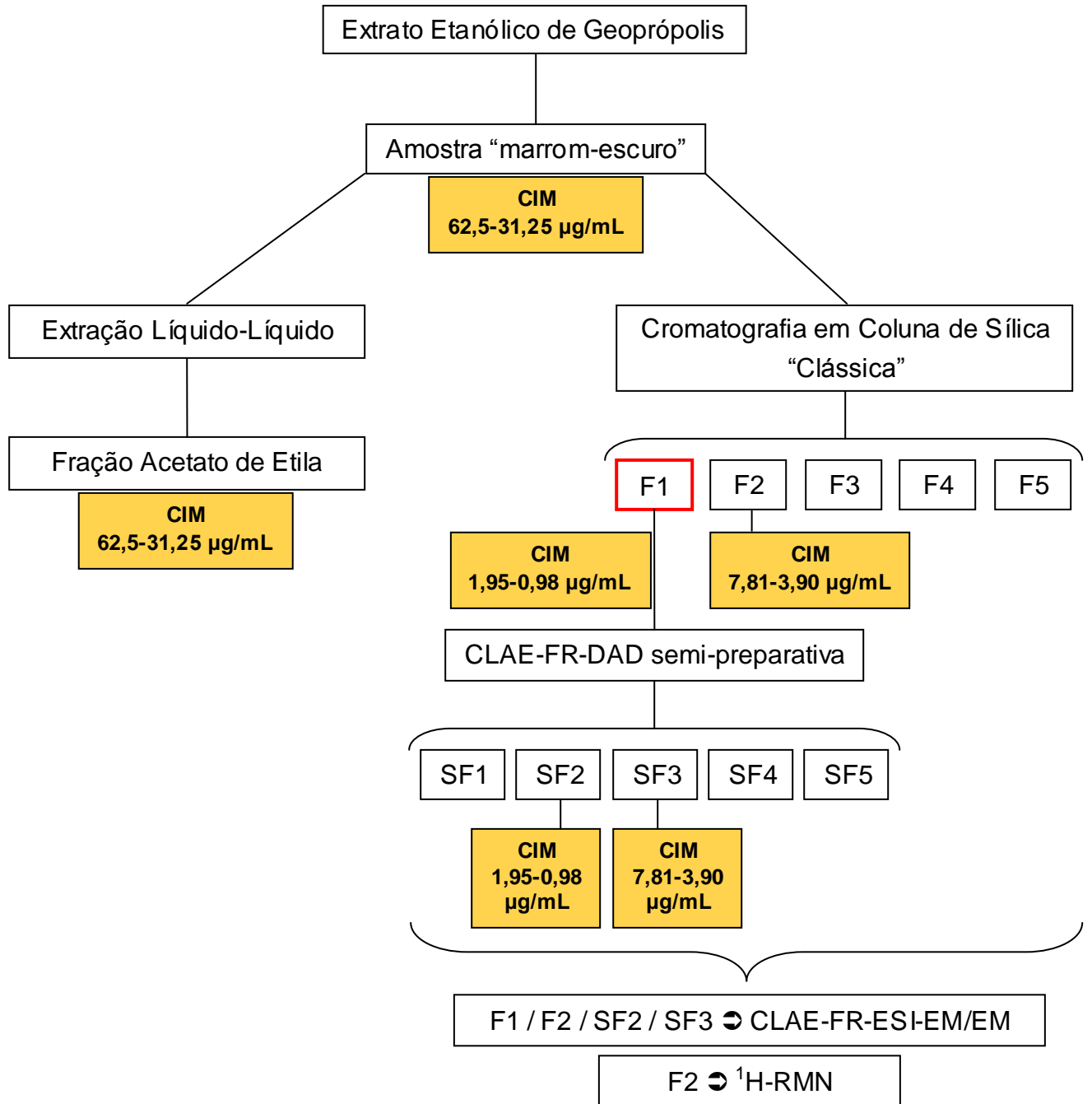
#### 4. OBJETIVOS

A proposta deste trabalho baseou-se no desenvolvimento de um esquema de metodologias voltadas ao fracionamento bioguiado (biomonitoramento) e caracterização química de geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, popularmente conhecida como Uruçu Verdadeira ou Nordestina, tendo em vista o potencial bioativo revelado previamente em estudo de bioprospecção.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Determinação do perfil químico do extrato bruto de geoprópolis de Uruçu Nordestina;
- 2) Fracionamento cromatográfico de compostos selecionados pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus*;
- 3) Composição do perfil antimicrobiano por CIM das frações mais ativas em relação a um painel de bactérias gram-positivas e negativas e levedura;
- 4) Proposição das estruturas químicas presentes nessas frações por espectrometria de massas e RMN.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS



**Figura 1.** Fluxograma otimizado do fracionamento bioguiado a partir do extrato etanólico de geopropolis de *Melipona scutellaris*

### 5.1. Coleta, Processamento e Extração de Geoprópolis

Geoprópolis de *Melipona scutellaris*, divididas em um total de seis lotes aleatórios, foram obtidas de um meliponário estabelecido na cidade de Entre Rios, Estado da Bahia, Brasil, onde as abelhas são criadas em colméias artificiais montadas em caixas de madeira (20 x 20 cm), separadas em duas partes: a inferior correspondendo às células de cria, formadas pela justaposição dos favos, e acima por depósitos de mel e pólen em estruturas semelhantes a potes, ambos construídos em cerume. Entre a tampa e a abertura da caixa, as abelhas formam uma camada de geoprópolis, delimitando e protegendo a área interna do ninho, a qual foi coletada.

As amostras foram congeladas para condicionar a porção resinosa a uma consistência friável (BURDOCK, 1998), e então pulverizadas, para a realização de dois ciclos de extração (IKEGAKI, 2001): primeiro pela maceração em etanol absoluto na proporção de 1g/7mL, em banho-maria à 70°C, por 30 minutos, com agitações intermitentes; após a centrifugação a 8000 RPM, filtração em papel de filtro, para remoção de terra e demais detritos, e da solução sobrenadante reservada, o sedimento restante foi ressuspenso novamente com três vezes o volume de etanol, repetindo-se a etapa de extração e centrifugação por esgotamento até a clarificação do solvente. Os líquidos extratores resultantes foram mantidos em freezer a -16°C *overnight* para sedimentação da cera concomitante do processo extrativo, então separada por nova etapa de filtração à frio, homogeneizando-se os filtrados que, por rotaevaporação a baixas pressões e aquecimento à 50°C, produziram o extrato etanólico de geoprópolis (EEGP), empregado nas etapas conjuntas de fracionamento e avaliação da atividade antibacteriana.

### 5.2. Extração líquido-líquido

A partição ocorreu pela adição prévia de 20% de água destilada a 100 mL de uma solução a 1,0 g/mL de EEGP em etanol absoluto, sendo assim transferida para o funil de separação na mesma proporção dos solventes de polaridade crescente n-hexano, acetato de etila e n-butanol, o qual foi acrescentado do mesmo volume de água destilada, que comporia a fração restante aquosa. Da mesma forma que para o extrato bruto, as frações foram coletadas até o esgotamento dos princípios solúveis

em cada solvente, e rotaevaporadas para a determinação do perfil ativo pela temática do biomonitoramento.

### **5.3. Fracionamento por Cromatografia em Coluna de Sílica “Clássica”**

Inicialmente, experimentos-piloto, em escala reduzida, foram desenvolvidos para a determinação do perfil de separação do EEGP “marrom-escuro”, selecionado através do biomonitoramento. Empacotou-se uma coluna de vidro de 0,8 cm de diâmetro com a proporção correspondente a 15 g de sílica para 500 mg do extrato. A fase móvel variou de hexano, com incrementos crescentes de 5%, até acetato de etila puro, sendo as 87 frações resultantes coletadas por diferenciação de colorações, e posteriormente analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com revelação por luz UV a 254 nm e vanilina sulfúrica 1%.

Na etapa seguinte, selecionaram-se os intervalos de concentração da fase móvel que levavam a compostos equivalentes em fatores de retenção ( $R_f$ ), visualizados em CCD, com o objetivo de reproduzir o procedimento em escala preparativa, utilizando a mesma proporção de sílica para 4,5 g de extrato, em uma coluna de 4,6 cm de diâmetro. Após rotaevaporação, as frações foram redissolvidas em etanol para os ensaios de atividade, exceto a fração F1, que alcançou melhor solubilização em mistura a 46:54% v/v de etanol:dimetilsulfóxido (DMSO).

### **5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR-DAD): Análise e Sub-Fracionamento**

MODOS ANALÍTICOS Os perfis cromatográficos de extratos, frações e sub-frações foram obtidos em cromatógrafo líquido ultra rápido Prominence UFLC com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M20A, usando uma coluna C18 Shim-pack CLC-ODS(M) (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), ambos da Shimadzu®. Amostras de extratos foram diluídas em metanol grau HPLC na concentração de 1 mg/mL, enquanto frações e sub-frações em 0,5 mg/mL, e filtradas através de membrana Millipore de 0,22  $\mu$ m. A fase móvel padronizada constituiu-se de 26% de água osmosificada acidificada com 0,1% de ácido acético glacial (solvente A) e 74 % de acetonitrila (solvente B), otimizando-se as condições de corrida para o modo de eluição isocrático, com injeção de 25  $\mu$ L e vazão de 1 mL/min, forno da coluna ajustado

para 31°C, sendo as análises realizadas em um tempo médio de 60 minutos. Os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 280 nm, referente à absorvância máxima da maioria dos compostos presentes nas amostras.

MODOS SEMI-PREPARATIVOS Seleccionada para a etapa de sub-fracionamento, a fração F1 foi submetida a novas análises, para adaptação do método desenvolvido, em sistema Shimadzu® HPLC com bomba ternária LC-6AD, auto-injetor SIL-10AF, detector UV/Vis SPD-M10A *vp*, empregando o mesmo modelo de coluna analítica anterior, em que se otimizou, mantendo-se também o mesmo protocolo de preparo de amostra, parâmetros de corrida e detecção a 280 nm, o gradiente de eluição para fase móvel de água osmosificada acidificada com 0,1% de ácido acético glacial (solvente A) e metanol (solvente B) variando de 70% B a 90% B em 30 min; 90% B a 95% B, 10 min; 95% B, 15 min; 95% B a 70% B, 10 min. Seguiu-se então à configuração do sistema para escala semi-preparativa, trocando-se o loop do injetor para 500 µL, e a cela do detector, além da conexão da coluna C18 Shim-Pack PREP-ODS(H) (250 x 25 mm, 5 µm), pela qual transpôs-se a otimização da corrida cromatográfica para fase móvel isocrática com 93% do solvente B, sem adição do ácido ao solvente A, a fim de prevenir interferências na atividade biológica dos eluatos; volume de injeção de 100 µL para fração F1 diluída na mistura de etanol/DMSO definida, a 12,5 mg/mL; vazão de 7 mL/min e forno mantido a 31°C, assim como o detector a 280 nm. Com a obtenção de um perfil preliminar apresentando cinco picos observáveis, procedeu-se à coleta, no módulo coletor de frações FRC-10A, para fins de seleção daqueles responsáveis pelo foco de atividade antibacteriana. Baseando-se nas varreduras espectrais dessas sub-frações e nos respectivos tempos de retenção, padronizaram-se as coletas para obtenção de massa – através de rotaevaporação – visando à realização dos testes de confirmação da atividade e, conforme a pureza, a elucidação estrutural dos compostos isolados.

### **5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-FR-EM<sup>n</sup>)**

ANÁLISES POR ESI-MS Todos os extratos, frações F1 e F2 e sub-fração SF2 foram diluídos em metanol a 1,25 mg/mL, filtrados como descrito anteriormente (item 5.4.)

e submetidos, previamente, à determinação de *fingerprint* de massas utilizando detector de triplo quadrupolo acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra performance no equipamento UPLC-TQD da Waters® Acquity / Micromass®, através de injeção direta na fonte de ionização por *electrospray* (ESI), estabelecendo as seguintes condições para o modo positivo e negativo: temperatura do capilar, 150°C; voltagem do capilar, 30,00 V; voltagem do cone de ionização, 3,50 kV; gás de nebulização, nitrogênio; varredura na faixa de 100 a 1000 m/z. Os principais íons de cada amostra foram selecionados para caracterização do perfil cromatográfico e, em sequência, de fragmentação.

ANÁLISES POR CLAE-FR-ESI-EM/EM Separações subsequentes das amostras nas mesmas diluições foram realizadas no sistema mencionado, integrado com uma coluna C18 da Waters® (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), após otimização da fase móvel, composta de água acidificada por ácido fórmico a 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B), para gradiente de 40% B a 100% B em 8 min; 100% B, 2 min; 100% B a 40% B, 0,1 min; 40% B, 1,8 min, com volume de injeção de 5 µL, vazão de 0,2 mL/min e mantendo-se os parâmetros de detecção para o modo de ionização negativo, que forneceu espectros de massas com maior concisão. Os cromatogramas do pico base (BPC) foram usados como critério dos tempos de retenção, configurados para focalizar os íons destinados à fragmentação. Experimentos EM/EM foram conduzidos com gás de colisão argônio e energias de colisão variando de 25% a 50%, sendo que em 33% obtiveram-se dados mais informativos. Para a confirmação dos mecanismos de fragmentação, realizaram-se experimentos adicionais de EM/EM/EM, por injeção direta, a partir da dissociação induzida por colisão na fonte de ionização, favorecida pela regulação em 60,00 V da voltagem capilar.

## **5.6. Perfil Espectral por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Entre as aplicações da espectrometria de RMN, encontra-se a propriedade de detecção global intrínseca de compostos em misturas complexas, provendo um *fingerprint* descritivo da amostra em estudo (CUESTA-RUBIO et al., 2007). Com isso, selecionou-se a fração parcialmente purificada F2, de maneira a restringir os espectros às informações estruturais mais específicas possíveis, submetendo-a,

através de redissolução em  $\text{CDCl}_3$ , à análise de  $^1\text{H-RMN}$  em espectrômetro Bruker® AVANCEDRX-9,4 Tesla, operando a 400 MHz, pela qual foram expressos os deslocamentos químicos relativos a TMS como padrão interno.

## **5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EEGP, FRAÇÕES E SUB-FRAÇÕES**

### **5.7.1. Microorganismos**

Linhagens padronizadas por testes de identificação aplicados no diagnóstico clínico foram gentilmente disponibilizadas a partir da coleção mantida no Laboratório de Bacteriologia Clínica da UNIFAL-MG, reunindo-se as seguintes espécies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Bordetella bronchiseptica*, *Candida albicans*. As cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram selecionadas (por testes de atividade com F1) de isolados clínicos genotípica e fenotipicamente caracterizados pela Professora Raquel Maria Lima Lemes, docente da UNIFAL-MG. Todos os microorganismos foram mantidos em meio THB e estocados a 4°C em refrigerador.

### **5.7.2. Bioautografia**

A padronização da metodologia indireta por ágar difusão, de acordo com Valgas et al. (2007), foi realizada para a fração acetato de etila, escolhida na fase de purificação pela atividade conservativa do EEGP “marrom-escuro”. Desenvolveram-se triplicatas de cromatoplasmas de sílica gel GF<sub>254</sub> de 13 x 2,5 cm, com aplicação, em forma de bandas de dimensões uniformes, de 200 µg da fração, e eluição em fase móvel hexano : acetato de etila 70:30% v/v – que forneceram concentrações adequadas dos compostos satisfatoriamente resolvidos à visualização dos resultados – reservando-se uma de cada como controle de revelação em UV 254 nm e vanilina sulfúrica 1%. Garantindo-se a secagem dos solventes durante 10 min



dentro da capela de exaustão, cada cromatoplaça foi disposta no fundo de uma placa de petri estéril de 14 cm de diâmetro, e recoberta por uma fina camada de ágar Mueller-Hinton de 0,16 cm de altura (25 mL), inoculado com *S. aureus* pela técnica “pour plate”, que consiste na incorporação de uma suspensão bacteriana padronizada em volume relativo a 1% do meio fundido. Para isso, um tubo de ensaio com tampa de rosca contendo solução salina a 0,89%, foi adicionado de pequenas porções de colônias com 24 horas de crescimento prévio em tubo com meio inclinado, realizando-se leituras em espectrofotômetro a 660 nm até se obter a transmitância de 75%, correspondente, na escala 0,5 de McFarland, a uma densidade de  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL. Com o ágar solidificado, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A observação dos halos de inibição sobre as bandas foi destacada pela revelação com o corante indicador de viabilidade celular MTT, a 2 mg/mL em PBS 0,01M (pH 7,4), que produz um precipitado azul quando metabolizado pelas bactérias, demarcando as áreas em que não houve crescimento.

### **5.7.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O teste de microdiluição em caldo preconizado pela norma M7-A6 do CLSI (2003) foi adaptado para uma metodologia validada por Mann e Markham (1998) e atualizada por Sarker, Nahar e Kumarasamy (2007), utilizando o corante indicador de viabilidade celular resazurina para determinação do ponto final. As soluções preparadas de extratos, frações e sub-frações, reservadas durante o fracionamento, foram filtradas em membrana Millipore de 0,22  $\mu$ m, e suspensas até o volume de 1 mL de caldo Mueller-Hinton (CMH) estéril, em microtubos, nas concentrações ajustadas para perfazer a primeira diluição da escala de concentrações do teste, que variaram de 1000 a 0,49  $\mu$ g/mL. Em microplacas de cultura celular estéreis de 96 poços, distribuiu-se 50  $\mu$ L de CMH em cada poço, adicionando-se, em seguida, o mesmo volume das suspensões de cada produto testado, em duplicata, nos seus respectivos poços; homogeneizou-se com micropipeta multicanal de modo a proceder-se às diluições seriadas, transferindo 50  $\mu$ L pela sequência de poços, contendo, afinal, concentrações duplamente decrescentes. Para o inóculo, padronizou-se a suspensão microbiana em salina a 0,89% da mesma maneira que para a bioautografia, e uma alíquota dessa suspensão, correspondente a 0,1% do volume de CMH estoque, foi adicionada ao meio e o inóculo então distribuído a 50

$\mu\text{L}$  por poço – produzindo uma diluição padronizada da ordem de  $10^5$  UFC/mL, coerente com a cinética de redução da resazurina pela densidade de bactérias/leveduras no meio de crescimento. As placas foram, ao final, tampadas e envolvidas em filme plástico para incubação em estufa à  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas, quando adicionou-se  $50 \mu\text{L}$  de resazurina 0,01%, em água destilada estéril, em todos os poços, e observou-se, após um período adicional de 4 horas de incubação, a transição da cor original azul para púrpura, rosa ou transparente (como nos testes de *B. cereus*, relacionado a um intenso crescimento) para determinação da CIM, relativa ao intervalo de concentrações em que ocorre a viragem do indicador. Nos casos de *C. albicans* e *S. agalactiae*, substituiu-se o CMH, em que apresentaram crescimento deficiente, pelo meio THB de manutenção dessas culturas. Controles de esterilidade do meio e dos extratos, frações e sub-frações foram considerados pela adição apenas de mais  $50 \mu\text{L}$  de meio estéril, na medida em que os controles negativo e de atividade do solvente seguiram o mesmo procedimento anterior. O antibiótico de amplo espectro cloranfenicol foi definido como controle positivo.

#### **5.7.4. Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBFM)**

As concentrações supra-inibitórias determinadas pela CIM foram avaliadas, quanto ao potencial bactericida, pela pipetagem de alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  de uma das réplicas nos poços correspondentes da microplaca revelada com resazurina, para a reinoculação em placa de petri contendo ágar Mueller-Hinton estéril, seguida de incubação à  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Considerou-se a CBFM aquela em que não se observou formação de colônias.

## 6. RESULTADOS

Durante os procedimentos de extração, observou-se que os lotes de geoprópolis recebidos, apesar de provenientes de um mesmo meliponário, apresentavam composições variáveis a julgar, primeiramente, pelos indícios observados nas tonalidades das colorações de cada amostra, quimicamente relacionadas com as origens vegetais utilizadas pelas abelhas na coleta de resinas (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000). Dessa forma, foram separadas seis amostras de geoprópolis diferentes, com base no princípio inicial da ordem cronológica de recebimento de cada remessa, verificando-se também as conformidades na inspeção visual de cada lote. Obtendo-se então os extratos etanólicos (EEGP) correspondentes, procedeu-se à determinação da CIM contra a linhagem padrão de *S. aureus*. Em paralelo, realizaram-se as análises por CCD e, mais adiante, CLAE-FR-DAD de cada amostra, de modo a traçar uma avaliação comparativa qualitativa da possível diversidade entre perfis químicos. Os ensaios biológicos vieram a confirmar o que se observou a nível cromatográfico: um padrão geral aparentemente conservativo de compostos entre as amostras, pontuando divergências específicas, que revelou diferenças em valores de atividade relativamente correlacionados (variando de 125 a 31,25 µg/mL), mas, de fato, incompatíveis.

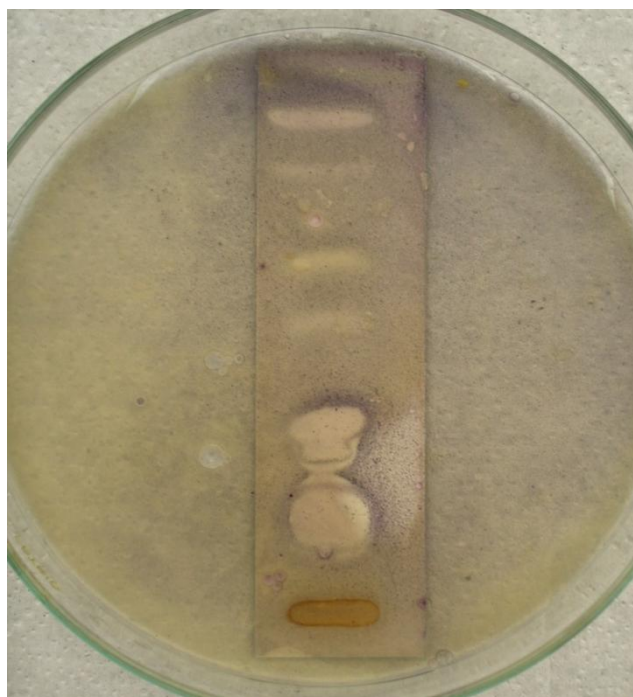
Apesar do planejamento de sondagem bio-guiada dos compostos antibacterianos investigados, considerou-se o fracionamento líquido-líquido para mais de um extrato disponível nesta etapa experimental, além daquele que produziu níveis de atividade mais expressivos – o qual foi denominado de EEGP “marrom-escuro”, em referência à discriminação inicial das amostras. Verificou-se, desse modo, se haveria potencialização das propriedades inibitórias pela concentração dos compostos em determinado solvente, que pudesse resultar em frações mais ativas independente de seus extratos de origem, dado que diferentes estruturas moleculares pareciam contribuir para a atividade, e a variação de suas combinações por grupos de polaridade forneceria parâmetros sobre suas propriedades químicas. Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR-DAD das frações apontaram, assim, para a concordância com uma baixa eficiência de separação, revelando uma identidade estrutural comum entre os componentes de cada extrato, que mesmo após sucessivas etapas de otimização da técnica analítica, permaneceram apresentando picos parcialmente resolvidos, consoantes à observação de dois

conjuntos distintos de compostos interrelacionados, claramente representados na comparação do EEGP “marrom-escuro” com sua fração acetato de etila (Figura 2), equivalentes pelos valores de CIM (62,5-31,25  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentados no biomonitoramento.



**Figura 2.** Perfis cromatográficos (mAU x minutos) por CLAE-FR-DAD coincidentes entre EEGP “marrom-escuro” (A) e fração acetato de etila (B), e a concentração da bioatividade em F1 (C) – Leitura em 280 nm.

Seguindo o roteiro de prospecção, submeteu-se a fração acetato de etila do EEGP “marrom-escuro”, que se destacou pela maior atividade na etapa de purificação preliminar, à bioautografia. Apesar de ser concebida, originalmente, para seleção de extratos em trabalhos de triagem (VALGAS et al., 2007), esta técnica confere uma visão exploratória do perfil de separação por CCD dos compostos contidos em uma mistura, fornecendo parâmetros para as etapas seguintes de fracionamento, quanto ao comportamento dos compostos responsáveis pela formação dos halos de inibição em relação às bandas reveladas na placa controle.



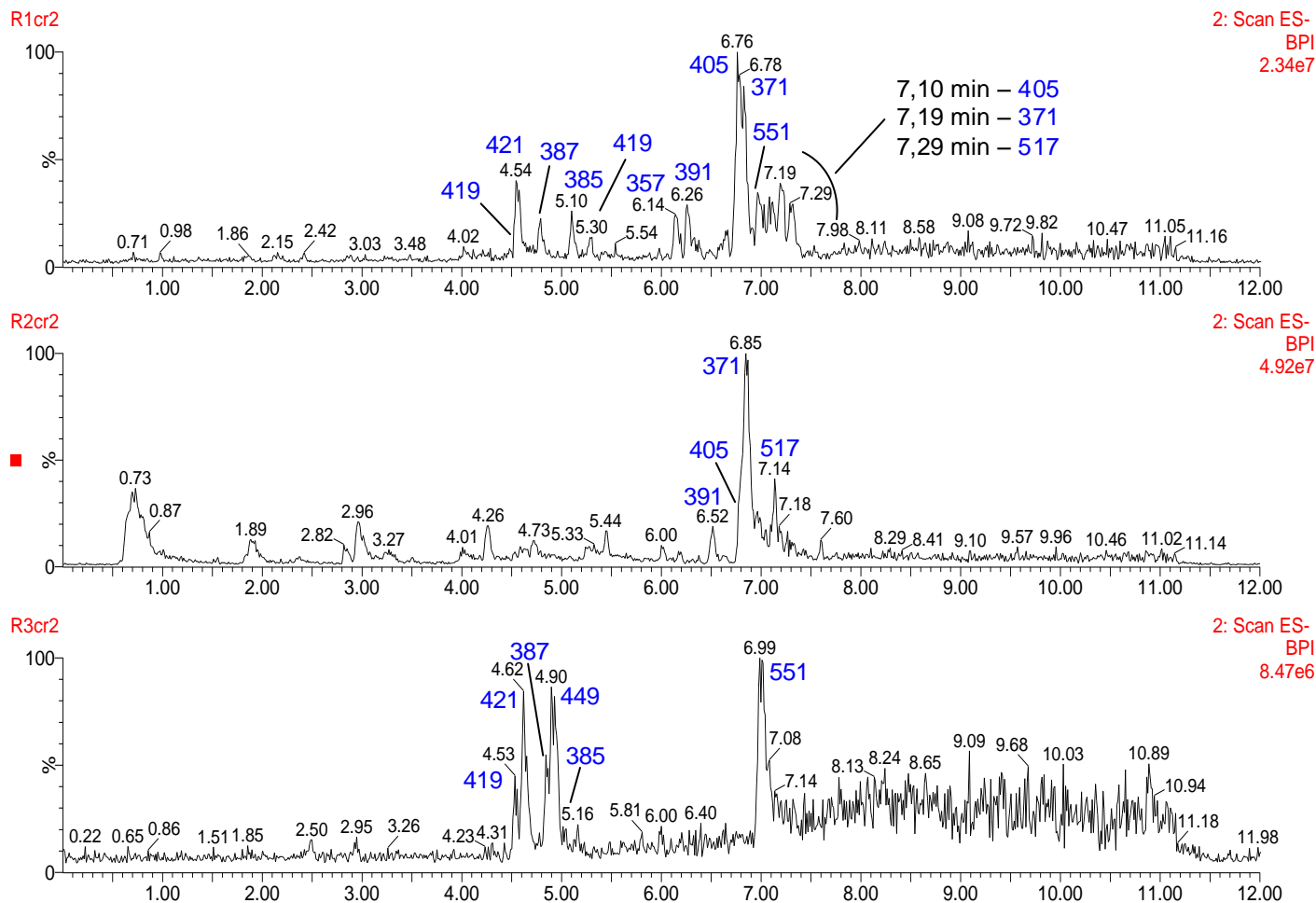
**Figura 3.** Bioutografia da fração acetato de etila do EEGP “marrom-escuro”

Em vista das seis bandas selecionadas pela bioautografia (Figura 3), que podem ser atribuídas ao mesmo número de compostos diferentes entre si, somado ao exíguo rendimento extrativo da fração acetato de etila (enquanto o extrato representava de 1 a 5% p/p da amostra bruta, a fração reduzia esta massa a 30%) e à quantidade limitada disponível de geoprópolis “marrom-escuro” – não havendo compatibilidade química dos lotes seguintes requeridos ao meliponicultor, verificada por CLAE-FR-DAD – optou-se por submeter o EEGP diretamente à cromatografia em coluna de sílica “clássica”, no intuito de possibilitar um fracionamento mais criterioso dos compostos pretendidos, valendo-se da irrelevância depreendida da etapa de partição nesse processo.

Através da transposição da técnica em escala piloto para escala preparativa, agruparam-se os compostos em frações de polaridade crescente, sendo que a primeira, F1, respectivamente a mais apolar, apresentou o menor intervalo de CIM (1,95 – 0,98 µg/mL), e como tal, elegível ao sub-fracionamento. Pela observação do caráter seletivo de F1 (Figura 2), a qual perde o conjunto de compostos que se mostra bioativamente inócuo no EEGP “marrom-escuro” e na sua fração acetato de etila, delimitando a combinação de substâncias no cromatograma responsável pela atividade antibacteriana potencializada, os picos ainda reproduziam, da mesma forma, a baixa resolução obtida pelos meios de uma técnica refinada, sugerindo a tentativa direta de isolamento dos compostos por CLAE-FR-DAD no modo semi-preparativo. Porém, não obstante os estudos de otimização das corridas cromatográficas, em ambos os modos analítico e semi-preparativo, a coleta das sub-frações monitoradas por detecção dos compostos em relação a sua absorção no UV, decorrida etapa prévia de rastreamento dos picos mais ativos a serem isolados (SF2, 1,95 – 0,98 µg/mL e SF3, 7,81 – 3,90 µg/mL), levou a resultados equivocados pela intensa sobreposição de sinais na região selecionada do cromatograma, que mascararam o perfil espectral dos compostos de interesse (Figura 4).

Na ausência de uma substância pura isolada e amostra suficiente para implementar novas metodologias de fracionamento, o recurso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial mostrou-se como alternativa mais adequada à caracterização química de F1, SF2 e SF3, tomando por base o espectro de <sup>1</sup>H-RMN obtido para F2 (7,81 – 3,90 µg/mL). Com valores de atividade duas vezes menores que F1, porém intimamente relacionada a esta pelas informações espectrais no UV e de massas, F2 apresentava-se relativamente mais purificada e passível de identificação (Figura 4), se evidenciando como padrão de comparação válido para a proposição de um núcleo estrutural comum entre os compostos detectados. Os perfis de fragmentação dos principais íons selecionados por um *fingerprint* inicial dessas amostras revelaram basicamente dois fragmentos mais proeminentes (Figura 5): um deles correspondendo a uma unidade molecular bastante rígida, característica da predominância de ligações C-C ciclizadas, e por isso deficiente em pontos de fragmentação que possam ser estabilizados por mecanismos de rearranjo; o outro, de razão massa/carga (*m/z*) 147 no modo negativo, presente no composto do pico majoritário de F2, assim como em SF3 (derivando dos íons de 551 *m/z*), e naqueles de F1 e SF2 (relacionados ao íon 517

m/z), origina o primeiro pela fragmentação da massa do íon pseudomolecular  $[M-H]^-$ , na medida em que representa a exata diferença entre as massas de ambos.



**Figura 4.** Cromatogramas do Pico Base por CLAE-FR-ESI-EM de F1 (R1), SF2 (R2) e F2 (R3) com mapeamento dos principais íons (m/z) correspondentes aos tempos de retenção

Como forma de alcançar dados que delineassem informações estruturais mais concisas em termos de identificação, recorreu-se aos espectros de EM<sup>3</sup>, obtidos a partir da injeção direta de F2, aplicando-se aumento da energia de ionização favorável à fragmentação na fonte de todas as moléculas da amostra, seguida da seleção dos íons descritos anteriormente ( $[M-H]^- = 551 \text{ m/z} \rightarrow 147 \text{ e } 403 \text{ m/z}$ ) para segunda fragmentação na câmara de colisão. Em linhas gerais, a estrutura representativa do íon 551 m/z compreende um resíduo de ácido cinâmico, caracterizado pelo sinal de 147 m/z, em ligação éster com um núcleo fundamental, indicativo de natureza terpênica (403 m/z), sendo compatível com o espectro de <sup>1</sup>H-RMN de F2, que apesar da presença de demais compostos, parece envolver, de

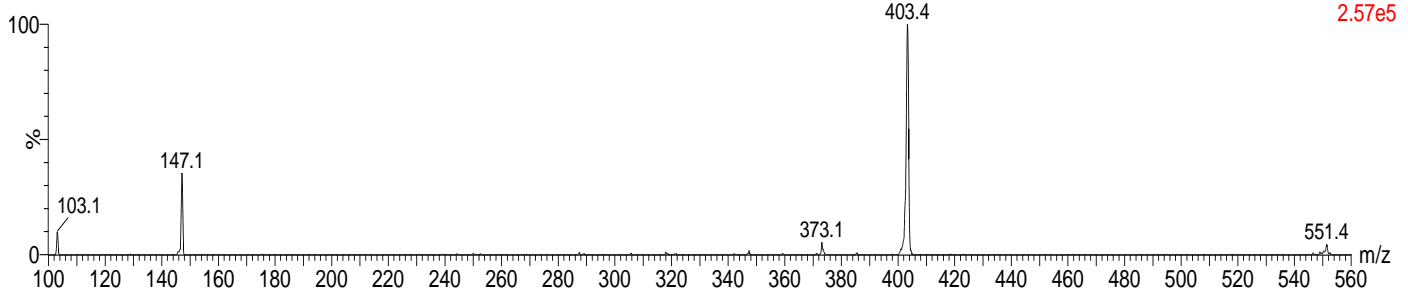
acordo com a uniformidade nos perfis de fragmentação encontrados, correspondentes ao do íon 403 m/z (Figura 5), identidades estruturais comuns a uma classe única de metabólitos secundários (terpenóides) derivados das resinas coletadas para elaboração de geoprópolis.

Em contraste com a analogia estrutural recorrente entre os compostos de frações e sub-frações, atribuível pela proposição de um núcleo básico em comum, que demonstram compatibilidade entre a referência, adotada como parâmetro de comparação, dos ácidos *ent*-caurenóicos isolados por Nascimento e Oliveira (2001) e a análise de F2 (Figura 6), os espectros de massas obtidos dos extratos de todos os lotes de geoprópolis disponibilizados confirmaram, apoiados pela distribuição dos íons correspondentes nos cromatogramas, a discrepância consistente entre os perfis químicos avaliados para coletas intra-espécie e intra-meliponário (Figura 7).

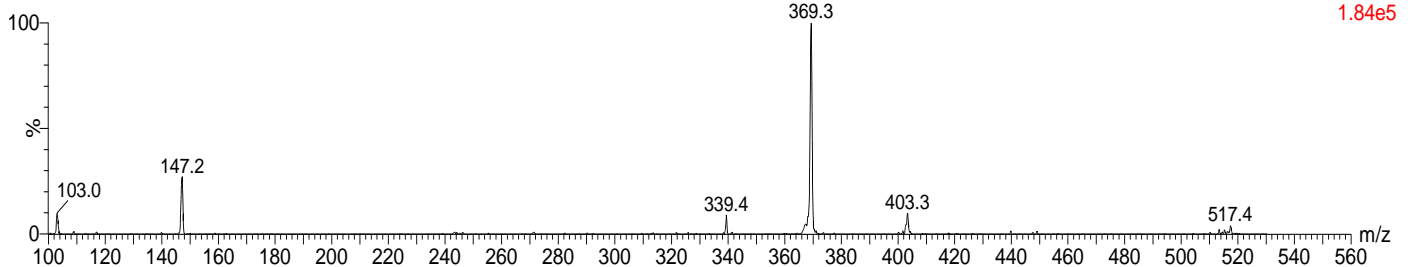
Considerando as propriedades antiestafilocócicas promissoras contidas no EEGP “marrom-escuro”, estabeleceu-se a determinação da CIM/CBM em relação a um painel de linhagens patogênicas selecionadas de uma coleção sistematizada, que forneceram dados para avaliação do perfil antimicrobiano, correlacionando a variabilidade dos componentes presentes no EEGP “marrom-escuro” com suas frações acetato de etila, F1 e F2, e sub-frações SF2 e SF3, em referência aos níveis inibitórios do fármaco (substância pura) cloranfenicol, adotado como padrão de atividade (Tabela 1).



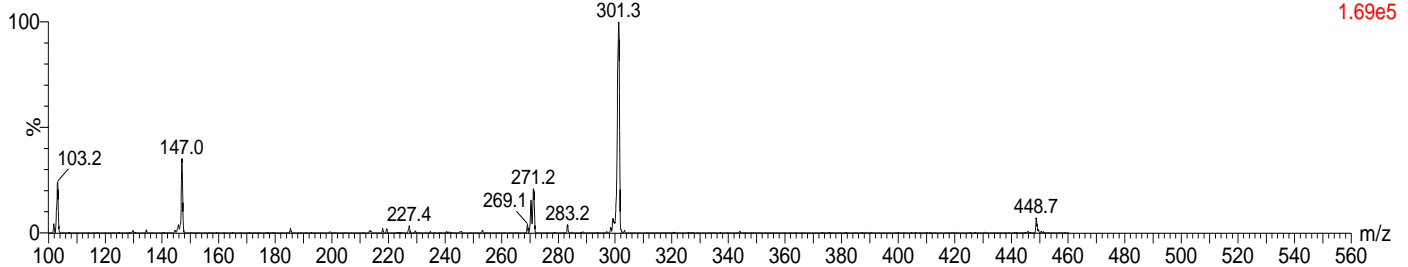
R1ms33 7 (7.016) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (3:16)

14: Daughters of 551ES-  
2.57e5

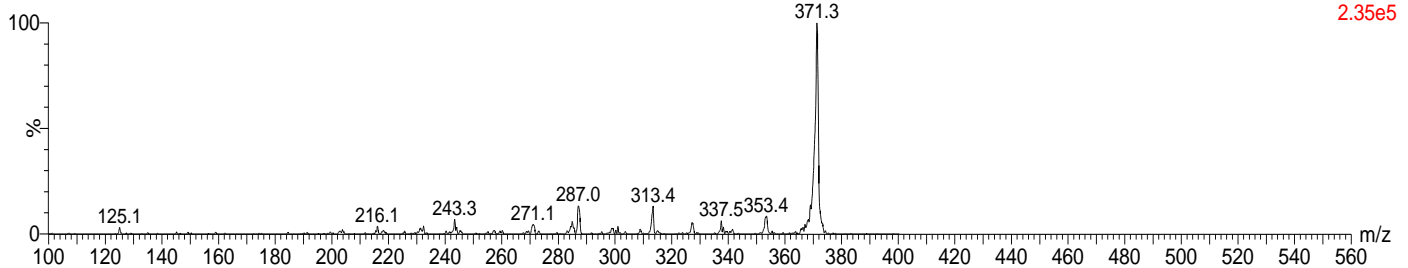
R1ms33 20 (7.139) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (17:40)

13: Daughters of 517ES-  
1.84e5

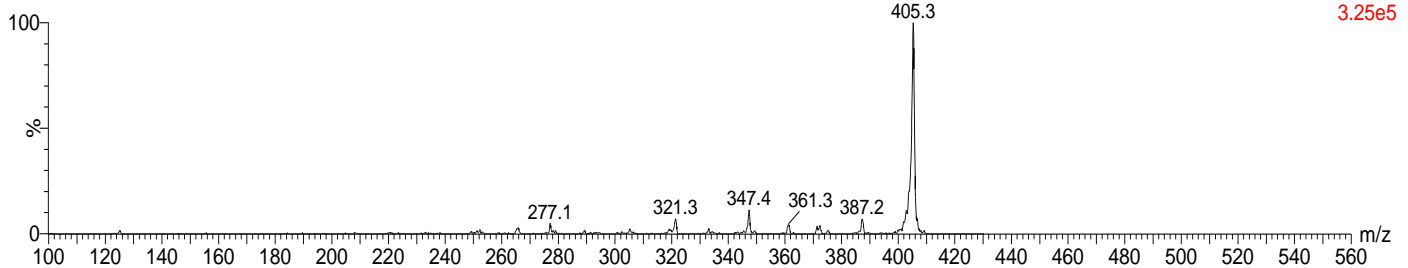
R3ms33 27 (4.938) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (23:30)

5: Daughters of 449ES-  
1.69e5

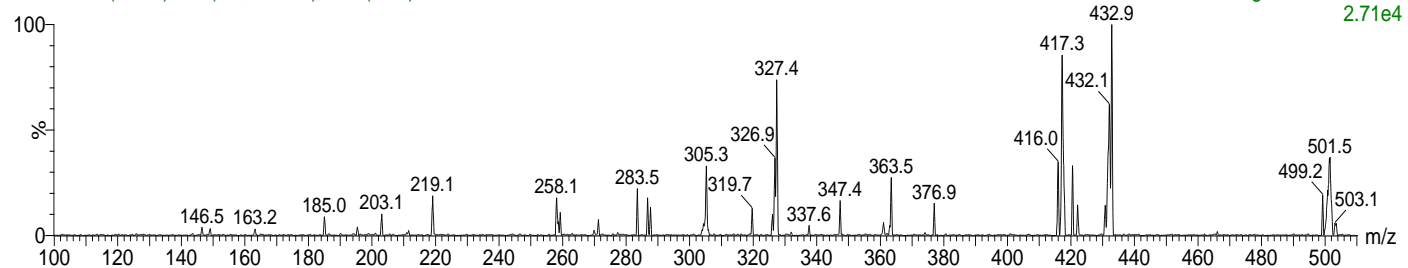
R1ms33 14 (6.861) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (9:23)

12: Daughters of 371ES-  
2.35e5

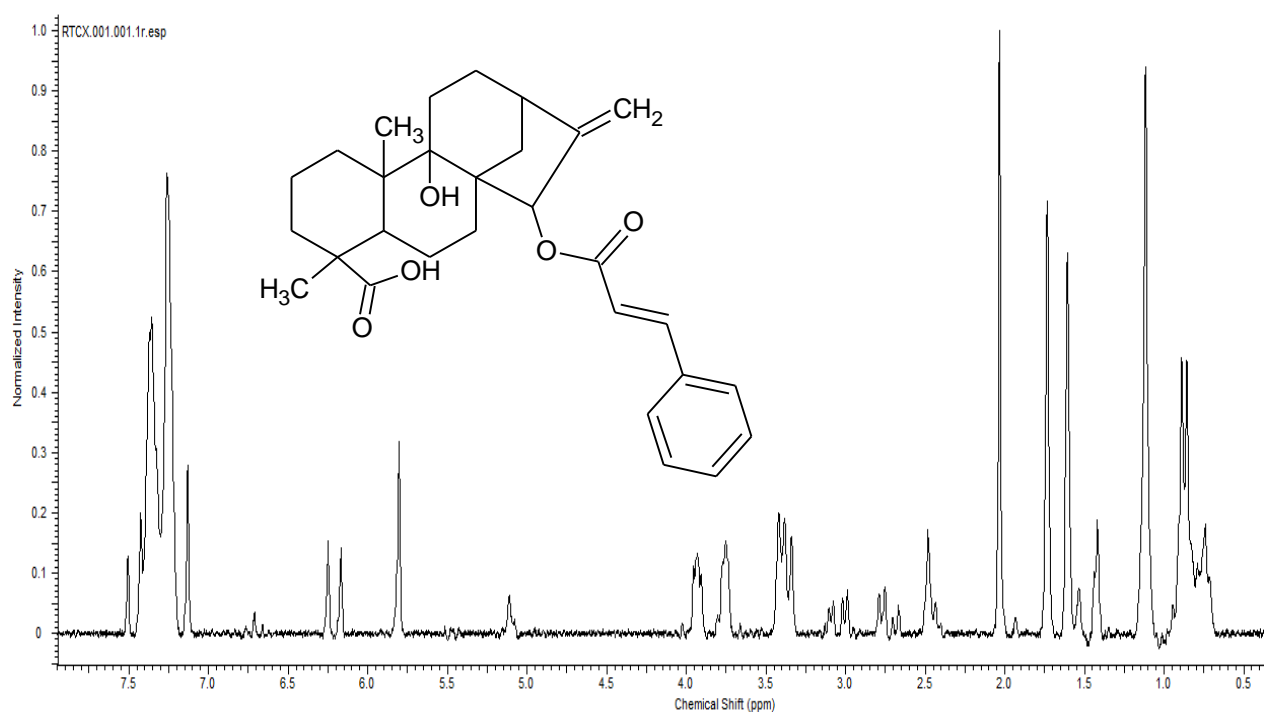
R1ms33 16 (6.801) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (11:37)

11: Daughters of 405ES-  
3.25e5

R1ms33 8 (7.167) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (7:12)

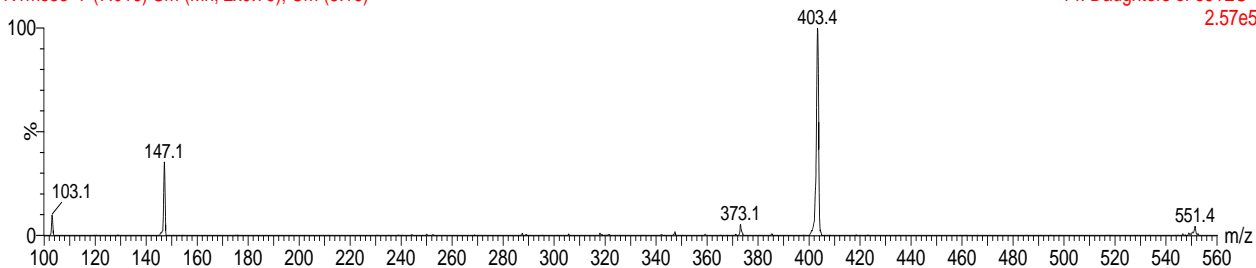
15: Daughters of 501ES-  
2.71e4

**Figura 5.** Espectros EMEM no modo negativo representativos dos principais ions analisados em geoprópolis de *Melipona scutellaris*



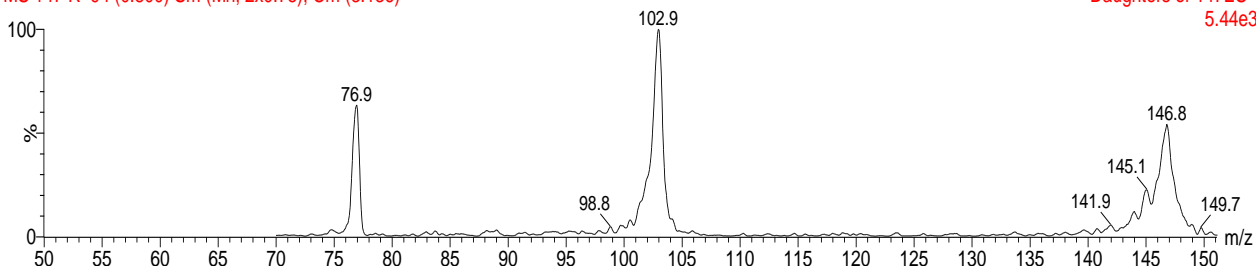
R1ms33 7 (7.016) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (3:16)

14: Daughters of 551ES-  
2.57e3



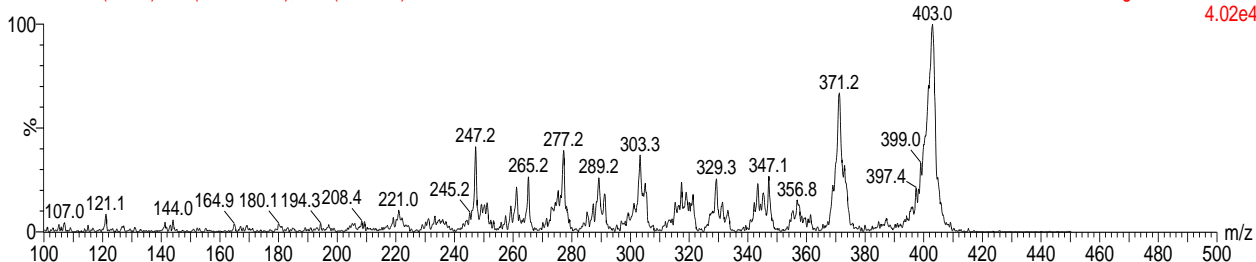
MS 147 R 94 (0.800) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (3:136)

Daughters of 147ES-  
5.44e3

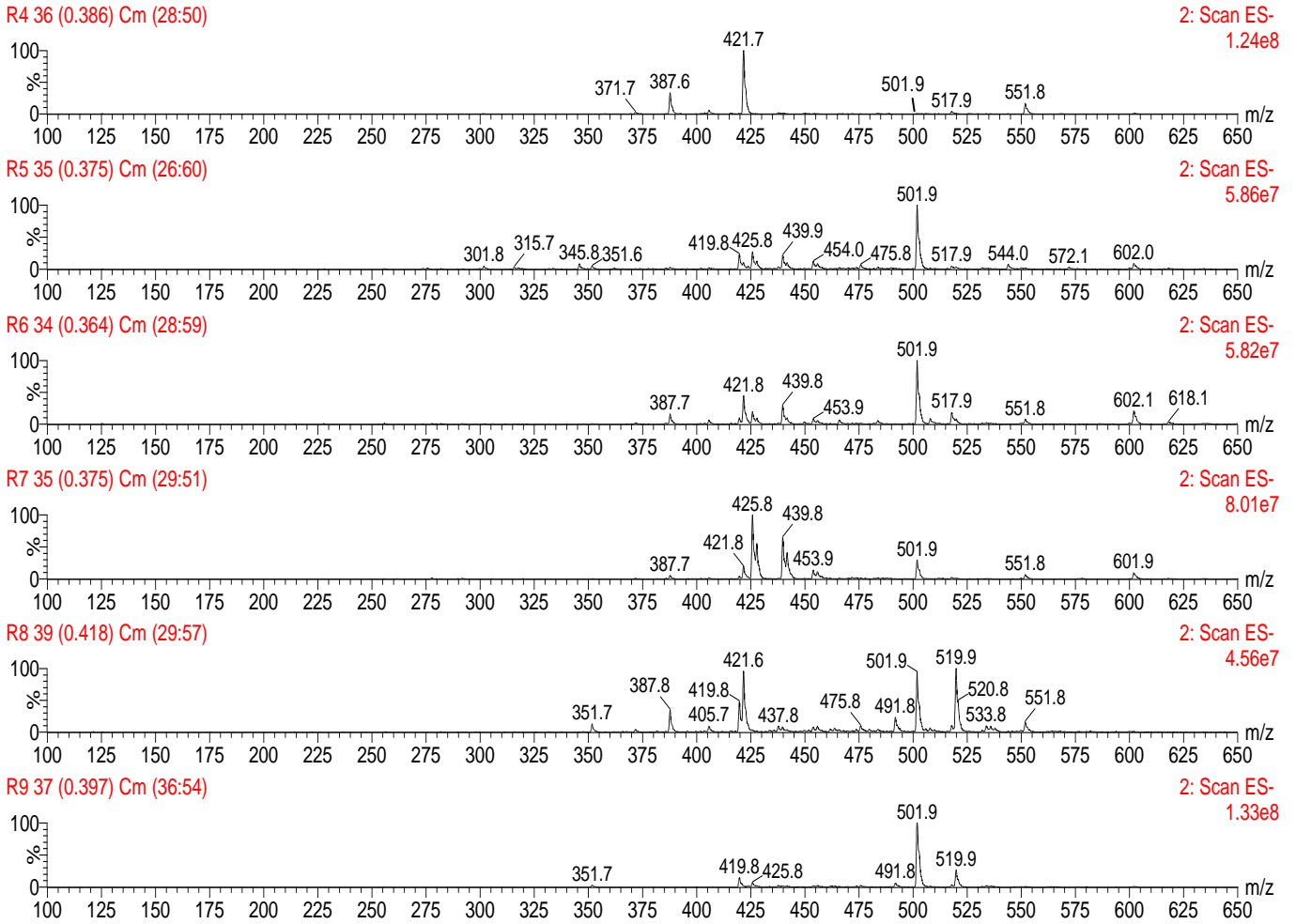


MS403 183 (1.557) Sm (Mn, 2x0.75); Cm (138:210)

Daughters of 403ES-  
4.02e4



**Figura 6.** Na ordem, de cima para baixo: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de F2, com a fórmula estrutural primária sugerida pelo trabalho de Nascimento e Oliveira (2001); Espectro EMEM no modo negativo de 551 m/z; Espectro EMEM/EM no modo negativo de 147 m/z; Espectro EMEM/EM no modo negativo de 403 m/z.



**Figura 7.** Espectros de massas por ESI-EM no modo negativo de extratos das seis amostras de geoprópolis analisadas (R4: EEGP “marrom-escuro”).

**Tabela 1.** Caracterização do perfil antimicrobiano do EEGP “marrom-escuro”, das frações acetato de etila, F1 e F2 e das sub-frações SF2 e SF3

	CIM (µg/mL)							CBM (µg/mL)						
	EEGP	EtOAc	F1	F2	SF2	SF3	Clor*	EEGP	EtOAc	F1	F2	SF2	SF3	Clor*
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5	62,5	1,95	3,91	1,95	7,81	<	500	1000	>	>	>	>	>
	31,25	31,25	0,98	1,95	0,98	3,91	2,03	250	500	62,5	125	62,5	125	65
MRSA	7,81	7,81	3,91	7,81	62,5	125	4,06	>	>	>	>	>	>	65
	3,91	3,91	1,95	3,91	31,25	62,5	2,03	250	250	125	250	62,5	125	32,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31,25	31,25	31,25	7,81	31,25	31,25	32,5	500	1000	250	>	>	31,25	32,5
	15,625	15,625	15,625	3,91	15,625	15,625	16,25	250	500	125	125	62,5	15,625	16,25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	62,5	62,5	>	>	>	>	8,125	500	1000	>	>	>	>	16,25
	31,25	31,25	500	500	62,5	125	4,06	250	500	500	500	62,5	125	8,125
<i>Micrococcus luteus</i>	15,625	15,625	15,625	7,81	31,25	125	<	500	500	125	500	>	>	<
	7,81	7,81	7,81	3,91	15,625	62,5	2,03	250	250	62,5	250	62,5	125	2,03
<i>Bacillus cereus</i>	15,625	15,625	15,625	7,81	7,81	62,5	<	500	>	>	>	>	>	<
	7,81	7,81	7,81	3,91	3,91	31,25	2,03	250	1000	125	125	62,5	125	2,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	31,25	31,25	125	500	31,25	>	4,06	>	>	>	>	>	>	>
	15,625	15,625	62,5	250	15,625	62,5	2,03	1000	1000	250	500	62,5	62,5	65
<i>Enterococcus faecium</i>	250	125	>	>	-	-	8,125	>	>	-	-	-	-	-
	125	62,5	500	500	-	-	4,06	1000	1000	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	62,5	62,5	>	>	-	-	4,06	>	>	-	-	-	-	-
	31,25	31,25	500	500	-	-	2,03	1000	1000	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	500	500	>	>	>	>	4,06	>	>	-	-	-	-	4,06
	250	250	125	500	62,5	125	2,03	1000	1000	-	-	-	-	2,03
<i>Escherichia coli</i>	> 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	> 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	> 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	> 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bordetella bronhiseptica</i>	1000	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	500	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Cloranfenicol

## 7. DISCUSSÃO

As resinas vegetais, como recurso de defesa limitante à sobrevivência das colméias, influenciam os comportamentos de coleta demonstrados pelas abelhas, em função de mecanismos adaptativos relacionados à disponibilidade geográfica e sazonal de suas origens botânicas, conforme a extensiva documentação existente sobre as variações na composição de própolis de *Apis mellifera* (SALATINO et al, 2005), que propiciam padrões de comparação viáveis com meliponíneos. Nesse aspecto, a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, foco deste estudo, compartilha traços de especialização para geoprópolis contendo perfil diterpênico claramente predominante, apesar das particularidades estruturais inter-amostras, com as abelhas melíferas de climas temperados, em especial da Europa, onde as escassas fontes de própolis induzem a coleta nas espécies típicas de *Populus* (álamo), ricas em flavonóides e com diminutas proporções de ácidos fenólicos e seus ésteres (BANKOVA, 2005, SAWAYA et al, 2006). No entanto, apesar da abundante biodiversidade das floras neotropicais presentes na América Latina, que marcaram, inclusive, a classificação de 13 tipos de própolis de *Apis mellifera* africanizada entre os diferentes ecossistemas do extenso território brasileiro (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000), refletindo em uma capacidade moduladora da afinidade por fontes de resinas diversas, as abelhas tendem a conservar o caráter discriminativo nas relações de coleta, o que se evidencia na preferência pelas espécies vegetais: *Baccharis dracunculifolia*, precursora da própolis verde (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002) – principal produto apícola brasileiro de comercialização internacional – constituída, em contrapartida às variedades européias, pela predominância de derivados do ácido cinâmico e escassez de flavonóides, além de pequenas concentrações dos princípios voláteis mono e sesquiterpenos, e não-voláteis, sesqui-, di- e triterpenos (SALATINO et al, 2005); *Clusia* spp., natural de Venezuela e Cuba, que confere abundância de benzofenonas polipreniladas às própolis de locais endêmicos dessa planta; e a leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, descoberta recentemente como origem botânica da própolis vermelha brasileira (SILVA et al., 2007) e cubana (PICCINELLY et al., 2011), que chegou a ser vinculada também às espécies de *Clusia* spp., possuindo triterpenos e isoflavonóides adicionais em sua composição (TRUSHEVA et al., 2006).

Ao contrário das *Apis mellifera* européias, no Brasil as abelhas melíferas africanizadas desenvolvem um perfil de coleta sazonal de acordo com a disponibilidade ou preferência por determinada planta em cada estação, e acrescentam mais uma variável na elaboração de constituições químicas (bio)diversificadas para própolis. O parâmetro de comparação estabelecido para a própolis verde, em referência ao grande destaque que recebe na pesquisa científica, parcialmente motivado por seu apelo econômico, define um gradiente de composição, para amostras das mesmas colméias, variando de derivados fenólicos absolutos nos meses de primavera/verão, provenientes de *B. dracunculifolia*, até proporções superiores de diterpenos, atribuídos a espécies de *Araucaria*, e, em menor escala, de triterpenos, no outono/inverno (BANKOVA et al., 1998b). Como ocorre entre própolis ricas em flavonóides de climas temperados e aquelas de ácidos fenólicos tropicais, em que há correspondência com diferentes atividades biológicas (SALATINO et al, 2005), inclusive antimicrobiana, que se mantem inalterada também em diferentes épocas do ano pelos estudos com própolis verde da mesma localidade (SFORCIN et al., 2000), as abelhas parecem contar com um sistema sensorial seletivo para recursos químicos vegetais, independente de sua classe estrutural, que satisfaçam as funções de defesa dentro da colmeia, voltada principalmente contra patógenos microbianos de espécies gram-positivas (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Em última instância compreendem-se os fatores genéticos das abelhas melíferas, que podem influenciar na preferência constante por fontes ricas em di- e triterpenos, aparentemente ignorando a flora abundante em *B. dracunculifolia* (TEIXEIRA et al., 2008). O que remete, por conseguinte, à diversidade de espécies existentes de meliponíneos, em geral condicionadas ao mesmo comportamento (SAWAYA et al, 2007), apesar do limitado alcance de voo que desenvolvem (distâncias em um raio de cerca de 500 m, comparado à média de 1,5 Km percorridos pelas espécies de *Apis*), compatível com a proximidade dos densos recursos disponíveis em seus habitats tropicais nativos (VELIKOVA et al, 2000a). Da mesma forma, essas abelhas podem compartilhar as mesmas fontes de resinas, considerando as identidades químicas com própolis de *D. ecastophyllum* e *Araucaria* (SAWAYA et al, 2007), mas, diferente dos apíneos, os meliponíneos, representados por *Tetragonisca angustula*, apresentam uma capacidade estritamente seletiva para os triterpenos da espécie vegetal *Schinus terebenthifolius*, conhecida localmente

como aroeira-vermelha, quando esta pode ser detectada pela sua ocorrência na maioria dos ecossistemas brasileiros, bem como em toda América do Sul (SAWAYA et al, 2006).

Dado à grande abundância de espécies de abelhas nativas espalhadas por todas as regiões do país, o enfoque nas pesquisas de própolis torna-se difuso em âmbito regional, contrastando com a centralização observada sobre *Apis mellifera*, o que dificulta o embasamento de dados experimentais de maneira absoluta. Como no caso de geoprópolis de *Melipona scutellaris*, avaliada apenas pelos registros de seu perfil químico associado a íons diagnóstico comparativos por espectros de massas (SAWAYA et al, 2007), além do único estudo a definir, em conjunto, sua composição e atividade biológica. Segundo Velikova et al. (2000a), amostras coletadas em Recife-PE revelaram conteúdos equivalentes de ácidos benzoicos e açúcares, acompanhados de uma proporção mínima de ácidos cinâmicos, sendo totalmente dissociados da natureza diterpênica apontada, no presente trabalho, para os extratos da Bahia; que representam uma exceção às demais própolis nordestinas de outras abelhas, assemelhando-se às variedades provenientes do Mato Grosso do Sul, Espírito Santo e Paraná, para as quais observou-se atividades inibitórias, comuns aos extratos de geoprópolis contra *S. aureus*, em detrimento de *E. coli* e com intensidade mínima em *C. albicans*, proporcionais aos níveis de diterpenos.

Interessante observar a confluência nos comportamentos sensoriais das abelhas de ambas as famílias, caracterizados pelo perfil alternante de atração adaptável entre exudatos vegetais fenólicos e terpênicos. Nas própolis brasileiras de *Apis mellifera*, encontram-se referências do isolamento de compostos diterpênicos com atividade citotóxica em linhagens celulares de carcinoma hepático (MATSUNO et al., 1997) e pulmonar (MATSUNO, 1995), e efeito supressor de incidência e crescimento de tumores cutâneos em ratos (MITAMURA et al., 1996), associados aos derivados bicíclicos do tipo clerodano; além da atividade antibacteriana contra *S. aureus* desempenhada pelas estruturas correspondentes do tipo labdano, consideradas também indicadores de origem botânica da variedade de própolis estudada por Bankova et al. (1996), em relação às resinas produzidas por espécies do gênero *Araucaria*, típicas da região Sul do país.

Encontrados pela primeira vez em geoprópolis de *Melipona scutellaris*, equivalente à descoberta de ácidos caurenóicos em própolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, com atividade moderada contra *S. aureus* (VELIKOVA et

al., 2000b), os diterpenos foram propostos com base nas propriedades únicas destes compostos naturais de configurarem esqueletos carbônicos tricíclicos ou tetracíclicos combinados com proporções variáveis de oxigênio, produzindo um núcleo quimicamente rígido, em termos de perfis de fragmentação (KANOJIYA; YADAV, 2008, ZHOU et al., 2008, ZHOU et al., 2009, ZIMMERMANN, 2011). Sesquiterpenos também podem ser incluídos nesse grupo, porém mesmo os de natureza não-volátil, menos comuns que os voláteis em própolis (SALATINO et al, 2005), produziram fragmentos de massas inferiores às obtidas das amostras estudadas. A presença do resíduo cinamoilóxi, também relativamente comum na biossíntese de sesqui- (WAYMAN et al., 2010, PORTILLO et al., 2005) e diterpenos (RACCUGLIA et al., 2010, PROMSAWAN et al., 2003, PRANITHANCHAI et al., 2009), forneceu indícios determinantes para excluir as possibilidades de triterpenos, devido às claras incompatibilidades de massas, além de outras classes de compostos aromáticos, desconsideradas pela ausência inerente desse resíduo, sendo função ainda das projeções de espectros UV estimadas acima da faixa de 280 nm, em que ocorre o máximo de absorvância dos compostos fracionados, e do grau de polaridade atrelado aos processos cromatográficos.

Por outro lado, as inconsistências pontuais entre os *fingerprints* dos seis lotes de geoprópolis coletados aleatoriamente podem ser explicadas, na visão de Salatino et al. (2005), como um traço evolutivo desenvolvido pelas abelhas para contrapor o favorecimento de resistência bacteriana. Características que podem levar as operárias de *Melipona scutellaris* a realizar coletas, simultaneamente, em diferentes plantas correlacionadas pela constituição química de suas resinas. Não obstante, todos os extratos apresentaram o íon diagnóstico de massa nominal 501 m/z (com perfil de fragmentação particularmente destoante dos demais íons – Figura 5) como um dos marcadores indicativos desse tipo de geoprópolis (Figura 7), o qual aparece, invariavelmente, em variedades de outras espécies de meliponíneos, e até mesmo em *Apis mellifera*, principalmente da Bahia e Amazonas, conforme relatado por Sawaya et al. (2007). Apontando para uma preferência de origem botânica ainda mais abrangente do que *S. terebenthifolius*, discernível do ambiente pela possibilidade de estar intrinsecamente implicada em algum tipo de potencial biológico central, perseguido pelas abelhas nas composições de própolis, embora o mesmo sinal não tenha sido encontrado durante o fracionamento de compostos antibacterianos (Figura 4).



Extratos vegetais contendo substâncias intimamente relacionadas em estrutura podem representar um grande desafio às tentativas de isolamento bioguiado, especialmente quando não se conhece, a princípio, a natureza das classes químicas envolvidas, mesmo empregando técnicas cromatográficas com alto poder de resolução, como a CLAE em modo preparativo. Por isso, quantidades superestimadas de amostras tornam-se necessárias à realização fundamentada das etapas de otimização de cada método, que resulte nos compostos de interesse isolados, tendo em vista os exemplos constantes da literatura, como o da obtenção de derivados cinamoilcaurenóicos, inclusive enantiômeros, integralmente através de cromatografia em coluna de sílica “clássica” (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001).

Reformulando, assim, a estratégia para identificação dos compostos antimicrobianos, observa-se que análises comparativas extraídas das informações do sub-fracionamento podem, no entanto, conferir indícios plausíveis no rastreamento dessas estruturas, monitorado pelos níveis de atividade determinados em relação ao parâmetro estabelecido de *S. aureus*. Prova disso é apresentada na Figura 4, em que nota-se a transição de um perfil cromatográfico complexo de F1 para SF2, bem mais purificado, porém sem qualquer perda de atividade, que, comparado aos cromatogramas de SF3 (obtido por técnica similar de CLAE-FR-EM) e F2, aponta para a inatividade dos íons na faixa de 385-450 m/z, excluídos de SF2, mas presentes nas outras duas, com variação mínima das concentrações (em SF3 representado por um único pico majoritário de 405 m/z), sugerindo o íon 551 m/z como responsável pela atividade de ambas, o que certamente se relaciona com o aumento de intensidade do íon 517 m/z em SF2, apesar do aumento proporcional de 371 m/z – ao que se pode atribuir a manutenção das propriedades inibitórias de F1, em SF2 e SF3, pela correspondência dos prováveis compostos ativos com a ligação de um resíduo de ácido cinâmico ao núcleo diterpênico.

Diterpenóides são reconhecidos, em geral, pelo seu caráter, coincidente com própolis, de perfil ativo orientado para gram-positivos, e inócuo contra gram-negativos. As interações com a bicamada lipídica das membranas celulares são consideradas como as premissas da atividade antibacteriana dos compostos diterpênicos, a qual aumenta conforme a capacidade dessas estruturas de estabilizar uma interface anfifílica entre o seu esqueleto carbônico altamente lipofílico, ligado, estritamente, a um ou mais grupos ácidos hidroxílicos ou carboxílicos estericamente dissociados, e as cadeias lipídicas da membrana

ancoradas nos grupos fosforilados da superfície celular, aceptores de ligações de hidrogênio. Mecanismo esse que, apesar de não fornecer uma explicação absoluta para outros compostos da classe, está associado à ação bacteriolítica por lise de membrana do ácido abiético (URZÚA et al, 2008).

Devido à hidrofobicidade dos terpenóides, a membrana externa dos gram-negativos, constituída de lipopolissacarídeos, impõe uma barreira de cargas negativas, ausente da composição exclusiva em peptidoglicanos da parede celular dos gram-positivos, impedindo as atividades ao nível de membrana citoplasmática, que incluem ainda, para os modelos de *S. aureus* e *B. cereus*, o desacoplamento da cadeia respiratória através da redução do consumo de oxigênio, levando à inibição da síntese de ATP, o que provoca a permeabilização da membrana e lise bacteriana (TAPIA et al., 2004, TORRES-BUSTOS, 2009); além do mecanismo independente de modulação das bombas de efluxo de multiresistência a fármacos, que tem apresentado aplicações promissoras para o totarol – já identificado nas resinas coletadas pela abelha sem ferrão *Frieseomelitta silvestrii languida* (PATRICIO et al., 2002) – descoberto, à princípio, pela potente atividade da ordem de CIMs a 2µg/mL contra *S. aureus* (SMITH et al, 2007). Atividade essa que pode render importantes associações para os derivados diterpênicos de geoprópolis, que além da intensa inibição do crescimento de cepas resistentes nos mesmos padrões de *S. aureus* (MRSA), teriam a função de facilitadores sinérgicos da ação dos antibióticos prescritos pela clínica médica e de ação comprovada, evitando sua expulsão das células, o que torna esses compostos promessas para o combate de infecções graves, potenciais desencadeadoras de bacteremia, endocardite e pneumonia hemolítica, cada vez mais prevalentes em ambientes hospitalares e nas comunidades de todo o mundo (SMITH et al., 2005, GARCÍA-LARA; MASALHA; FOSTER, 2005). O acréscimo do grupo cinamoilóxi à molécula pode, assim, ter a função de aumentar sua lipofilicidade, pela maior densidade carbônica, além de se ligar a um dos grupos oxigenados doadores de hidrogênio, minimizando ligações intramoleculares interferentes.

Com relação às linhagens empregadas nos ensaios de CIM/CBM, selecionaram-se as representantes mais reconhecidas pelo potencial patogênico largamente caracterizado nas principais infecções humanas, abrangendo as diversas divisões morfológicas e metabólicas da classificação de gram: entre os cocos gram-positivos, foram dispostos além de *S. aureus*, modelo biológico adotado

para o ensaios de biomonitoramento, os congêneres *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, seguido de *M. luteus*, que, apesar de seu caráter oportunista, correlacionam-se pela propriedade comum de colonização de pele e mucosas; o mesmo princípio empregado para *S. agalactiae* em relação a *S. anginosus*, que apresentaram, entre as espécies de *Streptococcus*, densidade de crescimento satisfatória no meio de cultura estabelecido; e de *E. faecium* para *E. faecalis*. Pelos quais foi possível observar, à exceção da atividade incomparável contra *S. aureus*, uma susceptibilidade menos pronunciada das variantes patogênicas, que podem guardar relação com os mecanismos evolutivos de resistência à imunidade do hospedeiro humano, considerando prováveis restrições da permeabilidade de membrana conforme proposto para os diterpenos; entre os bacilos, *B. cereus* destacou-se pela atividade equiparável contra *S. aureus*. Para os gram-negativos, optou-se pelos diferentes tipos metabólicos de bacilos aeróbios, com ressalva para *Bordetella bronchiseptica*, que compartilha caracteres genéticos com o patógeno humano *B. pertussis*, apresentando uma tênue sensibilidade ao EEGP “marrom-escuro” e fração acetato de etila, assim como *C. albicans*, levedura comumente utilizada em testes de atividade biológica, completando assim o painel antimicrobiano. Nos testes de CBM, confirma-se ainda o perfil essencialmente bacteriostático dos compostos de frações e sub-frações, contrastando com a hipótese abordada de mecanismo de ação por lise celular, sendo ainda necessários estudos aprofundados para conciliar o isolamento e elucidação dos compostos ativos com as determinações de relação estrutura-atividade do efeito antibacteriano.

## 8. CONCLUSÕES

Abordagens exploratórias do perfil químico de geoprópolis de *Melipona scutellaris* propiciaram uma alternativa viável ao planejamento tradicional baseado no isolamento de compostos bioativos, possibilitando uma caracterização primária associativa por meio dos espectros UV, EM/EM e RMN, que revelaram uma identidade química, pouco observada em termos de própolis, entre os constituintes de extrato, frações e sub-frações. Inferições relacionando os perfis antimicrobianos desses derivados atestaram essa equivalência qualitativa entre suas composições, além de suscitar novas propostas de elucidação das moléculas diterpênicas sugeridas, lançando mão de métodos cromatográficos compatíveis com a natureza de baixa polaridade dessas estruturas, que se correlacionam com propriedades polivalentes detectadas contra linhagens de bactérias gram-positivas.

Os meliponíneos propõem assim um olhar renovado sobre a descoberta de princípios ativos naturais, arduamente perseguidos na obtenção de respostas aos desafios impostos pela abordagem mecanística dos processos patológicos humanos, de forma que as publicações vigentes, dedicadas ao seu potencial, são responsáveis por desvelar um exército de espécies bioprospectoras, amplamente aplicáveis no delineamento bioguiado de protótipos de fármacos, que possam garantir seu comprometimento com as atemporais indefinições terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

A ABELHA URUÇU (MELIPONA SCUTELLARIS, LATREILLE 1811 – APIDAE, MELIPONINAE). 12 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/urucu>>.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. M. Ninhos de *Melipona scutellaris* L. em Coqueiros na Região do Litoral Norte e Metropolitana do Estado da Bahia. **Mensagem Doce**, n. 83, set. 2005.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapeutic practices among fishing communities in North and Northeast Brazil: A comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 82-103, abr. 2007a.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zotherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 541-555, set. 2007b.

ALVES, R. R. N.; LIMA, H. N.; TAVARES, M. C.; SOUTO, W. M. S.; BARBOZA, R. R. D.; VASCONCELLOS, A. Animal-based remedies as complementary medicines in Santa Cruz do Capibaribe, Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 44, jul. 2008.

ALVES, R. R. N.; LÉO NETO, N. A.; BROOKS, S. E.; ALBUQUERQUE, U. P. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 600-608, jul. 2009.

ARAÚJO, M. J. A. M.; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; LIBERIO, S. A.; MARCIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580-587, ago. 2010.

BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 51, n. 5-6, p. 277-280, maio/jun. 1996.

BANKOVA, V. S.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian Geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 5-6, p. 402-406, maio/jun. 1998a.

BANKOVA, V. S.; BAODOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361-367, 1998b.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, jan./fev. 2000.

BANKOVA, V. S. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29-32, mar. 2005.

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

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

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p.342-350, maio/jun. 2004.

BIESMEIJER, J. C.; HARTFELDER, K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Stingless bees: biology and management. **Apidologie**, v. 37, n.2, p. 121-123, mar./abr. 2006.

BIESMEIJER, J. C.; SLAA, E. J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, v. 37, n.2, p. 240-258, mar./abr. 2006.

BROWN, J. C.; CHRISTIAN A. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 5, p. 623-634, dez. 2001.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, abr. 1998.

CAMILO, M. B. B. O. **Análise da atividade biológica de própolis de Uruçu (*Melipona scutellaris*) proveniente do estado da Bahia**. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfe nas, 2008.

CAMPOS, V. A. C.; SANTOS JÚNIOR, H. M.; OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, H. W. P.; MACHADO, A. R. T.; TIRELLI, A. A. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1043-1049, nov./dez. 2011.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. The Antiquity and Evolutionary History of Social Behavior in Bees. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, jun. 2011.

CARVALHO-ZILSE, G.A.; COSTA-PINTO, M.F.F.; NUNES-SILVA, C.G.; KERR, W.E. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 758-765, jun. 2009.

CHOUDHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 363-367, maio 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada M7-A6 – Sexta Edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), v. 23, n. 2, 2003.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n.2, p. 275-292, mar./abr. 2006.

COSTA-NETO, E. M. The Use of Insects in Folk Medicine in the State of Bahia, Northeastern Brazil, With Notes on Insects Reported Elsewhere in Brazilian Folk Medicine. **Human Ecology**, v. 30, n. 2, p. 245-263, jun. 2002.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, I. M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7502-7509, set. 2007.

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

DUANGPHAKDEE, O.; KOENIGER, N.; DEOWANISH, S.; HEPBURN, H. R.; WONGSIRI, S. Ant repellent resins of honeybees and stingless bees. **Insectes Sociaux**, v. 56, n. 4, p. 333-339, nov. 2009.

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

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG, D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. E. E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635-640, jun. 2009.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, dez. 2001.

FERREIRA, F. S.; BRITO, S. V.; RIBEIRO, S. C.; ALMEIDA, W. O.; ALVES, R. R. N. Zootherapeutics utilized by residents of the community Poço Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 21, ago. 2009.

FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.

GARCÍA-LARA, J.; MASALHA, M.; FOSTER, S. J. *Staphylococcus aureus*: the search for novel targets. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 9, p. 643-651, maio 2005.

GHISALBERTI, E. L. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 2.

IKEGAKI, M. **Determinação de qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. 2001. 83f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

KANOJIYA, S.; YADAV, P. P. Fragmentation patterns of newly isolated cassane butenolide diterpenes and differentiation of stereoisomer by tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 10, p. 1413-1420, out. 2008.



KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996.

LEONHARDT, S. D.; BLÜTHGEN, N.; SCHMITT, T. Smelling like resin: terpenoids account for species-specific cuticular profiles in Southeast-Asian stingless bees. **Insectes Sociaux**, v. 56, n. 2, p. 157-170, jul. 2009.

LEONHARDT, S. D.; BLÜTHGEN, N. A Sticky Affair: Resin Collection by Bornean Stingless Bees. **Biotropica**, v. 41, n. 6, p. 730-736, nov. 2009.

LEONHARDT, S. D.; BLÜTHGEN, N.; SCHMITT, T. Chemical Profiles of Body Surfaces and Nests from Six Bornean Stingless Bee Species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 1, p. 98-104, jan. 2011.

LEONHARDT, S. D.; SCHMITT, T.; BLÜTHGEN, N. Tree Resin Composition, Collection Behavior and Selective Filters Shape Chemical Profiles of Tropical Bees (Apidae: Meliponini). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, ago. 2011.

LEONHARDT, S. D.; WALLACE, H. M.; SCHMITT, T. The cuticular profiles of Australian stingless bees are shaped by resin of the eucalypt tree *Corymbia torelliana*. **Austral Ecology**, v. 36, n. 5, p.537-543, ago. 2011.

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

MAKERT, G. R.; PAXTON, R. J.; HARTFELDER, K. An optimized method for the generation of AFLP markers in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata*) reveals a high degree of intracolony genetic polymorphism. **Apidologie**, v. 37, n. 6, p. 687-698, nov./dez. 2006.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, maio 1998.

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

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 36-46, 2006.

MARINHO, I. V.; FREITAS, M. F.; GUILHERME, R. F.; ARAÚJO, W. Preservação de Abelhas sem Ferrão no Semi-Árido através da Criação Racional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 1, 2002, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2002. Disponível em: <[http://www.prac.ufpb.br/anais/lcbeu\\_anais/anais/meioambiente/abelhas.pdf](http://www.prac.ufpb.br/anais/lcbeu_anais/anais/meioambiente/abelhas.pdf)>.

MASSARO, F. C.; BROOKS, P. R.; WALLACE, H. M.; RUSSELL, F. D. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. **Naturwissenschaften**, v. 98, n. 4, p. 329-337, abr. 2011.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 1-2, p. 93-97, jan./fev. 1995.

MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 52, n. 9-10, p. 702-704, set./out. 1997.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913-920, nov. 2003.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S.; MAEMURA, M.; KUDO, H.; SUZUKI, S.; KUWA, K.; YOSHIMURA, S.; SASSA, S.; NAKAYAMA, T.; NAGASAWA, H. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer Research**, v. 16, n. 5A, 2669-2672, set./out. 1996.

MULI, E. M.; MAINGI, J. M.; MACHARIA, J. Antimicrobial Properties of Propolis and Honey from the Kenyan Stingless bee, *Dactylurina schimidti*. **Apiacta**, v. 43, p. 49-61, 2008.

NASCIMENTO, A. M.; OLIVEIRA, D. C. R. Kaurene Diterpenes and Other Chemical Constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 552-555, jul./ago. 2001.

NATES-PARRA, G. Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) of Colombia. **Biota Colombiana**, v. 2, n. 3, p. 233-248, dez. 2001.

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

OLIVEIRA, E. S.; TORRES, D. F.; BROOKS, S. E.; ALVES, R. R. N. The medicinal animal markets in the metropolitan region of Natal City, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 54-60, jul. 2010.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Revista Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, set. 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, abr. 2002.

PATRICIO, E. F. L. R. A.; CRUZ-LÓPEZ, L.; MAILE, R.; TENTSCHERT, J.; JONES, G. R.; MORGAN, E. D. The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 2, p. 249-254, fev. 2002.

PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; AQUINO NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, n. 3, p. 291-298, maio/jun. 2003.

PEREIRA, F. M. Abelhas sem ferrão, a importância da preservação. 29 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/artigos/2005/artigo.2005-12-29.3499364899>>.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, jun. 2011.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; DELGADO, A.; ZUMÁRRAGA, C.; SAURI, E. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. **Journal of Essencial Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 53-56, 2006.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; FERRO, E.; PARELLA, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 49-52, fev. 2005.

PRANITHANCHAI, W.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; SUBHADHIRASAKUL, S.; CHANTRAPROMMA, K. Cassane diterpenoids from the stem of *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 2, p. 300-304, jan. 2009.

PROMSAWAN, N.; KITTA KOOP, P.; BOONPHONG, S.; NONGKUNSARN, P. Antitubercular Cassane Furanoditerpenoids from the Roots of *Caesalpinia pulcherrima*. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 776-777, ago. 2003.

RACCUGLIA, R. A.; BELLONE, G.; LOZIENE, K.; PIOZZI, F.; ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.; BRUNO, M.; SIMMONDS, M. S. J. Hastifolins A – G, antifeedant *neo-clerodane* diterpenoids from *Scutellaria hastifolia*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 2087-2091, dez. 2010.

RODRIGUES, A. E.; DANTAS, H. K. M.; FERRAZ, M. A. Diagnóstico da Arquitetura do Ninho de *Melipona scutellaris* L.. **Mensagem Doce**, n. 78, set. 2004.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n.2, p. 124-143, mar./abr. 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 33-38, fev. 2005.

SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C. C.; RIGHI, A. A.; SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 5, p. 925-936, maio 2011.

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, ago. 2007.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, n. 8, p. 739-744, 2004.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; RODRIGUES, R. F. O.; EBERLIN, M. N. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, n. 3, p. 398-407, maio/jun. 2006.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; AIDAR, D. S.; SILVA, E. C. A.; CARVALHO, C. A. L.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 38, n. 1, p. 93-103, jan./fev. 2007.

SAWAYA, A.C.H.F.; CALADO, J.P.C.; SANTOS, L.C.; MARCUCCI, M.C.; AKATSU, I.P.; SOARES, A. E. E.; ABDELNUR, P.V.; CUNHA, I.B.S.; EBERLIN, M.N. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 37-42, abr. 2009.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, nov. 2000.

SILVA, J. C. S.; LAGES, V. N. A meliponicultura como fator de ecodesenvolvimento na Área de Proteção Ambiental da ilha de Santa Rita, Alagoas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 1, n. 3, 2001.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313-316, set. 2008.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295-311, maio/jun. 2010.

SLAA, E. J.; SÁNCHEZ CHAVES, L. A.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n.2, p. 293-315, mar./abr. 2006.

SMITH, E.; WILLIAMSON, E.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 6, p. 538-542, jun. 2005.

SMITH, E. C.; KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; WAREHAM, N.; WILLIAMSON, E. M.; GIBBONS, S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4480-83, jul. 2007.

STEARMAN, A. M.; STIERLIN, E.; SIGMAN, M. E.; ROUBIK, D. W.; DORRIEN, D. Stradivarius in the Jungle: Traditional Knowledge and the Use of "Black Beeswax" Among the Yuquí of the Bolivian Amazon. **Human Ecology**, v. 36, n. 2, p. 149-159, abr. 2008.

TAPIA, L.; TORRES, J.; MENDOZA, L.; URZÚA, A.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; WILKENS, M. Effect of 13-*epi*-Sclareol on the Bacterial Respiratory Chain. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1058-63, nov. 2004.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. **eCAM**, v. 7, n. 3, p. 307-315, jan. 2008.

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

TORRES-BUSTOS, J.; FARÍAS, L.; URZÚA, A.; MENDOZA, L.; WILKENS, M. The Diterpenoid *ent*-16-Kauren-19-oic Acid Acts as an Uncoupler of the Bacterial Respiratory Chain. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 823-828, mar. 2009.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V. S.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **eCAM**, v. 3, n. 2, p. 249-254, jun. 2006.

UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 37, n. 5, p. 855-865, 2009.

UMTHONG, S.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 37, maio 2011.

URZÚA, A.; REZENDE, M. C.; MASCAYANO, C.; VÁSQUEZ, L. A. Structure-Activity Study of Antibacterial Diterpenoids. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 882-891, abr. 2008.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, abr./jun. 2007.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical Composition and Biological Activity of Propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 9-10, p. 785-789, set./out. 2000a.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V. S.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693-696, dez. 2000b.

WAYMAN, K. A.; DE LANGE, P. J.; LARSEN, L.; SANSOM, C. E.; PERRY, N. B. Chemotaxonomy of *Pseudowintera*: Sesquiterpene dialdehyde variants are species markers. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 766-772, maio 2010.

ZHOU, Y.; HUANG, S. X.; LI, L. M.; YANG, J.; LIU, X.; PENG, S. L.; DING, L. S.; SUN, H. D. Negative electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of *ent*-kaurane diterpenoids from the genus *Isodon*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 63-73, jan. 2008.

ZHOU, Y.; YANG, B. L.; YANG, J.; HUANG, S. X.; SUN, H. D.; XU, H. X.; DING, L. S. Electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of *ent*-6,7-secokaurane diterpenoids from the *Isodon* species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 1, p. 138-146, jan. 2009.

ZIMMERMANN, B. F. Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 11, p. 1575-1582, jun. 2011.