

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo

Análise da atividade biológica de própolis de Uruçu (*Melipona
scutellaris*) proveniente do estado da Bahia

Alfenas/MG

2008

Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo

**Análise da atividade biológica de Própolis de Uruçu (*Melipona
scutellaris*) proveniente do Estado da Bahia**

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 de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki.

Alfenas/MG

2008

Camilo, Mariana Bastos Bernardes de Oliveira.

Análise da atividade biológica de própolis de uruçú (*Melipona scutellaris*) do Estado da Bahia / Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo.-Alfenas, 2008.

54 f. : il.-

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

Bibliografia.

1. Própolis. 2. Abelhas. 3. Ações Farmacológicas. I. Título.

CDD: 638.1

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação "Análise da atividade biológica de Própolis de Uruçu (*Melipona scutellaris*) proveniente do Estado da Bahia", elaborada por Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo, como requisito parcial para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em:

Prof. Masaharu Ikegaki - Orientador UNIFAL/MG

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus por me ter me dado a vida e por sempre guiar meus
caminhos.

Aos meus amados pais, Marcial e Lucília, pelo amor
incondicional e pelo exemplo de luta, perseverança e honestidade.

Ao meu esposo Rafaell por compreender minha ausência e por
estar sempre ao meu lado quando preciso de apoio. Pelo grande
amor que tem por mim e por sua paciência.

Aos meus irmãos Pedro, Eugênio e Lila, pela união e amizade em
todos os momentos de nossas vidas.

E em especial aos meus saudosos avós Nilo e Therezinha, grandes
incentivadores de minha caminhada, exemplos de amor e ternura.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela vida que me foi concedida e por sempre guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Marcial e Lucília, pelo grande exemplo de força e determinação na vida, por nunca desistirem e pelo seu amor incondicional.

Ao meu marido Rafaell, pelo amor que nos une e por seu companheirismo, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e por sua alegria de viver. Meu agradecimento especial por estar sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, Pedro, Eugênio e Marília, pela felicidade que transmitem e pela amizade que nos une.

Aos meus avós, Nilo e Therezinha, pela proteção celestial em minha vida.

Aos meus avós Marcionil e Maria pelo exemplo de vida.

A todos os meus tios e tias, em especial Tia Helena, Tia Lúcia e Tio Luiz, grandes incentivadores na minha vida.

Ao Curso de Pós-graduação e à Unifal- MG pela oportunidade fornecida.

Ao prof. Dr. Masaharu Ikegaki pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência que teve comigo durante estes dois anos de intenso trabalho.

Às amigas Maurette, Angélica, Marina e Lidiane pela amizade adquirida durante estes dois anos e pelo grande apoio nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar pela parceria nos testes realizados.

A todos da equipe de professores e alunos do Laboratório de Farmacologia do CPQBA – Unicamp, em especial a Ana Ruiz, pelo grande auxílio nos testes de atividade citotóxica e pela receptividade.

À CAPES pelo suporte financeiro.

A todos os amigos que por perto estiveram e souberam compreender esta etapa de minha vida.

RESUMO

As abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, são assim chamadas por apresentarem este instrumento de defesa atrofiado. Pertencem à ordem Hymenoptera, à sub-família Meliponinae e são agrupadas em três tribos distintas: Meliponini, Trigonini e Lestrimelitini. Estão distribuídas nas zonas tropical e subtropical, nas Américas do Sul e Central, Malásia, Indonésia, África e Austrália. Possuem tamanho, forma e coloração variada e um nível de organização social comparável ao das abelhas *Apis mellifera*. Para a construção do ninho estas abelhas utilizam cera pura, cerume (mistura de cera e própolis) ou ainda o batume (mistura de própolis e barro, conhecida como geoprópolis). As espécies brasileiras são divididas em Meliponas e Trigonas, sendo uma das representantes mais populares a Uruçu (*Melipona scutellaris*). O objetivo deste trabalho foi analisar a própolis de uruçu (*Melipona scutellaris*) proveniente do estado da Bahia quanto a suas características físicas e químicas e algumas propriedades biológicas. A própolis analisada apresentou coloração marrom escura, flexível e odor acre. O teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu foi de 0,105 mg /mg de própolis em equivalentes de ácido gálico. O extrato bruto da própolis demonstrou significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* nos testes de antibiograma em difusão em ágar com diâmetro de halo de 27 mm e na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de 3,12 a 1,56 ppm. O extrato foi fracionado, fornecendo quatro frações, numeradas em ordem decrescente de polaridade (0- mais polar e 3- menos polar). Estas frações também foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e antioxidante. A fração 3 demonstrou atividade antioxidante em relação ao radical DPPH menor que a observada para o extrato, sendo de 67,36% na concentração de 90 ppm. Avaliou-se ainda a atividade citotóxica do extrato bruto sobre nove linhagens de células tumorais humanas, tendo apresentado toxicidade para todas as linhagens de maneira dose-dependente.

Palavras-chave: Própolis. Meliponíneos. Atividades biológicas.

ABSTRACT

The stingless bees are so called because they presented this defense tool atrophied. They belong to the order Hymenoptera, sub-family Meliponinae and are grouped into three distinct tribes: Meliponini, Trigonini and Lestrimelitini. They are distributed in tropical and subtropical areas in Central and South America, Malaysia, Indonesia, Africa and Australia. They have size, shape and color variation and a level of social organization comparable to that of bee *Apis mellifera*. For the construction of the nests some of these bees use the geopropolis (mixture of plant resins, wax and soil). The Brazilian species are divided into *Melipona* and *Trigona* and one of the most popular species is Uruçu (*Melipona scutellaris*). The purpose of this study was to analyze some physical, chemical and biological properties of Uruçu (*Melipona scutellaris*) propolis from the state of Bahia, Brazil. Propolis examined showed dark brown color, flexible and pungent odor. The content of phenolic compounds by the method of Folin-Ciocalteu was 0,105 mg/mg of propolis. The crude extract of propolis has significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in the test of antibiogram by agar diffusion and in the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), with a diameter of 27 mm of inhibition zone and MIC from 3.12 to 1.56 ppm. The most apolar fraction showed higher antimicrobial activity, with a diameter of 33 mm of inhibition zone for the fraction 5 and the MIC obtained was from 1.56 to 0.78 ppm. Was also evaluated the antioxidant activity using the DPPH radical scavenging activity and crude extract showed dose-dependent response, and 89.05% in the concentration of 90 ppm. The less apolar fraction showed the higher antioxidant activity against DPPH, it was 67.36% for the concentration of 90 ppm. We also evaluated the cytotoxic activity of the crude extract on eight cancer cell lines, and it showed toxicity in a dose-dependent manner.

Keywords: Propolis, Meliponinae and Biological Activities.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1	PRODUTOS NATURAIS.....	1
1.2	ABELHAS.....	3
1.3	ABELHAS NATIVAS (MELIPONÍNEOS).....	4
1.4	PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS.....	5
1.5	CLASSIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS	7
1.6	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS.....	7
1.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS.....	9
1.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	9
1.9	ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS.....	10
1.10	ATIVIDADE CITOTÓXICA	12
1.11	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS.....	13
	REFERÊNCIAS	14
	ARTIGO CIENTÍFICO	18

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produtos naturais

Desde tempos imemoriais, produtos naturais são utilizados pelo homem, que buscava o alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas, o que talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (BARREIRO; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. O reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, os quais possuem grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO *et al*, 2002).

Devido à importância das plantas consagradas pelo uso popular, os químicos as estudavam, isolando e determinando as estruturas de substâncias ativas. Muitas substâncias foram determinadas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até os dias de hoje como medicamentos. Os alcalóides de *Cinchona* e de *Papaver* são grandes exemplos. Entre os alcalóides de *Papaver*, encontram-se codeína e morfina e entre os alcalóides de *Cinchona*, a quinina – responsável pelo desenvolvimento dos antimaláricos sintéticos (BARREIRO; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Os produtos naturais desempenham um papel altamente significativo na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças humanas. Para o combate ao câncer e às doenças infecciosas, mais de 60% e 75% dos fármacos utilizados são originários de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Em particular, a terapia contra o câncer representa a oportunidade ideal para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais. Porém, muitos destes compostos naturais promissores estão disponíveis em quantidades extremamente pequenas, especialmente os de organismos marinhos, como as esponjas (PATERSON; ANDERSON, 2005).

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina, destacando-se as plantas brutas (ervas) e as tradicionais preparações galênicas (extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade é a própolis (CAS N° 9009-62-5) administrada sob diversas formas. A própolis é um remédio natural utilizado desde tempos remotos. No antigo Egito era conhecida como

“cera negra” e utilizada para embalsamar os mortos (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

A própolis teve suas propriedades medicinais reconhecidas por médicos gregos e romanos (Aristóteles, Plínio e Galeno), sendo empregada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas. Os incas utilizaram a própolis como agente anti-pirético, consta na farmacopéia britânica como medicamento oficial e se tornou popular por sua atividade antibacteriana (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os produtos naturais estão recuperando espaço e importância no mercado farmacêutico, seja por suas atividades ou como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (BARREIRO; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

A própolis é um dos produtos naturais que tem mantido sua popularidade por um longo período de tempo e quando utilizada de forma padronizada é mais segura e menos tóxica que muitos medicamentos sintéticos (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Segundo Pereira, Seixas e Neto (2002), própolis não significa modismo terapêutico, pois suas virtudes são reconhecidas há séculos, sendo relatadas em inúmeros trabalhos que demonstram diferentes tipos de atividades biológicas e aplicações em diversas terapias. A grande questão para o futuro é responder a uma pergunta antiga: qual própolis serve para qual ação terapêutica?

1.2 Abelhas

Insetos pertencentes à ordem dos Himenópteros e à família dos Apídeos, as abelhas representam os principais polinizadores da vegetação natural (SOUZA; CAMPOS, 2008).

No Brasil, as primeiras abelhas européias *Apis mellifera* foram introduzidas pelo padre português Antônio C. Aureliano em 1839. A partir deste momento, diversas raças de abelhas européias do gênero *Apis* foram trazidas para o Brasil por diferentes imigrantes. Na década de 1950 foram trazidas para pesquisa algumas espécies de abelhas africanas, que escaparam acidentalmente e se miscigenaram com as européias aqui existentes, resultando assim nas *Apis mellifera* africanizadas (GONÇALVES, 1992).

São conhecidas cerca de vinte mil espécies diferentes de abelhas, destacando-se as espécies do gênero *Apis* devido à importância econômica e às características

fisiológicas. A maioria das abelhas do gênero *Apis* são produtoras de mel e a palavra *mellifera* significa “carrega o mel”, muito embora as abelhas carreguem o néctar. As espécies encontradas hoje em dia no Brasil são as *Apis mellifera* africanizadas e as centenas de espécies nativas, muitas delas ainda sem classificação (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas do gênero *Apis* constituem, hoje em dia, um material de trabalho para os apicultores brasileiros, gerando assim uma atividade sustentável, pois apesar de sua maior agressividade, elas começam a produzir mais cedo, param mais tarde e não apresentam o instinto de hibernação comum às raças européias. Por outro lado as abelhas nativas, sem ferrão, destacam-se pela sua importância para a manutenção de áreas naturais (IMPERATRIZ, 1998).

1.3 Abelhas nativas (Meliponíneos)

As abelhas nativas pertencem à tribo Meliponini, subfamília Apinae e englobam todas as abelhas conhecidas como “abelhas sem ferrão” encontradas nas regiões tropical e subtropical do planeta (NATES-PARRA, 2001).

Assim como as abelhas melíferas, as abelhas sem ferrão são insetos sociais. Têm sido conhecidas pela sua produção de mel, mas seu papel na manutenção do ecossistema tem sido reconhecido atualmente (CORTOPASSI-LAURINO *et al*, 2006).

São considerados somente três gêneros de abelhas sem ferrão: *Melipona*, *Lestrimelita* e *Trigona*, sendo que o último é subdividido em vários subgêneros (NATES-PARRA, 2001).

As abelhas sem ferrão constituem polinizadores nativos de angiospermas nos trópicos e incluem abelhas pequenas e médias (2 mm a 1,5 cm) com um nível de organização social semelhante ao das abelhas *Apis mellifera* (HEARD, 1999).

As tribos de meliponíneos incluem várias centenas de espécies, mas o número real é difícil de ser estabelecido devido às espécies serem específicas de cada região geográfica e diferirem em características muito sutis (MICHENER, 1990).

As abelhas sem ferrão se caracterizam principalmente por terem ferrão reduzido e constroem ninhos muito peculiares, que podem ser utilizados para a identificação da espécie (NATES-PARRA, 2001).

Os Meliponini fazem seus ninhos nos mais diversos tipos de substratos, como cavidades subterrâneas (associados ou não com ninhos de outros insetos sociais), ocos

de árvores e cipós, fendas em paredes e rochas, em ninhos de formigas arborícolas, em ninhos abandonados de aves ou ninhos livres, fixados em galhos e troncos de árvores. Todas as espécies conhecidas utilizam cera e resinas vegetais puras ou misturadas (cerume) para a construção das edificações. Algumas espécies usam terra misturada com resinas (batume) como as espécies de *Melipona* (CAMARGO; PEDRO, 2003).

Por serem resistentes às doenças e aos parasitas das abelhas melíferas, a propagação de suas colônias contribuem para a preservação da biodiversidade. Entretanto, sua densidade pode ser diminuída em casos de desmatamento (ELTZ *et al*, 2002).

Segundo Bankova e Popova (2007), as abelhas sem ferrão habitam o continente americano há séculos, muito antes da chegada de Colombo e das abelhas melíferas.

Atualmente, a meliponicultura vem alcançando grande popularidade no Brasil (CORTOPASSI-LAURINO *et al*, 2006). Assim como ocorre com as *Apis mellifera*, as abelhas nativas são criadas devido à produção de mel, que é medicinal e mais caro que o das abelhas melíferas. As abelhas sem ferrão coletam resinas vegetais e armazenam em grandes depósitos dentro de seus ninhos e são de manejo mais fácil que o das abelhas melíferas (BANKOVA; POPOVA, 2007).

A criação de abelhas sem ferrão é conhecida como meliponicultura, que associada ao melhoramento genético permite o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e a preservação da vida selvagem. Porém para muitas espécies, a meliponicultura exige técnicas especiais de manejo e o ambiente natural intacto (CORTOPASSI-LAURINO *et al*, 2006).

Assim como as abelhas melíferas, as abelhas sem ferrão produzem própolis, que tem demonstrado considerável atividade antimicrobiana (FERNANDES *et al*, 2001; VELIKOVA *et al*, 2000a).

1.4 Própolis e geoprópolis

A palavra própolis é de origem grega e derivada de *pro*, em defesa de, e *polis*, cidade. Isto implica em um produto usado na defesa da comunidade das abelhas (SALATINO *et al*, 2005).

Geoprópolis é um tipo especial de própolis produzida por abelhas sem ferrão, formado por uma mistura de resinas vegetais, cera e terra (BARTH, 2006).

O reconhecimento da atividade antisséptica da própolis é antigo. Aristóteles recomendava o uso da própolis para tratar abscessos e feridas. Os soldados romanos levavam própolis para o campo de guerra como um remédio de emergência. Um remédio contendo própolis e vaselina foi usado para tratar as feridas durante várias guerras (SALATINO *et al*, 2005).

A própolis é um produto resinoso complexo das abelhas que varia de acordo com diversos fatores. A cor pode ser creme, amarela, verde, marrom claro ou escuro. Algumas amostras têm uma textura friável e dura, enquanto outras são elásticas e colantes (SALATINO *et al*, 2005).

A própolis é utilizada pelas abelhas na entrada das colméias, fechando frestas para redução da entrada do vento frio e, principalmente, dos inimigos naturais (fungos e bactérias), além de ser utilizada para embalsamar pequenos animais mortos pelas abelhas e que não puderam ser retirados, evitando a putrefação. A própolis também é utilizada como material de construção no interior da colméia, soldando favos, quadros e envernizando o interior dos alvéolos para que a rainha faça a postura. A literatura mostra a atividade desta resina natural contra uma variedade de patógenos humanos e animais (SALOMÃO *et al*, 2004).

A composição da própolis é extremamente complexa. Os constituintes mais importantes são cera de abelha, resina vegetal e compostos voláteis. Os insetos secretam cera, enquanto os dois últimos constituintes são obtidos das plantas. As abelhas geralmente coletam o material para a própolis de secreções das plantas ou cortando fragmentos de tecidos vegetais. A atividade biológica é atribuída às substâncias derivadas das plantas (SALATINO *et al*, 2005).

A composição química da própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004), vegetação da região, mas também reservas de pólen e mel. Como consequência desta composição química diferenciada da própolis, ocorre também uma variação na sua atividade farmacológica (MENEZES, 2005).

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, refletindo a diversidade vegetal destas regiões (BANKOVA, 2005a). A própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (MENEZES, 2005).

As propriedades da própolis têm atraído a atenção de cientistas desde o final dos anos 1960. Durante os últimos quarenta anos, muitas pesquisas têm sido publicadas sobre a composição química, atividade biológica, usos farmacêuticos e terapêuticos da própolis (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

1.5 Classificação da própolis

A variabilidade química da própolis é discutida devido ao problema da padronização. Muitos tipos químicos de própolis são formulados baseados na planta de origem. O conhecimento da planta de origem combinado ao conhecimento dos princípios ativos fornece bases para a padronização e o controle de qualidade, permitindo a especificação dos tipos de própolis que têm diferentes composições químicas. Os tipos de própolis de abelhas melíferas são: “Poplar Propolis”, “Birch Propolis”, “Green Propolis” (Brasil), “Red Propolis”, “Pacific Propolis” e “Canarian Propolis” (BANKOVA, 2005a).

A própolis de *Apis mellifera* no Brasil foi classificada em doze grupos de acordo com suas características físicas e químicas: cinco pertencentes ao grupo do sul do Brasil, um ao grupo do sudeste do Brasil e seis ao grupo do nordeste do Brasil (PARK *et al*, 2000). Ainda segundo Bankova e Popova(2007), existe ainda a própolis de abelha sem ferrão ou abelha nativa, que deve ter sua composição química e origem botânica e ainda elucidada. De acordo com Velikova *et al* (2000b), a composição da própolis de abelhas sem ferrão é determinada pela espécie da abelha e por sua localização geográfica.

1.6 Composição química da própolis

Própolis usualmente contém uma variedade de compostos químicos, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenóides, esteróides e aminoácidos. A composição da própolis depende da vegetação no local de coleta. Devido às diferenças na composição química, as atividades biológicas de tipos distintos de própolis também variam (BANKOVA, 2005a). As moléculas farmacologicamente ativas na própolis são flavonóides e ácidos fenólicos e seus ésteres (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os constituintes da própolis variam de acordo com a estação do ano e o tipo de vegetação disponível na região onde cada própolis é produzida (AHN *et al.*, 2007).

Segundo Bankova e Popova (2007), benzofenonas preniladas foram isoladas de cinco tipos diferentes de própolis de abelhas sem ferrão na Venezuela.

Velikova *et al.* (2000b) analisou vinte e uma amostras de própolis de doze espécies diferentes de Meliponinae por Cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massa (CG-EM) e agrupou vários tipos químicos de própolis de abelhas sem ferrão de acordo com o composto majoritário: ácido gálico, diterpenóides e triterpenóide (Tabela 1).

Tabela 1: Composição química de própolis de abelha sem ferrão.

Espécie da Abelha	Origem	Composto
<i>Friesomelitta silvestrii</i>	Goiás, Brasil	Monoterpenos Sesquiterpenos
<i>Friesomelitta silvestrii languida</i>	Minas Gerais, Brasil	Monoterpenos Sesquiterpenos Diterpenos Triterpenos
<i>Friesomelitta varia</i>	São Paulo, Brasil	Monoterpenos Sesquiterpenos Triterpenos
	Venezuela	Prenilados Benzofenonas
<i>Lestrimellata</i> spp.	Paraná, Brasil	Diterpenos Triterpenos
<i>Melipona beechei</i>	Yucatan, México	Monoterpenos Sesquiterpenos
<i>Melipona compressipes</i>	Piauí, Brasil	Sesquiterpenos Ac. Fenólicos Flavonóides Açúcares Diterpenos Triterpenos Ác. Graxos
<i>Melipona favora orlinge</i>	Venezuela Mato Grosso do Sul, Brasil	Benzofenonas preniladas Diterpenos Triterpenos
<i>Melipona favosa</i>	Venezuela	Benzofenonas preniladas
<i>Melipona marginata</i>	Pernambuco, Brasil	Ác. Fenólicos Açúcares
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná, Brasil	Ác. Fenólicos Açúcares Monoterpenos Sesquiterpenos Diterpenos Triterpenos Ác. Graxos
	Espírito Santo, Brasil	Ác. Fenólicos Diterpenos
	São Paulo A, Brasil	Ác. Fenólicos Triterpenos Açúcares

	São Paulo B, Brasil	Diterpenos Ác. Fenólicos Triterpenos
	Minas Gerais, Brasil	Ác. Fenólicos Triterpenos Açúcares
	Pernambuco, Brasil	Ác. Fenólicos Açúcares
<i>Melipona scutellaris</i>	Pernambuco, Brasil	Ác. Fenólicos Açúcares
<i>Nanotrigona testaceicornis</i>	Minas Gerais, Brasil	Diterpenos Triterpenos

Fonte: Bankova e Popova, 2007

1.7 Atividades biológicas da própolis

Devido à popularidade na medicina tradicional, própolis tem se tornado objeto de intensos estudos de química e farmacologia nos últimos trinta anos (BANKOVA, 2005b). Várias atividades biológicas, como anticâncer (BANSKOTA *et al*, 1999; AHN *et al*, 2007), antioxidante (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; ALENCAR *et al*, 2007), antiinflamatória (MENEZES, 2005), antibiótica (SALOMÃO *et al*, 2004; SCAZZOCHIO *et al*, 2005), anti-HIV (ITO *et al*, 2001), antifúngica (SALOMÃO *et al*, 2004) e anticárie (DUARTE *et al*, 2003; HAYACIBARA *et al*, 2005; DUARTE *et al*, 2006) têm sido relatadas para a própolis e seus constituintes.

De acordo com Castaldo e Capasso (2002), os componentes da própolis apresentam efeitos múltiplos em bactérias, fungos e vírus. Ainda possuem efeito antiinflamatório e atividades imunomodulatórias, além de ter demonstrado atividades hipotensora e hipocolesterolêmica.

Recentemente, a própolis tem sido extensamente utilizada para melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamações, doenças do coração, diabetes e até mesmo o câncer (BANSKOTA *et al*, 1999). A própolis foi utilizada até mesmo para tratar tuberculose, úlceras e distúrbios gástricos, dermatites e para reduzir a febre. Dois usos persistiram pelos séculos: o uso externo como antisséptico e cicatrizante e o uso interno para o tratamento de úlceras gastroduodenais. Estudos clínicos estão em andamento para verificar o seu uso no tratamento e na prevenção da aterosclerose (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

1.8 Atividade antioxidante

As reações metabólicas permitem a formação de espécies reativas de oxigênio, que estão envolvidas em uma série de danos oxidativos (danos em lipídio proteínas, carboidratos e DNA), podendo ser ou gerar radicais livres (VANNUCCHI *et al*, 1998). Nas plantas podem ser encontrados diversos tipos potentes de espécies reativas de oxigênio, que podem estar envolvidas no metabolismo normal, como na fotossíntese e na respiração (MITTLER, 2002).

Devido à produção contínua de radicais livres nos processos metabólicos, mecanismos de defesa antioxidante foram desenvolvidos para impedir a indução de danos e para limitar os níveis intracelulares de oxidantes. Assim, os antioxidantes são os agentes responsáveis por inibir e reduzir as lesões causadas pelos oxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, em baixa concentração quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995).

Vários compostos e alguns metais pertencem ao grupo de antioxidantes, que pode ser dividido em dois principais grupos: agentes redutores (betacaroteno e vitaminas C e E) e nucleofílicos (glutathione, selênio e ácido lipóico). Além disto, também podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos (SEIFRIED, 2007).

1.9 Antioxidantes da Própolis

Várias doenças estão relacionadas com os níveis de radicais livres no organismo, tais como: doenças cardiovasculares, doenças reumáticas, doenças neurológicas, doenças psiquiátricas, envelhecimento precoce, osteoporose, diabetes, inflamação e neoplasias (MENEZES, 2005). Para o controle e prevenção destas doenças, há uma forte tendência em se usar produtos naturais contendo polifenóis com propriedades antioxidantes (URQUIAGA; LEIGHTON, 2000).

A própolis contém uma série de polifenóis e vários outros compostos capazes de remover os radicais livres em excesso do organismo (MENEZES, 2005). Um possível

mecanismo de reação antioxidante da própolis seria o seqüestro de radicais livres gerados por neutrófilos, que resultaria em uma atividade final antiinflamatória (MORENO *et al*, 2000).

De acordo com Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), a própolis possui atividade antioxidante já relatada em muitos estudos e alguns compostos foram identificados como sendo responsáveis pela ação antioxidante de amostras de própolis de diferentes origens. Estas estruturas foram isoladas e identificadas em análises por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Alguns destes compostos são: ácido caféico, ácido ρ -cumárico, ácido dimetoxicinâmico, quercetina, apigenina, kaempferol, artepelinina C, entre outros (FIGURA 1).

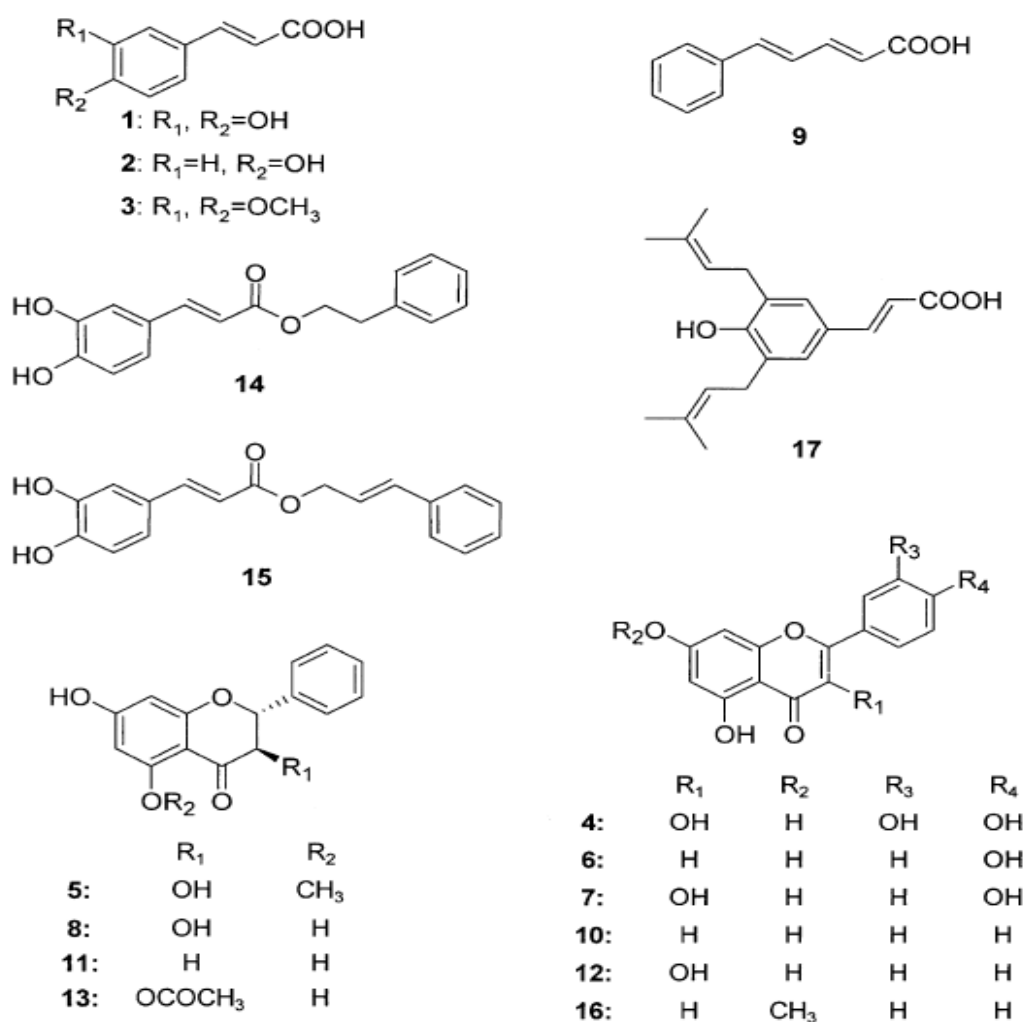


Figura 1: Estruturas de compostos antioxidantes identificados na própolis. 1, Ácido caféico; 2, ácido ρ -cumárico; 3, ácido 3,4-dimetoxicinâmico; 4, quercetina; 5, éter 5-metil pinobanksin; 6, apigenina; 7, kaempferol; 8, pinobanksin; 9, ácido cinamilacético; 10, crisina; 11, pinocembrina; 12, galangina; 13, pinobanksin 3-acetato; 14, fenetil cafeato; 15, cinamil cafeato; 16, tectocrisina; 17, artepelinina C. Fonte: Kumazawa; Hamasaka; Nakayama, 2004.

1.10 Atividade citotóxica

Uma diversidade de compostos apresentando atividade citotóxica foi isolada da própolis, os quais apresentam atividade inibitória do crescimento de diversas células tumorais. Compostos hidrossolúveis isolados da própolis podem atuar sinergicamente potencializando a atividade de drogas tumorocidas (MENEZES, 2005).

De acordo com Ahn *et al* (2007), o composto artepelina C (FIGURA 2) pode ser útil no desenvolvimento de agentes e de alimentos com atividade preventiva ou terapêutica contra a angiogênese tumoral, apresentando assim, ação tumorocida. Artepelina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é um dos principais ácidos fenólicos encontrados especificamente na própolis brasileira. Apresenta várias atividades biológicas, sendo as principais: antioxidante e anticarcinogênica. No estudo de Ahn *et al* (2007), foi analisada a composição química de própolis de várias origens geográficas. A própolis brasileira apresentou pequenas quantidades de flavonóides como quercetina e kaempferol e ésteres de ácidos fenólicos, como éster fenetil do ácido caféico; os quais são componentes comuns em própolis de outras origens. O componente mais abundante e presente apenas na própolis brasileira foi a artepelina C, na concentração de 40mg por grama de extrato etanólico.

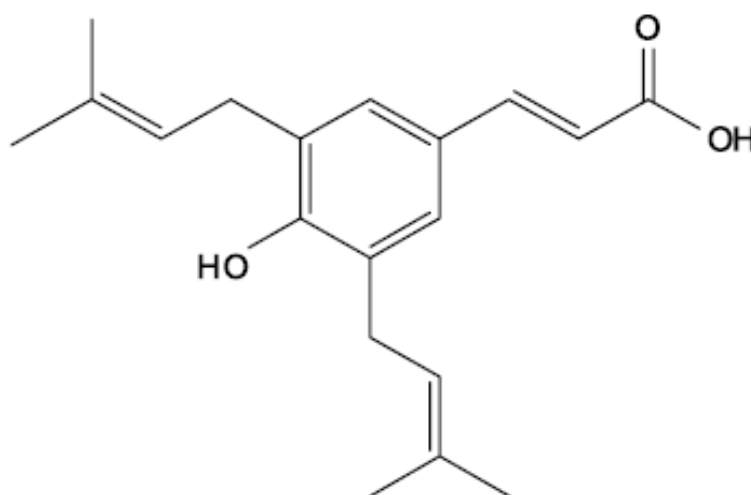


Figura 2: Estrutura química da artepelina C.

A atividade anticâncer da própolis brasileira é devida primariamente aos compostos fenólicos e está intrinsecamente relacionada à atividade antioxidante. Os constituintes que apresentam atividade são ácido caféico e seus derivados, flavonóides,

ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromona-6-propenóico, artepelina e ácido 17-hidroxicleroda-3-dien-15-óico (BANSKOTA *et al*, 1999).

O potencial citotóxico da própolis de abelhas nativas sem ferrão tem sido estudado e própolis de *Melipona quadrifasciata* e *Nanotrigona testacularis* demonstraram toxicidade promissora e melhor que a apresentada pela própolis de abelhas melíferas (BANKOVA; POPOVA, 2007).

1.11 Atividade antimicrobiana da própolis

A capacidade da própolis em inibir o crescimento de microrganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente (MENEZES, 2005).

Alguns fatores podem influenciar a capacidade inibitória da própolis, tais como preparo do extrato, microrganismo testado, origem da própolis e espécie da abelha (FERNANDES *et al*, 2001).

Velikova *et al* (2000a) isolou três diterpenóides da própolis de abelha nativa brasileira *Melipona quadrifasciata anthidioides* e um deles, o ácido caurenóico demonstrou atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus* e *E. coli*.

A própolis de Meliponíneos tem sido estudada principalmente por suas atividades antibacteriana e antimicótica. Em geral a atividade antibacteriana tem se mostrado similar à atividade da própolis de abelhas melíferas, sendo mais ativa contra microrganismos Gram-positivos do que contra Gram-negativos. Ácidos diterpênicos têm sido associados à atividade antibacteriana destas própolis (BANKOVA; POPOVA, 2007).

Segundo um estudo estatístico de Popova *et al* (2004), a própolis de meliponíneos brasileiros apresenta menor atividade antibacteriana contra *S. aureus* do que a própolis de abelhas melíferas brasileiras e européias.

A tabela 2 apresenta a relação das espécies de abelhas sem ferrão e os microrganismos que são capazes de inibir, de acordo com Bankova e Popova (2007).

Tabela 2: Atividade antimicrobiana das própolis de abelhas nativas.

Espécie da Abelha	Microrganismo
<i>Lestrimellata</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Melipona fabora orlinge</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Melipona mandacaia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus</i> spp.
<i>Melipona marginata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Enterococcus</i> spp.
<i>Melipona</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Escherichia coli</i>
<i>Nanotrigona testaceicornis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Partamona</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus</i> spp.
<i>Plebeia droriana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>

Fonte: Bankova, 2007

REFERÊNCIAS

- AHN, M. R. *et al.* Supression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, doi:10.1016/j.canlet.2006.12.039, 2007.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 113, p. 278-283, 2007.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005a.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n. 1, p. 29-32, 2005b.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n.1, p. 88-92, 2007.
- BANSKOTA, A. H. *et al.* Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896-900, 1999.
- BARREIRO, E. J.; VIEGAS C. J.; BOLZANI V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- BARTH, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v.41, p. 71-85, 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini neotropicais: o gênero Partamona Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae)- bionomia e biogeografia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 311-372, 2003.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, supl. 1, p. S1-S6, 2002.
- CASTRO, M. L. *et al.* Propolis from Southeastern and Northeastern of Brazil: The influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. **Química Nova**, v. 30, p. 1512 – 1516, 2007.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. *et al.* Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, p. 275-292, 2006.

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

DUARTE, S. *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, n. 51, p. 15-22, 2006.

ELTZ, T. *et al.* Determinants of stingless bee density in lowland dipterocarp forests of Sabah, Malaysia. **Oecologia**, n. 131, p. 27-34, 2002

FERNANDES JR, A. *et al.* The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, 2001.

GONÇALVES, L. S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento genético. **Anais do Encontro sobre Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais**, São Paulo, 1992.

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

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 183-206, 1999.

ITO, J. *et al.* Anti-AIDS Agents. Anti-HIV Activity of Moronic Acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, n. 64, p. 1278-1281, 2001.

IMPERATRIZ, F. V. L. O Apicultor e a conservação de abelhas sem ferrão. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura**, p. 79, 1998.

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

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo Instituto Biologia de São Paulo**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MICHENER, C. D. Classification of the Apidae (Hymenoptera) **The University of Kansas Science Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 75-164, 1990.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Plant Science**, v. 7, n. 9, 2002.

MORENO, M. I. N. *et al.* Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

NATES-PARRA, G. Las Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colômbia. **Biota Colombiana**, v. 2, n. 3, p 233-248, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.;ALENCAR, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. **Mensagem Doce**, n.58, p. 2-7, 2000.

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

PATERSON , I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drugs candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451-453, 2005.

PEREIRA, A. C.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

POPOVA, M. *et al.* Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 9-14, 2004.

SALATINO, A. *et al.* Origin and Chemical Variation os Brazilian Propolis. **Journal and Oxford University Press**, 2005.

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

SCAZZOCHIO, F. *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, doi: 10.1016/j.micres.2005.12.003, 2005.

SEIFRIED, H. E. Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 168-171, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

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

SOUZA, L.; CAMPOS, M. J. O. Composição e diversidade de abelhas (Hymenoptera) coletadas por armadilhas Moericke em uma área agrícola de Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 98, n.2, p. 236-243, 2008.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 55-64, 2000.

VANUCCI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 31-34, 1998.

VELIKOVA, M. *et al.* Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-696, 2000a.

VELIKOVA, M. *et al.* Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung**, 55c, p. 785-789, 2000b.

A Promising Natural Product: Propolis of Stingless Bee (*Melipona scutellaris*) from Bahia

Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo¹; Severino Matias de Alencar²; João Ernesto de Carvalho³; Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz³; Tatiane Luíza Cadorin Oldoni²; Masaharu Ikegaki^{1*}

¹*Universidade Federal de Alfenas / Unifal - MG; Departamento de Farmácia; Alfenas /MG;*

²*Esalq / USP; Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição; Piracicaba-SP;*

³*Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas-SP.*

*Correspondence:
Masaharu Ikegaki
Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - centro
37130-000 Alfenas-MG
Tel: 55-35-3299-1102
E-mail address: masaharu@unifal-mg.edu.br

ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze propolis from Uruçu (*Melipona scutellaris*) on its biological properties. The content of phenolic compounds by the method of Folin-Ciocalteu was 0,105 mg/mg of propolis. The crude extract of propolis presented significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in the test of antibiogram by agar diffusion and in the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), with a diameter of 27 mm of inhibition zone and MIC from 3.12 to 1.56 ppm. The most apolar fraction showed higher antimicrobial activity, with a diameter of 33 mm of inhibition zone for the fraction 3 and the MIC obtained was from 1.56 to 0.78 ppm. We also evaluated the antioxidant activity using the DPPH radical scavenging activity and crude extract showed dose-dependent response, and 89.05% in the concentration of 90 ppm. The less apolar fraction showed the higher antioxidant activity against DPPH, it was 67.36% for the concentration of 90 ppm. We also evaluated the cytotoxic activity of the crude extract on nine cancer cell lines, and it showed toxicity in a dose-dependent manner.

Uniterms: Propolis, Stingless Bees, Meliponinae, Biological Activities

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a própolis de urucu (*Melipona scutellaris*) quanto a suas propriedades biológicas. O teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu foi de 0,105 mg/mg de própolis. O extrato bruto da própolis demonstrou significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* nos testes de antibiograma em difusão em ágar e na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), com diâmetro de halo de 27 mm e CIM de 3,12 a 1,56 ppm. A fração mais apolar apresentou maior atividade antimicrobiana, com diâmetro de halo de 33 mm para a fração 3 e CIM de 1,56 a 0,78 ppm. Avaliou-se também a atividade antioxidante utilizando o radical DPPH e o extrato bruto apresentou atividade dose-dependente, sendo de 89,05% na concentração de 90 ppm. A fração menos apolar demonstrou maior atividade antioxidante em relação ao radical DPPH, sendo de 67,36% na concentração de 90 ppm. Avaliou-se ainda a atividade citotóxica do extrato bruto sobre nove linhagens de células tumorais humanas, tendo apresentado toxicidade para todas as linhagens de maneira dose-dependente.

Unitermos: Própolis; Abelhas sem ferrão; Meliponíneos; Atividades Biológicas.

INTRODUCTION

Nature, in general, has produced the majority of organic substances known. The plants contribute more significantly to supply secondary metabolites, which have great value as medicines, cosmetics, food and agrochemical (PINTO *et al*, 2002).

Bees have been in existence for more than 125 million years and their evolutionary success has allowed them to exploit all habitats on Earth. This success is largely because of the chemistry and application of the specific products that bees manufacture: honey, beeswax, venom, propolis, pollen and royal jelly (BANKOVA *et al*, 2005a).

Throughout history, man has learned to use natural products in medicine, propolis is one of many natural products used for centuries for humanity (PEREIRA *et al*, 2002).

Propolis (bee glue) is the generic name for the resinous substance collected by bees from the buds and exudates of various plant sources. The name derived from the Greek words *pro*, meaning *in front of* and *polis*, which is *city* or *community*, so propolis means a substance in defense of the hive (JASPRICA *et al*, 2007; CASTALDO;CAPASSO, 2002; LI *et al*, 2008).

Propolis is used by bees mainly against natural enemies (fungi and bacteria) at the entrance of hives to close cracks reducing the entry of wind and cold and is used to embalm small animals killed by bees avoiding putrefaction. Propolis is also used as a building material inside the beehives for the maintenance of their structure. The literature shows the activity of this natural resin against a variety of human and animal pathogens (SALOMÃO *et al*, 2004).

The native bees belong to tribe Meliponinae (subfamily Apinae) and encompass all the bees known as “stingless bees” found in tropical and subtropical regions of the planet (NATES-PARRA, 2001). Like honeybees, they are social insects that have been known for their production of honey, pollen and propolis, but their role in maintaining the ecosystem has been recognized nowadays (CORTOPASSI-LAURINO *et al*, 2006).

Stingless bees are essential pollinators, mainly in rainforests. Some of these bees prepare a special kind of propolis, called geopropolis. Geopropolis is quite different from propolis produced by *Apis mellifera* because geopropolis is a mixture of resins, wax and soil (BARTH, 2006).

The constituents of propolis vary according to the season and type of vegetation available in each region where propolis is produced (AHN *et al*, 2007).

According to Bankova and Popova (2007), prenylated benzophenones were isolated from five different types of propolis of stingless bees in Venezuela. Velikova *et al* (2000b) analyzed twenty-one samples of propolis of twelve different species of Meliponinae by GC-MS and grouped various types of chemical propolis of stingless bees according to prevailing type of compounds in alcohol extract: diterpenic, triterpenic, and gallic acid type. Mixed-type propolis was also observed.

Various biological activities, such as anticancer, antioxidant, antiinflammatory, antibiotic and antifungal have been demonstrated for propolis from the honey bee *Apis mellifera* and its constituents (BANSKOTA *et al*, 1999; LI *et al*, 2008). Propolis extracts show *in vitro* activity mainly against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and viruses (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

People keep stingless bees for honey, but these bees also collect plant resin and store in large deposits within their nests that are much easier to harvest compared to honey bee propolis and stingless bee propolis can be used in a similar way as honey bee propolis (BANKOVA; POPOVA, 2007).

Because of the popularity in traditional medicine, propolis has become object of intense study of chemistry and pharmacology in the last thirty years (BANKOVA *et al*, 2005b).

The purpose of this study was to analyze the propolis of Uruçu (*Melipona scutellaris*) from the state of Bahia for its physical and chemical characteristics and some biological properties. It was a very challenging study because the research is needed to scientifically support the medicinal properties of stingless bee propolis.

MATERIALS AND METHODS

Propolis Sample and Extraction

Stingless bee (*Melipona scutellaris*) propolis was collected in Entre Rios city in the state of Bahia – Brazil. The bees were set up in a box (20 cm x 20 cm) divided in two parts: the lower part, which was the nest and the top of the box that was the deposit of honey and pollen. Between the top and the lid of the box the bees made a layer of geopropolis, which was collected.

Propolis was ground to a fine powder and 50 g were mixed with 350 mL of absolute ethanol and shaken at 70°C for 30 minutes. After extraction, mixture was centrifuged and supernatant was collected. Residual propolis was extracted again with more 150 mL of absolute ethanol. After second centrifugation supernatants were evaporated under low pressure to obtain ethanolic extract of propolis of urucu (EEMU) which was used in the tests.

Fractionation of Ethanolic Extract of Propolis of Urucu

The fractionation of EEMU (1.0 g) was done using chromatography in a flash column of cellulose (20 cm x 3.0 cm). Cellulose was chosen because it is flexible, strong, inert to solvents used and transparent to the natural light and ultraviolet light. First, the column has been treated with hexane to remove the oily layer of protection. After this, the lower end was closed and the column was packed with silica gel 60.

The sample (1.0 g) was solubilized with absolute ethanol (2.0 mL) and mixed with approximately 3 g of silica gel 60. Solvent was evaporated at room temperature to obtain the mixture of EEMU and silica as a fine powder.

This fine powder was placed in the top of the column, and the mobile phase (a mixture of 94% chloroform and 6% ethyl acetate plus 1% of acetic acid) was added until it reaches the front line in the base of the column. After the development, the colored bands that appeared were cutted with a sharp blade. The bands were solubilized with absolute ethanol and filtered using a filter paper. After this, the fractions obtained were evaporated at room temperature and the fractions were applied in a TLC plate using the same mobile phase.

Determination of total phenolic content

The phenolic compounds content of crude extract was determined based on the method described by Woisky and Salatino (1998) and gallic acid was used as the standard.

At room temperature, 0.5 mL of EEMU dilutions (from 62.5 to 1000 µg/mL) were oxidized with a dilution 1:10 of the Folin- Ciocalteu reagent (2.5 mL) for 3 to 8 minutes. This mixture was neutralized with a solution of sodium carbonate 4%. The absorbance of the final color (blue) was measured in spectrophotometer at 740 nm after

incubation at room temperature and darkness for 2 hours. All tests were carried out in triplicate and the results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/ dry weight of the crude extract).

Determination of total flavonoids content

The total flavonoids content of the crude extract was determined using the method of Park *et al* (1998) and the quercetin was used as the standard.

At room temperature, 0.5 mL of EEPU dilutions (from 62.5 to 1000 µg/mL) were mixed with 4.3 mL of absolute ethanol and alcoholic solutions of 10 % aluminum nitrate (0.1 mL) and 1 M potassium acetate (0, 1 mL). After 40 minutes at room temperature, the absorbance was measured in spectrophotometer at 415 nm and results were expressed as quercetin equivalent (mg / g). All tests were carried out in triplicate.

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

According to Silva *et al* (2008), crude extract of Propolis of Uruçu and its fractions were analysed by RP-HPLC using a chromatograph equipped with a Shimadzu ODS-A column (RP-18, column size 250 mm; particle size, 5 mm) and photodiode array detector (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). EEPU and fractions were filtered with 0.22 µm filter (Millipore) prior to 20 µL injected into the HPLC system. For crude extract, the column was eluted using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 40% B and increasing to 60% B (45 min), held at 90% B (45–75 min), and decreasing to 30% B (75–85 min) with a solvent flow rate of 1 mL/min and detection with a diode array detector.

For fractions the method was changed by which the compound was eluted before. The column was eluted by using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 60% B, increasing to 90% B (70 min) and decreasing to 60% B (75 min).

Chromatograms were recorded at 260nm as described by Park *et al* (2004). The following authentic standards of phenolic acids and flavonoids (Extrasynthese Co.) were examined: p-coumaric, ferulic acid, cinnamic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, kaempferide, apigenin, isorhamnetin, rhamnetin, sakuranetin,

isosakuranetin, hesperidin, hesperetin, pinocembrin, chrysin, acacetin, galangin, myricetin, tectochrysin and artepillin C.

Antioxidant assay

Free radical-scavenging activity measurement (DPPH)

Several methods are used to determine the antioxidant activity in extracts and substances isolated. One of the most used is the measure of the scavenging of free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazide (DPPH).

Two mL of dilutions of crude extract (22.5, 45, 90, 180 e 360 µg/mL) and of the three fractions (90 µg/mL) in absolute ethanol were added to 0.5 mL of 0.5 mM DPPH in absolute ethanol (YEN; CHANG; DUH, 2005, little modified). BHT and ascorbic acid were used as standards in the same concentrations of the crude extract. The mixtures were left for 30 minutes in darkness at room temperature and the final color were measured in spectrophotometer at 517 nm. A negative control was used, consisting of 4 mL of ethanol and 1 mL of DPPH solution. The DPPH radical-scavenging capacity was calculated by the formula:

$$\%SC = \{[Abs \textit{negative control} - (Abs \textit{sample} - Abs \textit{blank})] \times 100\} / Abs \textit{negative control}$$

Where % SC = % scavenging capacity, Abs = Absorbance

Antimicrobial Assays

The following methods were used to evaluate the activity of propolis extract and its fractions. All tests were performed in triplicate, using ethanol without propolis as a control of the solvent inhibitory effect and sterile saline was used as a negative control. Green propolis was used to compare the activity of stingless bee propolis and *Apis mellifera* propolis.

Microorganisms

The microorganisms used in these tests were obtained cultures of 24 hours and suspended in sterile saline solution to obtain concentrations of approximately 10^7

CFU/mL. In this study the microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 25922, donated by the Microbiology Laboratory of Unifal-MG. The cultures were stored in Nutrient agar at 4 to 8°C.

Agar Diffusion Method

Crude extract and its fractions were tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 25922 through the agar diffusion method described in Lorian (1996). The plates were prepared using sterile Nutrient Agar with 1% of the saline solution containing the microorganism inoculated. All plates tested were incubated at 37 °C for 24 hours. The inhibition zones were observed and measured. Crude extract presented activity only against the Gram-positive bacteria, so the next tests were done only against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration

Dilutions of crude extract and its fractions were tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in the concentrations of: 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 and 0.78 µg/mL all in absolute ethanol. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined in accordance with CLSI guidelines (M100-S15, 2005) and Duarte *et al.* (2003), with few modifications.

Sterile saline solution containing the bacteria obtained from 24 hours culture was inoculated in Nutrient Broth in a concentration of 1%. Test was performed in triplicate for each concentration of extract and fractions. 4950 µL of medium were incubated with 50 µL of each concentration of extract or fractions for 24 hours at 37°C. Medium without bacteria was used as negative control and medium without bacteria containing only extract or fractions were used as propolis control. The lowest concentration with no visible growth (absorbance < 0.05 at 660 nm) was the MIC. After this, 50 µL of the tubes with concentrations higher than MIC were cultured on Nutrient Agar for 24 hours, at 37° C and the lowest concentration that allowed no visible growth was the MBC.

Cytotoxic assay

Crude extract was evaluated for its antiproliferative activity in a panel of tumor cells lines and cell growth was calculated using Sulforhodamine B (SRB) Assay (SHOEMAKER, 2006). The cell lines tested are in the table I.

TABLE I: Cell lines used in antiproliferative activity assay.

Cell line	Cell type	Embrionary origin
K562 (Leukemia)	Lymphoblastic	Mesenchyma
NCI-H460 (Lung)	Epithelial	Endoderm
MCF-7 (Breast)	Epithelial	Ectoderm
NCI-ADR/RES (Ovary*)	Epithelial	Ectoderm
UACC-62 (Melanoma)	Fibroblastic	Ectoderm
786-O (Renal)	Epithelial	Mesoderm
HT-29 (Colon)	Epithelial	Endoderm
OVCAR-3 (Ovary)	Epithelial	Mesoderm
PC-3 (Prostate)	Epithelial	Mesoderm

* This line is resistant to multiple drugs.

These cell lines were maintained in the laboratory of cell culture in bottles of 25 cm³ containing 5 mL of medium RPMI 1640 (Gibco[®]) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (SFB) (Gibco[®]) and were incubated at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂.

The antiproliferative activity assay consisted on the inoculation of 100 µL/well, in a 96 well plate (Nunc[®]), of a suspension with density between 3x10⁴ and 6.5x10⁴ cel/mL in medium RPMI/SFB plus gentamicin 50 µg/mL. That was also prepared a plate called T0, in which cell lines were inoculated in only six wells (100 µL/well).

After incubation for 24 hours at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂, sample was added (100 µL/well) in four concentrations (0.25; 2.5; 25 e 250 µg/mL). Doxorubicin was used as positive control in concentrations of 0.025; 0.25; 2.5 e 25 µg/mL.

Immediately after inoculate samples in the test plate, the T0 plate was fixed with 50 µL/well of 50% trichloroacetic acid (TCA) and maintained for 1 hour at 4°C. After this, the plate was washed with water four times to remove TCA waste, SFB and secondary metabolites and left to dry at room temperature. This plate indicated the amount of cells present in test plate at the time of samples inoculation.

After 48 hours of incubation, test plate with samples was fixed as described for T0 plate. After dry at room temperature, plates were stained with 50 µL/well of 0.4%

SRB (in acetic acid 1% v/v) and maintained at 4°C for 60 minutes. Finally, SRB were solubilized with Trizma Base (Sigma[®], 150 µL/well, 10µM, pH 10.5). The absorbance was measured in spectrophotometer at 540 nm.

With the absorbance values for each sample, the percent of growth was calculated by the formula:

If $T > C \rightarrow$ increases cellular growth

If $T \geq T_0 < C \rightarrow$ cytostatic activity: $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

If $T < T_0 \rightarrow$ cytotoxic activity: $100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Where:

T = absorbance of the treated cells – absorbance of the sample without cells.

C = absorbance of the untreated cells.

T₀ = Absorbance of the cell control in T₀ plate.

A graphic of percent of growth x concentration was done by using software Origin 7.5. The total growth inhibition (TGI) was calculated using this graphic and represent the concentration necessary to have 0% of cell growth.

Statistical analysis

All of the data was expressed as a mean \pm s.d. from at least three separated experiments (repetitions) performed in triplicate. The ANOVA test for unpaired observation between controls and experimental samples and Tukey's test for multiple comparisons were conducted to evaluate statistical differences; *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Propolis Sample, EEPU and fractions

The crude propolis of Uruçu and EEPU obtained showed dark brown color, flexibility and a pungent smell.

After extraction of the crude propolis of uruçu, was made the fractionation using a flash column and four distinct fractions (Table II) were obtained.

TABLE II: Fractions obtained from EEPU after the process of fractionation with a cellulose column.

Fraction	Color
0	Dark Brown
1	Reddish Brown
2	Yellow
3	Yellowish Brown

Every column used 1.0g of EEPU and were made five columns, totaling 5.0 g of the crude extract of propolis of Uruçu. The mass and yield of each fraction after the evaporation of the solvent are presented in Table III.

TABLE III: The mass and the yield of the fractions obtained from EEPU after development of five cellulose columns.

Fraction	Mass (g)	Yield (%)
0	0.1854	3.708
1	0.0474	0.948
2	0.7669	15.338
3	1.188	23.76

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

EEPU and its fractions were analysed by RP-HPLC and the results are shown in Figure 1 and 3.

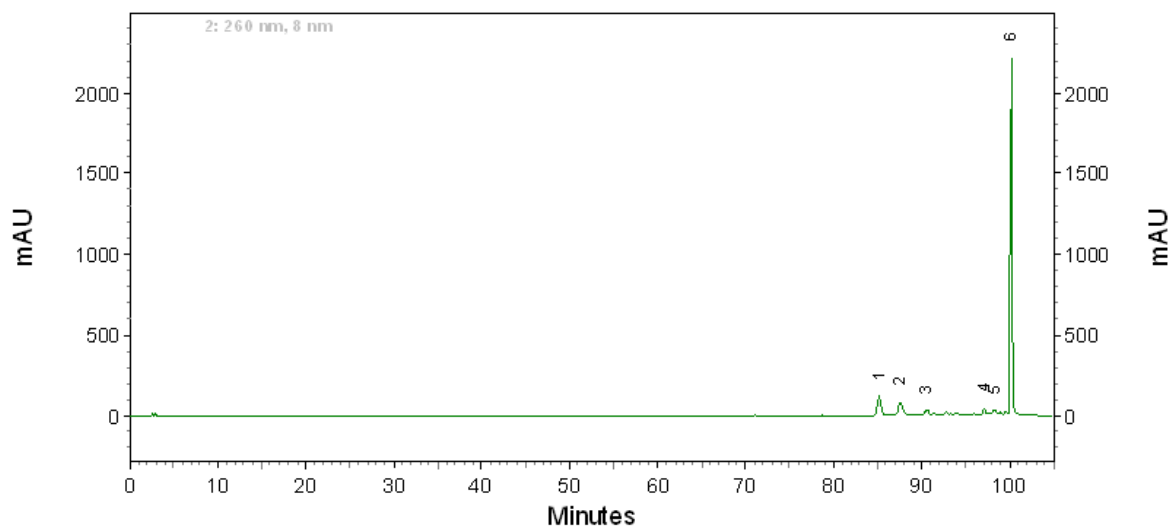


Figure 1: Chromatogram of EEPU. The composition of EEPU observed after the reversed phase HPLC analysis is mostly apolar and the peaks obtained were not identified in comparison with the standards used.

The EPU chromatogram is very similar to the chromatogram (Figure 2) of propolis type 6 produced by *Apis mellifera* bees analysed by Castro *et al* (2007), which has a composition mostly apolar. Castro *et al* (2005) identified in this propolis esters of fatty acids, aromatic compounds and terpenoids.

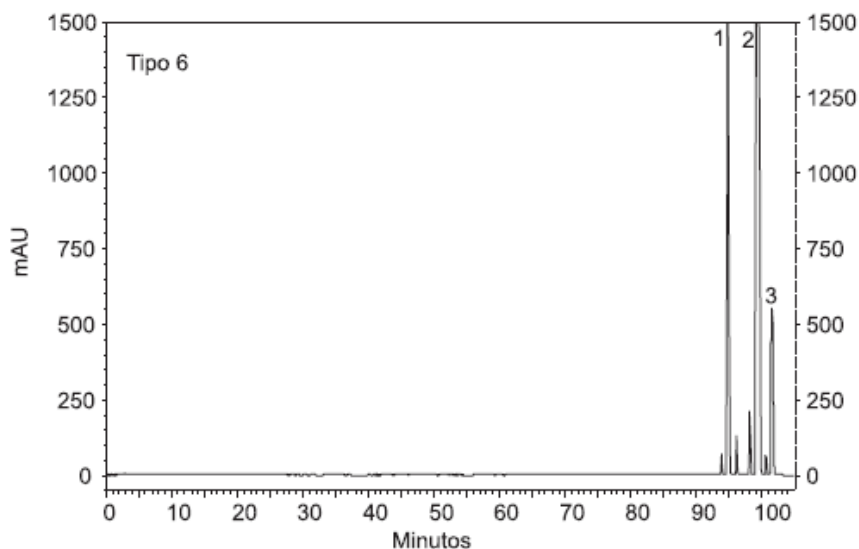


Figure 2: Chromatogram of propolis type 6 produced by *Apis mellifera* with a composition mostly apolar, like EPU (CASTRO *et al*, 2005).

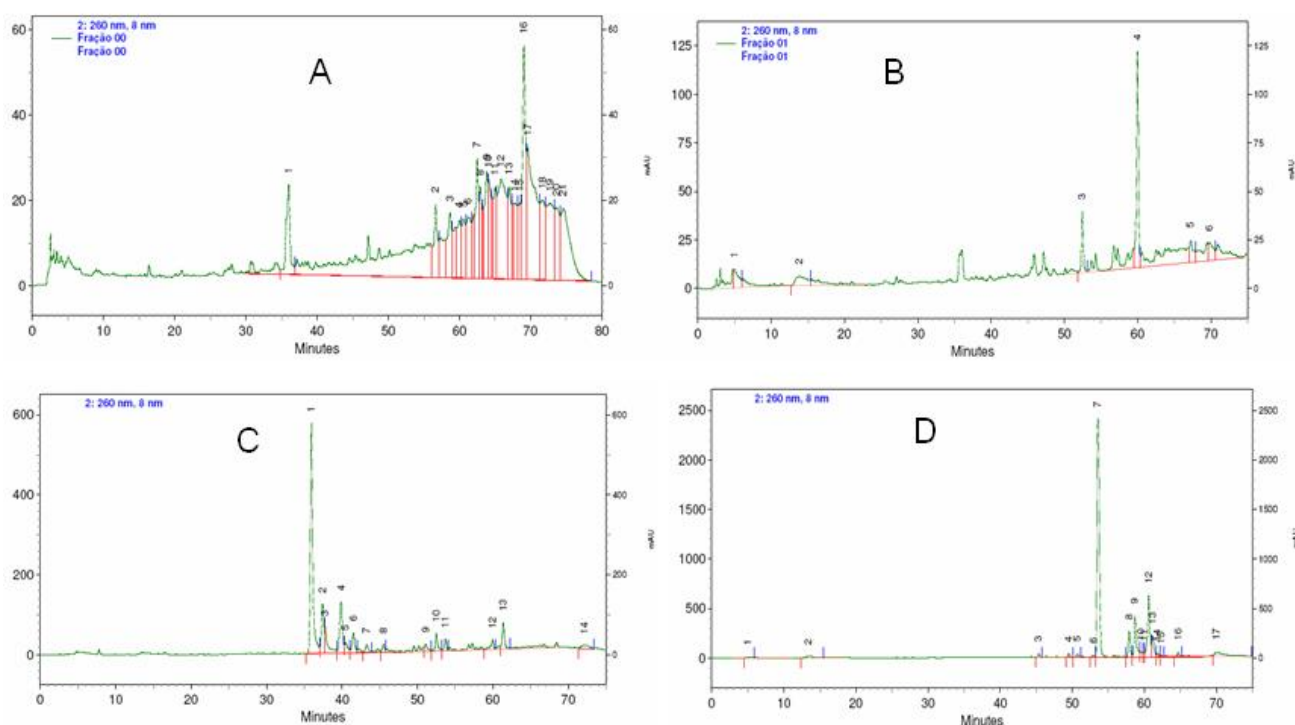


Figure 3: A- Chromatogram of fraction 0, the less apolar fraction. B- Chromatogram of fraction 1, the fraction with the higher antioxidant activity. C – Chromatogram of the fraction 2, a fraction with intermediate polarity. D– Chromatogram of the fraction 3, the most active fraction against *S. aureus*, which contains a peak of interest with a retention time of 53.554 min. That is possible to observe that the fractionation was effective.

In crude EEPU a majority peak was found at retention time of 100.16 min (peak 6) and the fraction 3 showed a peak at 53.66 min (peak 7), with a similar UV spectrum. This peak is important because fraction 3 showed high antimicrobial and antioxidant activities. That is shown in Figure 4.

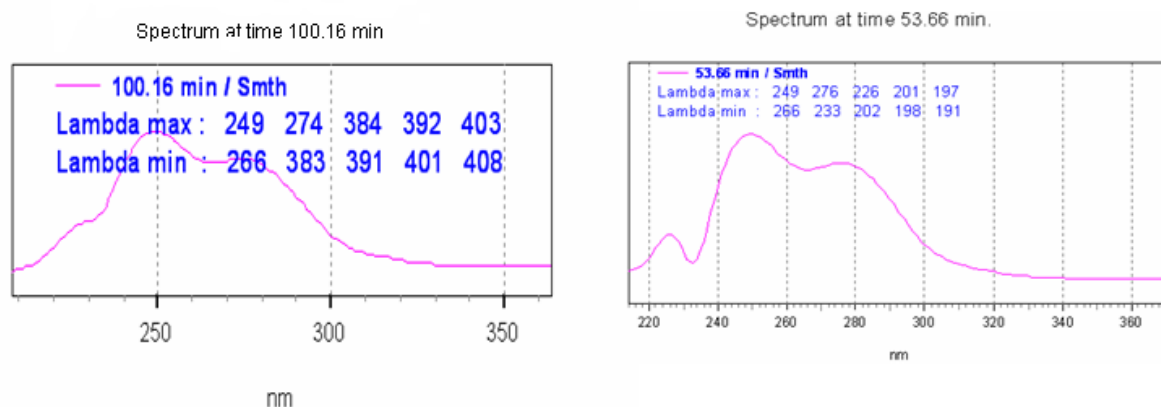


Figure 4: UV spectrum of the interest peak in the EEPU and in the fraction 3. It shows that the fractionation was efficient.

In fraction 1 the majority peak was peak 4 and in fraction 2, was peak 1. The spectrums of aUV of these peaks are shown in Figure 5.

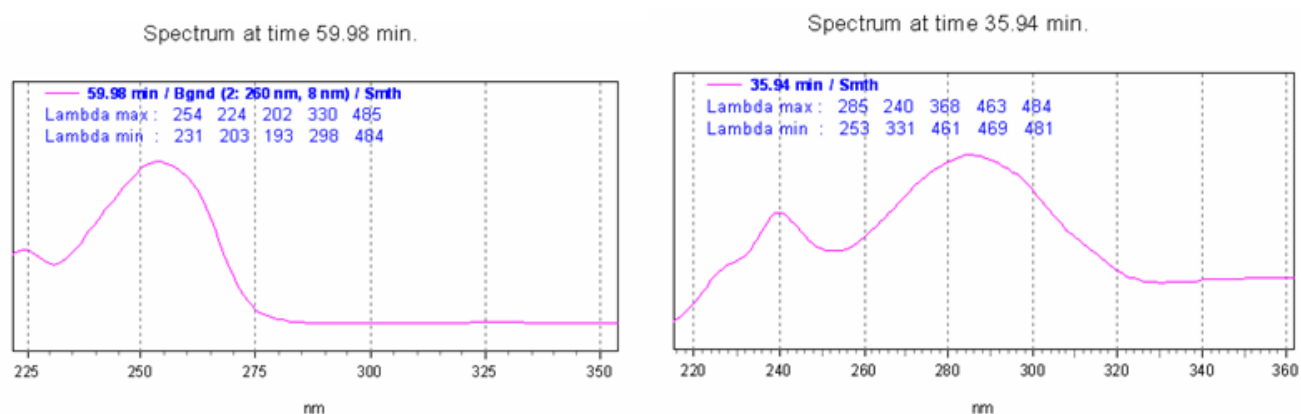


Figure 5: Spectrum of UV of the peak 4 from fraction 1 at time 59.98 min and peak 1 from fraction 2 at time 35.94 min. Fraction 1 showed a high antioxidant activity and none antimicrobial activity and fraction 2 showed moderate antioxidant and antimicrobial activities.

The spectrum of UV of the majority peaks of fractions and crude extract are important to show that the fractionation was efficient once all these peaks are different between them. The same peak is presented only in crude extract and in fraction 3, which demonstrated the higher antimicrobial activity.

Total phenolic and flavonoid contents

The total phenolic contents of crude extract analyzed by the Folin-Ciocalteu method was 0.105 mg GAE/mg EEPU. That is a moderate value comparing to propolis of *Apis mellifera* (red propolis), which presented a total of phenolic compounds of 232 mg GAE/g EEP, according to Alencar *et al* (2007). None flavonoids were found in EEPU.

The composition of propolis from Uruçu (*Melipona scutellaris*) was analysed only by Velikova *et al* (2000b), but was a sample collected in Pernambuco state (Brazil). Velikova *et al* (2000b) identified by GC-MS phenolic acids and sugars in this sample.

The previously constituents isolated from Meliponinae propolis are flavonoids aglycones, aromatic alcohols, aldehydes, acids and esters, aliphatic acids and esters, hydrocarbons, terpenoids. Three *ent*-kaurene diterpenoids were isolated from a propolis sample collected by Brazilian native bees *Melipona quadrifasciata anthidioides*. One of them was the kaurenoic acid that displayed moderate antibacterial activity (VELIKOVA *et al*, 2000a).

The composition of the propolis depends on the place and time of collection. More than 160 constituents have been identified in propolis of *Apis mellifera* so far, among which phenolic compounds, including flavonoids, are major constituents (NIEVA *et al*, 2000; BONVEHÍ *et al*, 1994).

In propolis of *Apis mellifera*, the major polyphenols are flavonoids, followed by phenolic acids and esters, phenolic aldehydes and ketones. Antimicrobial activity has been attributed mainly to the flavonoids pinocembrin, galangin and pinobanksin. Other active compounds are ester of coumaric and caffeic acids. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is cytotoxic towards tumor cells (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Silva *et al* (2006) studied the correlation between total phenolic and flavonoid levels and founded that flavonoids levels had a greater influence on the antioxidant activity of the honey bee propolis extracts than on their antimicrobial profiles. In one group of extracts, there was a strong linear relationship between total phenolic contents and biological activities.

Antioxidant Activity

Crude extract of propolis of Uruçu and its fractions were analyzed for their antioxidant activity by the DPPH scavenging activity assay (YEN *et al*, 2005, little

modified). Crude extract was tested in five concentrations: 360, 180, 90, 45 and 22.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the fractions were analyzed at the concentration of 90 ppm. All tests were done in triplicate using BHT and ascorbic acid as standards. The results are shown in Figure 6.

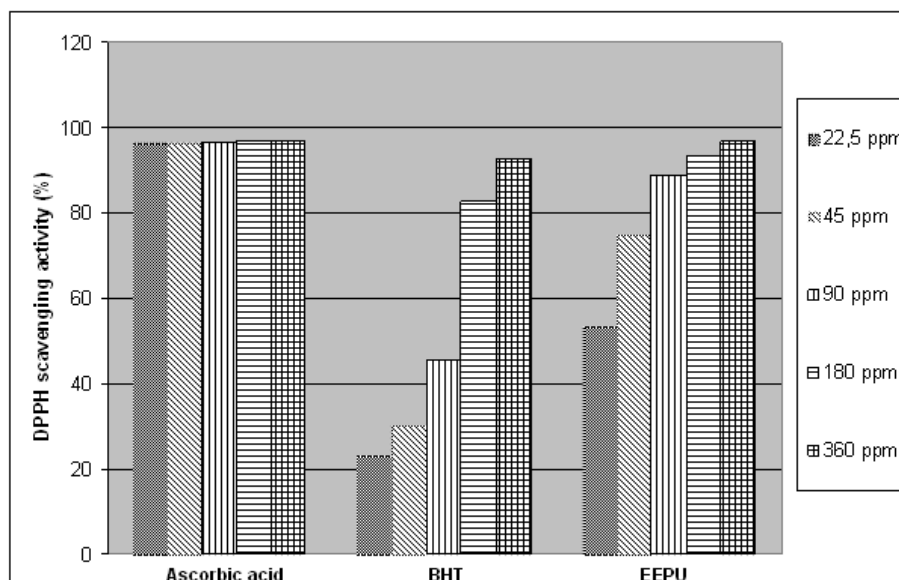


FIGURE 6 – DPPH scavenging activity of the standards and EEPU. EEPU showed a high and a dose-dependent DPPH scavenging activity.

The crude extract showed a dose dependent response and a high DPPH scavenging activity (90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 89.05%) compared to the standard ascorbic acid (90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 96.67%).

The fractions obtained from EEPU were also tested by the same method and the results are presented in Figure 7.

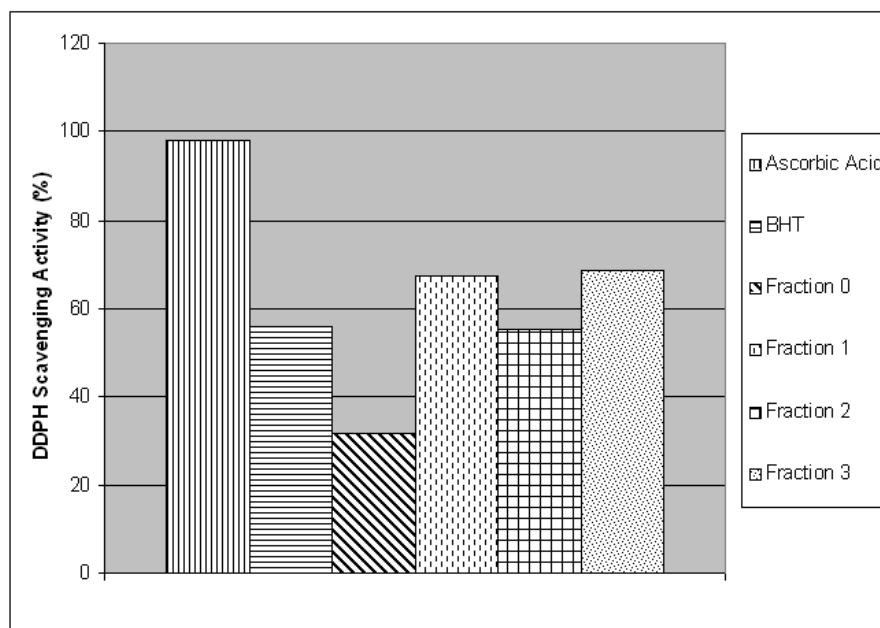


Figure 7: DPPH scavenging activity of the fractions from EEPU. The most active fractions obtained were fraction 1 and fraction 3 with DPPH scavenging capacity of 67.36% and 68.74% respectively.

A significant difference between EEPU, fractions and standards sequestering capability of DPPH radicals was observed after statistical analysis. Only between BHT versus fraction 0 and between fractions 1 and 3, the results showed less significance ($p < 0.05$). This result indicates the presence of antioxidant compounds in the crude extract and its fractions.

This result indicates a synergic action of the fractions because of the higher activity of the crude extract comparing with each fraction and the efficiency of the fractionation process, the activities of the fractions are different between them.

EEPPU showed a little content of phenolic compound and none flavonoids compounds, but a high antioxidant activity, comparable to the standard. Silva et al (2006), analyzing commercial propolis extracts observed that there are linear correlation between phenolic or flavonoids contents and biological activities.

Several diseases are related to the high levels of free radicals in the body, such as cardiovascular disease, arthritis, neurological disorders, psychiatric illness, aging, osteoporosis, diabetes, inflammation and cancer (MENEZES, 2005). For the control and prevention of these diseases, there is a strong tendency to use natural products containing polyphenols with antioxidant properties (URQUIAGA, 2000).

Propolis of *Apis mellifera* contains a series of polyphenols and several other compounds able to remove the excess of free radicals in the body (MENEZES, 2005).

A study about antioxidant activity of honey bee propolis of various geographic origins was made by Kumazawa *et al* (2004). They used two different assays: inhibition of linoleic acid oxidation and free radical scavenging activity with DPPH. They conclude that propolis with strong antioxidant activity contained antioxidative compounds such as kaempferol and phenethyl caffeate.

There is also one communication about antioxidant activity of Meliponae propolis that by Manrique and Santana (2004). They worked with ethanolic extracts from *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* and *Nannotrigona* sp that showed low flavonoids contents (from 0.19% to 0.32%) and high antioxidant activity.

Antimicrobial assay

Crude extract of *Melipona scutellaris* propolis was tested against *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC 25922 by an agar diffusion method. The EEPU showed a high activity against *S. aureus* ATCC 6538 and no activity against *E. coli* ATCC 35922. The results against *S. aureus* ATCC 6538 are presented in Tables IV and V.

Table IV: Diameter of the inhibition zone obtained for EEPU and Green Propolis. This result shows the higher antimicrobial activity of EEPU against *S. aureus* than the Green Propolis from *Apis Mellifera*.

Sample	Diameter of the inhibition zone (mm)
<i>Melipona scutellaris</i> Propolis	27
Green Propolis	18
Absolute Ethanol	0
Sterile 0,85% saline	0

Table V: Diameter of the inhibition zone for the fractions of EEPU. The same test was done to the fractions and the most apolars fractions showed higher antimicrobial activity.

Sample	Diameter of the inhibition zone (mm)
Fraction 0	0
Fraction 1	0
Fraction 2	14
Fraction 3	33

This result indicates that the fractionation process increased the antimicrobial activity.

After this screening, crude extract and fraction 3 were tested for their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the results are in Table VI.

Table VI: MIC values from crude extract and its fractions. The crude extract of propolis of Uruçu and its fractions showed a high antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 6538 compared to the Green Propolis, with extremely low values.

Sample	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Melipona scutellaris</i> Propolis	3.12 – 1.56
Fraction 3	1.56 – 0.78
Green Propolis	50-25

According to Rios and Recio (2005), MIC values below 100 $\mu\text{g/mL}$ for extracts and 10 $\mu\text{g/mL}$ for isolated compounds are considered active. This way, EEPU and fraction 3 are very promising for antibacterial activity.

Manrique and Santana (2004) studied ethanolic extracts from *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* and *Nannotrigona* sp against *S. aureus* ATCC 25.943 and *Micrococcus luteus* ATCC 9.341 and obtained inhibition zone from 11 to 25 mm.

Fernandes *et al* (2001) studied the antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees and one of their samples was from *Melipona scutellaris* from state of Pernambuco (Brazil). This sample showed better activity against *S. aureus*, with a MIC 90% value of 230 $\mu\text{g/mL}$. The MIC 90% values against *Enterococcus* sp and *E. coli* were 2.37 mg/mL and 5.33 mg/mL, respectively.

The antibacterial activity of stingless bee propolis was found similar to that of honeybee propolis, Meliponinae propolis was active against Gram-positive microorganisms and less active or inactive against Gram-negative ones (BANKOVA *et al*, 2007).

Cytotoxic assay

Crude extract was tested for its antiproliferative activity in a panel of tumor cells lines and TGI was calculated (Table VII). Doxorubicina was used as a positive control. The results are shown in Figure 8 and 9.

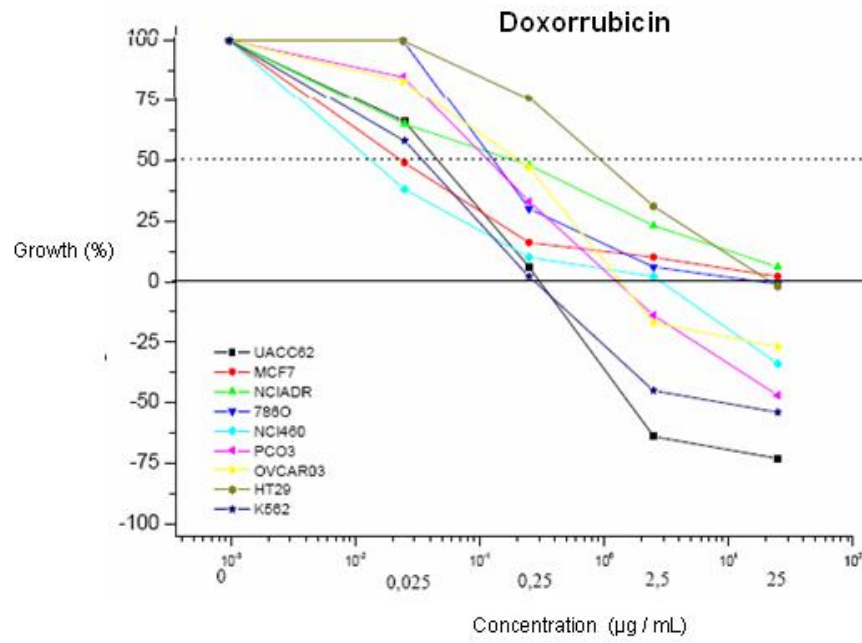


Figure 8: Cytotoxic assay for the standard Doxorubicin.

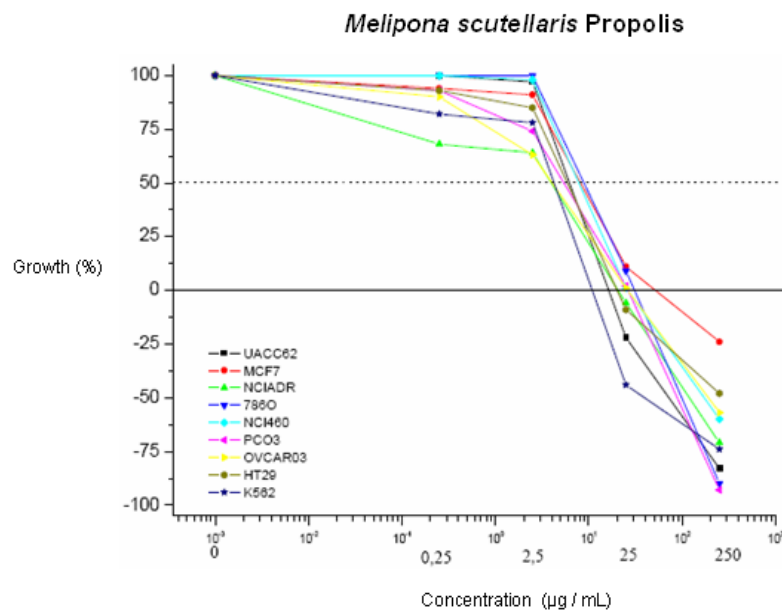


Figure 8: Cytotoxic assay for the sample of EEPU.

Table VII: Total growth inhibition (TGI ($\mu\text{g/mL}$) – concentration needed to 0% growth. Where: U = UACC-62, M = MCF-7, A = NCI-ADR/RES, 7 = 786-0, 4 = NCI-H460, P = PC-3, O = OVCAR-3, H = HT-29, K = K562.

	U	M	A	7	4	P	O	H	K
Doxo	0.30	>25	>25	8.81	1.44	1.66	2.73	17.91	0.40
EEMU	19.12	72.45	19.29	28.42	33.06	23.32	27.40	31.05	12.22

EEMU presented a dose dependent activity against all cell line tested and the standard doxorubicin presented an activity 10 x higher than EEMU, but the most interesting result was against NCI-ADR/RES cell line, which is a cell line resistant to multiple drugs. The crude extract showed better results (19.29 $\mu\text{g/mL}$) in this cell line than the standard doxorubicin (>25 $\mu\text{g/mL}$).

A variety of compounds showing growth inhibitory activity on various tumors was isolated from propolis produced by *Apis mellifera*. Compounds isolated from propolis can act synergistically increasing the activity of tumoricidal drugs (MENEZES, 2005).

According to Bankova and Popova (2007), the potencial cytotoxicity of stingless bee propolis from several species has been studied. Samples from *Melipona quadrifasciata* and *Nanotrigona testacularis* demonstrated toxicity much better than honeybee propolis and all these propolis samples belonged to the diterpenic type.

Propolis of stingless bee is a promising natural product and need further studies about chemical constituents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Mr. José Emídio Borges de Souza for providing the propolis samples, Unifal-MG and CAPES for the financial support.

REFERENCES

- AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters*, doi:10.1016/j.canlet.2006.12.039, 2007.
- ALENCAR, S. M. ; OLDONI, T. L. C.; Castro, M. L.; CABRAL, I. S. R; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J. of Ethnopharm.*, n. 113, p. 278-283, 2007.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharm.*, v. 100, p. 114-117, 2005a.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid.-based Compl. Aletrn. Med.*, v.2, n. 1, p. 29-32, 2005b.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmac. Rev.*, v. 1, n.1, p. 88-92, 2007.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 896-900, 1999.
- BARTH, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *Apiac.*, v.41, p. 71-85, 2006.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V.; JORDA, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 71, p. 529-532, 1994.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitot.*, v. 73, supl. 1, p. S1-S6, 2002.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, M. H. Própolis from Southeastern and Northeastern of Brazil: The influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Quím. Nova*, v. 30, p. 1512-1516, 2007.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*: Fifteenth Informational Supplement CLSI document M100-S15. Wayne, PA, 2005, 177 p.
- 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. *Apidol.*, v. 37, p. 275-292, 2006.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, n.4, p. 527-531, 2003.

FERNANDES JR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Tox.*, v. 7, n. 2, 2001.

JASPRICA, I.; MORNAR, A.; DEBELJAK, Z.; SMOLEIE-BUBALO, A.; MEDISARIE, M.; MAYERM L.; ROMIE, Z.; BUCAN, K.; BALOG, T.; SOBOCANEC, S.; SVERKO, V.; In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. Ethnopharm.*, v. 110, p. 548-554, 2007.

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

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 5434-5440, 2008.

LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn. Williams and Wilkins, Baltimore, 330 p., 1996.

MANRIQUE, A. J.O.; SANTANA, Y. W. Antibacterial and antioxidant activities of propolis of native (Brazil and Venezuela) stingless bees (*Melipona quadrifasciata* Lep., *Tetragonisca angustula* and *Nannotrigona* sp.). *Proc. 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, Brasil*, 710 p. CD-ROM, 2004.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

NATES-PARRA, G. Las Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colômbia. *Biota Colomb.*, v. 2, n. 3, p 233-248, 2001.

NIEVA MORENO, M. I.; ISLA, M. I.; SAMPIETO, M. A. Vattuone, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharm.*, v. 71, p. 109-114, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc. Tecn. Alim.*, v.18, n. 3, 1998.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PEREIRA, A. C.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e perspectivas futuras. *Quím. Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharm.*, v. 100. p. 80-84, 2005

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Let. Appl. Micr.*, v. 38, p. 87-92, 2004.

SHOEMAKER, R.H. The NCI 60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nature Rev.*, v. 6, p. 813-823, 2006.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.*, v. 99, p. 431-435, 2006.

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. *Evid.-based Compl. Aletrn. Med.*, v.5, p. 313-316, 2008..

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biolog. Res.*, v. 33, n. 2, p. 55-64, 2000.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitot.*, v. 71, p. 693-696, 2000a.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Z. Naturf.*, 55c, p. 785-789, 2000b.

YEN, W.J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. *Food Science Tech.*, v.38, n.3, p.193-200, 2005.

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