



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith
como insumo na geração de produtos leishmanicidas

Richard Pereira Dutra

São Luís-MA

2012

RICHARD PEREIRA DUTRA

**Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo
na geração de produtos leishmanicidas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia –
Ponto Focal do Maranhão, da Universidade Federal
do Maranhão, como requisito para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

São Luís-MA

2012

Dutra, Richard Pereira

Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas. 2012

140f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Rosane Nassar Meireles Guerra.

Co-orientadora: Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Maranhão -
Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, 2012.

1. Geoprópolis 2. Abelhas sem ferrão 3. *Melipona fasciculata* Smith 4.
Leishmania amazonensis 5. Atividade leishmanicida 6. Taninos hidrolisáveis I.
Título

CDU 638.162

RICHARD PEREIRA DUTRA

Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

A Banca Examinadora da qualificação de Tese de Doutorado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em 19 / 09 / 2012

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro (Co-orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos (1º Examinador)
Universidade Federal do Pará - UFPA

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto (2º Examinador)
Centro Universitário do Maranhão - CEUMA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (3º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes (4º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico este trabalho aos meus pais, Vasti, Lásaro (*in memorian*), ao meu irmão Rafael, minha esposa Juliana e ao meu filho Pedro Lucas.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo presente da vida, por ser minha fortaleza, por tantas oportunidades recebidas e pela realização de mais um sonho.

À minha família, minha mãe Vasti Dutra, meu irmão Rafael Dutra e minha esposa Juliana Pereira pelo apoio, amor e carinho incondicional que sempre me proporcionaram. Pessoas especiais com as quais aprendi a ser humilde e ter garra para ir atrás de todos os meus sonhos.

À Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra, por sua orientação, confiança e oportunidade para a realização do doutorado.

À Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro, não só pela co-orientação, mas pela presença constante em todos os momentos, o que fez surgir uma grande amizade, fruto do respeito, confiança, paciência e incentivos que me ajudaram a seguir em frente.

À Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento, pelas contribuições nos testes biológicos.

À Profa. Dra. Flávia Amaral, pelas contribuições na organização dos resultados deste trabalho.

À Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres, por sua amizade e valiosas contribuições nas análises químicas por cromatografia gasosa, realizadas no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, que tanto enriqueceram este trabalho.

À Dairlane e Gabriel, alunos do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, pela gentileza, disponibilidade e contribuições durante as análises químicas por cromatografia gasosa.

À Jeamile Bezerra, Mayara Silva e Fernando Patricio pela amizade, gentileza, paciência e apoio para a realização dos ensaios leishmanicidas.

Ao Tonicley Alexandre da Silva pela disponibilidade e contribuições em todas as etapas da patente, da escrita ao depósito.

À Professora Gilvanda Nunes e a Valéria Aranha do Departamento de Apoio a Projetos de Inovação e Gestão de Serviços Tecnológicos (DAPI), pelas correções e normatização do pedido de patente.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia I, Bruno Vinícius, Marisa Batista, Mayara Soares, Janale Santos, Vanessa Silva, Abigail Castro, Josianne Barboza, pela amizade, companheirismo, nas análises químicas e pelos momentos de descontração vividos.

Aos amigos do Laboratório de Imunofisiologia (LIF), Aramys Silva, Abigail Araújo, Anselmo, Anne Karine Martins, Diego Arruda, Thiare Fortes, Lucilene Amorim, Éder Fialho, Graciomar Costa, pelas colaborações na realização dos testes biológicos.

Aos colegas de Pós-graduação Monica Viegas, Lucio Campos, Daniel Duarte pela amizade, companheirismo e momentos de descontração durante a realização das disciplinas.

À Wilany Esposito, Técnica do Laboratório de Farmacognosia I, pela amizade e colaboração para a realização deste trabalho.

À bibliotecária Suênia Mendes e sua equipe, pela presteza em que providenciaram os artigos não disponíveis no portal CAPES.

À Marta Ribeiro e Liliane Cutrim responsáveis pela higienização das instalações do prédio de Farmácia, pela colaboração na organização do Laboratório de Farmacognosia I.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) pela oportunidade da realização do doutorado em Biotecnologia.

À Universidade Federal do Maranhão, ponto Focal Maranhão do Programa em Biotecnologia, por oferecer as condições para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Melipona fasciculata Smith, ocorre no Brasil, especialmente no estado do Maranhão, onde é popularmente conhecida como tiúba. A tiúba produz mel, cera, geoprópolis e acumula pólen. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de diferentes amostras da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, visando à obtenção de um produto com atividade leishmanicida. As amostras de geoprópolis foram coletadas em diferentes localidades do município de Fernando Falcão-MA e submetidas a processo extrativo com solução hidroalcoólica, obtendo-se os extratos hidroalcoólicos da geoprópolis (EHG1, EHG2 e EHG3). Os extratos foram utilizados para avaliação *in vitro* da ação leishmanicida, utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O EHG1, que apresentou maior atividade leishmanicida, foi submetido à partição líquido-líquido, resultando nas frações hexânica (FH), fração clorofórmica (FC), fração acetato de etila (FA) e fração hidroalcoólica (FHA). As frações foram avaliadas quanto à atividade leishmanicida e antioxidante, e ainda analisadas quanto à concentração de polifenóis totais e composição química. Os extratos da geoprópolis apresentaram concentração inibitória (CI₅₀) entre 47 a 229 µg/mL. O extrato mais ativo foi EHG1 e a sua fração mais ativa foi a FA com CI₅₀ de 29,89 µg/mL, enquanto as frações FC e FHA apresentaram CI₅₀ de 43,21 µg/mL e 49,48 µg/mL, respectivamente. O EHG1 e as frações leishmanicidas apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH e elevados teores de polifenóis totais. A fração hexânica não apresentou ação leishmanicida, antioxidante e apresentou as menores concentrações de polifenóis. Os extratos apresentaram ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, antraquinonas, açúcares e álcoois, nas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A fração mais ativa (FA) apresentou principalmente o ácido gálico, enquanto nas demais frações foram identificados ácidos graxos, ácidos orgânicos, antraquinonas, diterpenos, triterpenos, esteróides, açúcares e álcoois. Nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) do extrato fração mais ativos foram identificados ácidos fenólicos, galotaninos e elagitaninos, corroborando com os dados obtidos por CG-EM. Com base nos resultados foi obtido um bioproduto que quando testado nas mesmas condições também apresentou ação leishmanicida. Concluimos que a atividade leishmanicida e antioxidante da geoprópolis de *Melipona fasciculata* estão possivelmente relacionadas à presença de derivados dos ácidos gálico e elágico.

Palavras-chave: geoprópolis, *Melipona fasciculata*, atividade leishmanicida, atividade antioxidante, ácido gálico, ácido elágico, *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Melipona fasciculata Smith, occurs in Brazil, especially in the state of Maranhão, where it is popularly known as “tiúba”. The tiúba produces honey, wax, pollen and geopropolis. The aim of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of different samples of geopropolis *Melipona fasciculata*, aiming to produce a product with leishmanicidal activity. Geopropolis samples were collected in different localities of the municipality of Fernando Falcão-MA and subjected to extractive process with hydroalcoholic solution, obtaining the hydroalcoholic extracts of geopropolis (HEG1, and HEG2 HEG3). The extracts were used for *in vitro* evaluation of leishmanicidal action, using promastigotes of *Leishmania amazonensis*. The HEG1, with the highest leishmanicidal activity, was subjected to liquid-liquid partition, resulting in hexane fraction (FH), chloroform fraction (CF), ethyl acetate fraction (AF) and hydroalcoholic fraction (FHA). The fractions were assessed for leishmanicidal activity and antioxidant, and also analyzed for total polyphenol concentration and chemical composition. Extracts of geopropolis showed inhibitory concentration (IC_{50}) between 47-229 $\mu\text{g/mL}$. The most active extract was EHG1 and its most active fraction was the FA with IC_{50} of 29.89 $\mu\text{g/mL}$, while the IC_{50} FC fractions and FHA showed IC_{50} of 43.21 $\mu\text{g/mL}$ and 49.48 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The HEG1 and fractions leishmanicidal showed antioxidant activity towards DPPH and high levels of total polyphenols. The hexane fraction showed no leishmanicidal action, and had the lowest antioxidant concentrations of polyphenols. The extracts showed phenolic acids, organic acids, fatty acids, anthraquinones, sugars and alcohols, the analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The most active fraction (AF) showed mainly gallic acid, while the other fractions were identified fatty acids, organic acids, anthraquinones, diterpenes, triterpenes, steroids, sugars and alcohols. In the analysis by High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) extract the most active fraction were identified phenolic acids, ellagitannins and gallotannins, confirming the data obtained by GC-MS. Based on the results obtained was a byproduct that when tested under the same conditions also showed leishmanicidal action. In conclusion, the leishmanicidal activity of geopropolis *Melipona fasciculata* is likely to be related to the presence of gallic acid derivatives and ellagic.

Keywords: geopropolis, *Melipona fasciculata*, leishmanicidal activity, antioxidant activity, gallic acid, ellagic acid, *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1- <i>Melipona fasciculata</i> Smith (tiúba), visita a flor de <i>Bixa orellana</i> L. e caixa cabocla com colméia de <i>Melipona fasciculata</i> Smith cultivada no estado do Maranhão.....	18
Figura 2 - Tipos de geoprópolis produzida por <i>Melipona fasciculata</i> Smith (tiúba) produzida no estado do Maranhão.....	19
Figura 3 - Distribuição dos principais biomas do estado do Maranhão.....	20
Figura 4 – Metabólitos secundários com atividade leishmanicida.....	43

Capítulo II

Figura 1 - Percentagem de letalidade de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> pelo extrato hidroalcoólico da geoprópolis e suas frações.....	80
--	----

Capítulo III

Figura 1- Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG) e da fração acetato de etila (FA) em 254 nm.....	97
Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos detectados na geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	98
Figura 3 - Fragmentação dos elagitaninos encontrados na geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	99

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão.....	23
Tabela 2 - Atividade biológica da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão.....	35

Capítulo I

Tabela 1 - Leishmanicidal activity of the hydroalcoholic geopropolis extracts (HEG), gallic acid, and ellagic acids against promastigote forms of <i>Leishmania amazonensis</i>	58
Tabela 2 - Chemical composition of the derivatized hydroalcoholic extracts of <i>Melipona fasciculata</i> geopropolis analyzed by combined gas chromatography-mass spectrometry.....	59

Capítulo II

Tabela 1 - Atividade leishmanicida do extrato e das frações da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	75
Tabela 2 - Perfil fitoquímico do extrato e das frações da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	76
Tabela 3 - Identificação dos compostos do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e suas frações analisados por (CG-EM).....	77
Tabela 4 - Compostos fenólicos identificados na fração acetato de etila (FA) da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM).....	79

Capítulo III

Tabela 1 - Concentração de polifenóis totais e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e frações.....	95
Tabela 2 - Compostos fenólicos identificados no extrato hidroalcoólico (EHG) e na fração acetato de etila (FA) da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSTFA	N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE- ESI-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EHG	Extrato hidroalcoólico de geoprópolis
EI	Ionização por impacto de elétrons
EM\EM	Espectro de fragmentação de massa-massa (<i>Tandem-MS</i>)
FA	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmica
FH	Fração hexânica
FHA	Fração hidroalcoólica
HHDP	Ácido hexahidroxidifênico
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NIST	National Institute of Standards and Technology
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	<i>Tampão fosfatosalina</i>
TIC	Cromatograma de Íons totais
TMCS	Trimetilclorosilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 <i>Melipona fasciculata</i> e outras abelhas sem ferrão.....	17
2.2 Composição química da geoprópolis e própolis de Meliponíneos.....	20
2.3 Atividades biológica da geoprópolis e própolis de Meliponíneos.....	33
2.4 Patentes de produtos com geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	38
2.5 Leishmaniose.....	38
2.6 Tratamentos das leishmanioses.....	40
2.7 Produtos naturais leishmanicidas.....	42
3OBJETIVOS	
3.1 Geral.....	45
3.2 Específicos.....	45
4 RESULTADOS	
4.1 CAPÍTULO I - Antileishmanial activity from Brazilian geopropolis.....	46
4.2 CAPÍTULO II - Atividade leishmanicida do extrato e frações da geoprópolis da abelha sem ferrão <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	60
4.3 CAPÍTULO III - Composição fenólica e atividadeantioxidante do extrato e frações obtidas da geoprópolisde <i>Meliponafasciculata</i> Smith.....	81
4.4 CAPÍTULO IV - Patente Depositada.....	100
5 CONCLUSÕES.....	102
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, abelhas nativas, sociais e sem ferrão, são importantes polinizadores e ocupam grande parte das regiões de clima tropical e subtropical, especialmente na América do Sul. No Brasil, especificamente no estado do Maranhão, há uma grande diversidade de abelhas sem ferrão, entre elas *Melipona fasciculata* Smith, conhecida popularmente como “tiúba” ou “tiúba do Maranhão”. A tiúba produz mel, cera, geoprópolis e acumula pólen, desempenhando um importante papel biológico como polinizadora e seus produtos são fonte de renda para as comunidades rurais do Estado.

A meliponicultura, criação das abelhas sem ferrão, faz parte dos arranjos produtivos locais, como área estratégica para o desenvolvimento do estado do Maranhão. Entretanto, o produto explorado comercialmente é o mel e não há a exploração dos demais produtos, entre eles a geoprópolis, que é descartada durante o processo de coleta do mel. A geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, cera, secreções salivares e terra.

Com o objetivo de possibilitar o aproveitamento econômico de novos produtos meliponícolas, nos últimos anos, o grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) têm realizado estudos químicos e biológicos com a geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* (tiúba). Os resultados encontrados têm demonstrado atividade antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e imunomoduladora. Estudos químicos com extratos da geoprópolis identificaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos e saponinas. Dados da literatura demonstram carência de estudos anti-protozoário, entre eles leishmanicidas, para produtos de abelhas sem ferrão, entretanto há relatos da ação leishmanicida para própolis de *Apis mellifera*.

Considerando que a quimioterapia das leishmanioses utiliza antimoniais pentavalentes, pentamidinas e anfoterina B, e que esses fármacos têm demonstrado eficácia variável entre as espécies de *Leishmania* spp, toxicidade, resistência dos parasitos e requer longo tempo de administração, faz-se necessário o estudo de novas drogas quimioterápicas para o tratamento dessa doença.

As leishmanioses são doenças tropicais causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam cerca de 350 milhões de pessoas no mundo e estão distribuídas em 88 países, incluindo o Brasil. As regiões Norte e Nordeste brasileiras concentram 90% dos casos humanos da doença, sendo o estado do Maranhão, área endêmica, com cerca 88% de seus municípios afetados pela doença.

Considerando os aspectos acima mencionados, o presente estudo avalia a ação leishmanicida da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, na busca de gerar insumos para produção de produtos leishmanicidas.

Os resultados deste trabalho serão apresentados em quatro capítulos, dispostos em três artigos científicos e um pedido de patente depositado. O primeiro capítulo descreve a atividade leishmanicida de extratos da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, assim como, a composição química analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). O segundo capítulo consiste em resultados de um estudo biomonitorado, utilizando as quatro frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, assim como, a composição química analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O terceiro artigo descreve a concentração de fenólicos do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e das frações obtidas a partir deste extrato, relacionando a atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa. No último capítulo encontra-se o pedido de patente do processo de obtenção, formulações de extratos padronizados, frações e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelhas sem ferrão e seu uso como agente leishmanicida.

Em anexo, encontram-se dois artigos publicados com estudos complementares sobre geoprópolis desenvolvidos durante o doutorado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Melipona fasciculata* Smith e outras abelhas sem ferrão

As abelhas são insetos polinizadores pertencentes à ordem Hymenoptera, reunidas na superfamília Apoidea, que é constituída por diversas famílias. As abelhas que possuem hábitos sociais mais avançados constituem a família Apidae que está subdividida em quatro subfamílias: Apinae, Bombinae, Euglossinae e Meliponinae (KERR, 1996).

A subfamília Meliponinae é constituída por abelhas conhecidas como meliponíneos ou abelhas sem ferrão, subdividida em duas tribos: Meliponini e Trigonini. A tribo Meliponini é exclusivamente neotropical e possui um único gênero, *Melipona*, com cerca de 55 espécies, das quais 36 são encontradas no Brasil, entre elas *Melipona fasciculata* Smith, anteriormente conhecida como *Melipona compressipes fasciculata* (KERR, 1996; VELTHUIS et al., 2003).

Os meliponíneos constituem um grupo ecologicamente importante de abelhas, pois atuam como polinizadores de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais. Entretanto, essas abelhas vêm sendo dizimadas, através da destruição da flora nativa, redução do substrato de nidificação, coleta predatória de ninhos e introdução de espécies exóticas (SILVEIRA et al., 2002; VELTHUIS et al., 2003; RÊGO et al., 2008). Desta forma, o interesse pela meliponicultura, que inclui o cultivo e a exploração racional dessas abelhas, pode contribuir para a preservação de espécies vegetais, além de agregar valor aos produtos meliponícolas, tais como mel, geoprópolis, própolis, cera e pólen (BROSI, 2009).

O cultivo de abelhas sem ferrão vem sendo desenvolvido há bastante tempo em diversas regiões do Brasil principalmente nas regiões Norte e Nordeste. No estado do Maranhão, a criação da espécie *M. fasciculata*, conhecida popularmente como “tiúba” ou “tiúba do Maranhão” (Figura 1A; 1B) é feita em caixas rústicas (caboclas) (Figura 1C) e se constitui em importante fonte de renda para várias famílias do interior do Estado. Essa abelha produz mel, geoprópolis, cera e acumula pólen (BEZERRA, 2004; MARTINS et al., 2011).

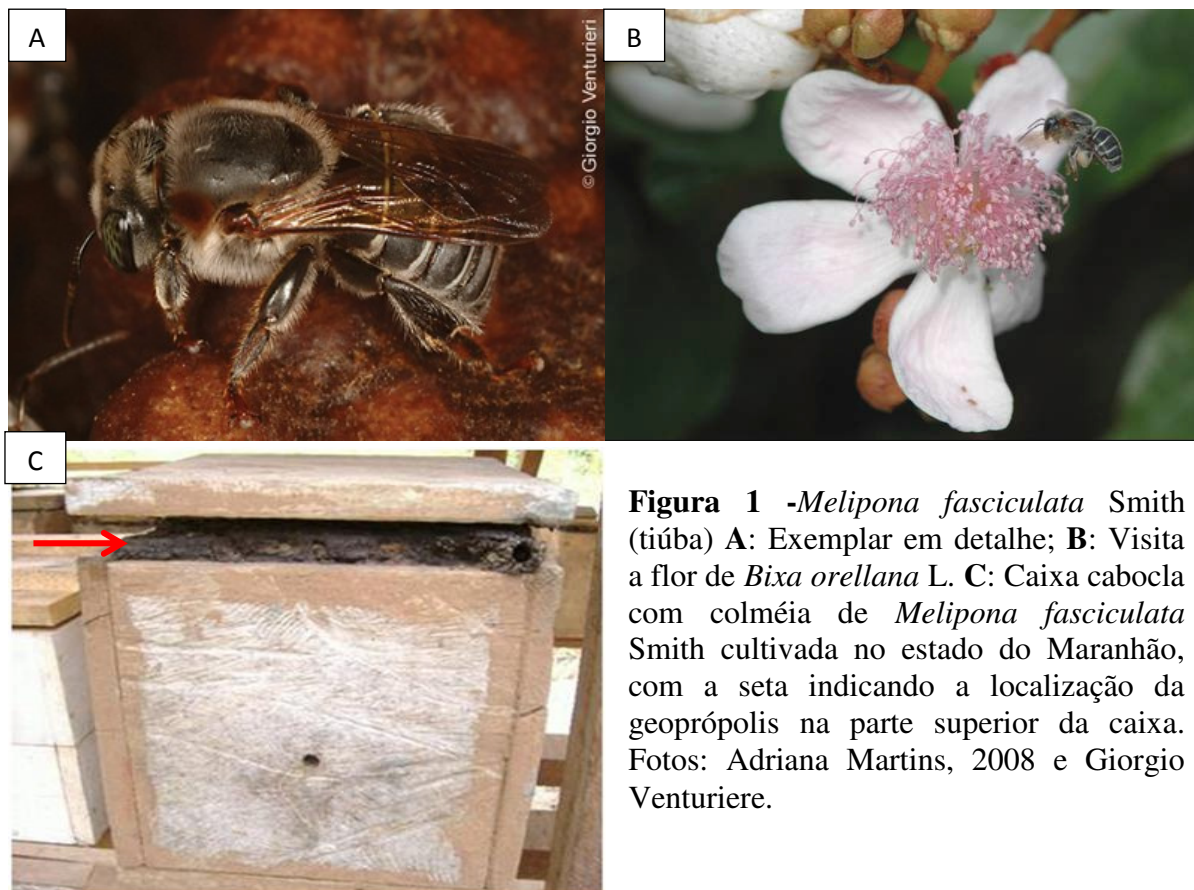


Figura 1 -*Melipona fasciculata* Smith (tiúba) **A:** Exemplar em detalhe; **B:** Visita a flor de *Bixa orellana* L. **C:** Caixa cabocla com colméia de *Melipona fasciculata* Smith cultivada no estado do Maranhão, com a seta indicando a localização da geoprópolis na parte superior da caixa. Fotos: Adriana Martins, 2008 e Giorgio Venturiere.

A geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, cera, secreções salivares e terra (Figura 2). Serve como material asséptico na colméia, para fechar pequenas frestas, na defesa contra invasores e vedar entradas de ventilação excessiva. Difere da própolis de *Apis mellifera* devido a vários fatores, entre eles a adição de terra (KERR, 1987; KERR, 1996; BARTH, 2006; DUTRA et al., 2008). É utilizada na construção da entrada das colônias e das paredes divisórias do ninho, ou para reforço das paredes naturais do ninho. Ressalta-se ainda que, o comportamento de coletar terra para produzir a geoprópolis é característico para as espécies do gênero *Melipona*. Outras espécies de meliponíneos, como as pertencentes à tribo Trigonini produzem somente própolis (NOGUEIRA-NETO, 1997; SOUZA et al., 2009;).



Figura 2 - Tipos de geoprópolis produzidas por *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) no estado do Maranhão.

A criação de abelhas sem ferrão no Maranhão reúne algumas características bastante favoráveis, por ser uma região de transição, entre o Norte-Nordeste e Centro-Oeste brasileiro, apresentando uma grande variedade de biomas, desde ambientes salinos com presença de manguezais, passando por campos inundáveis, cerrados, babaquais e floresta amazônica (Figura 3). Destaque para o cerrado que ocupa cerca de 40% do território maranhense, estendendo-se desde a região leste do Maranhão, incluindo os municípios de Barreirinhas, Urbano Santos, Chapadinha, Vargem Grande, até a região sul, nos municípios de Balsas, Riachão, Carolina, ocupando relevo aplainado e chapadas. Entre as principais espécies vegetais presentes no cerrado destacam-se espécies de grande valor ecológico e econômico, como barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart.), Gonçalves-Alves (*Astronium graveolens* Jacq.), mangabeira (*Hancornia speciosa* Muell. Arg.), piqui (*Caryocar brasiliensis* Camb.), favad'anta (*Dimorphandra gardneriana* L.), tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), candeia (*Platymenia reticulata* Benth.), sucupira (*Bowdichia virgilioides* HBK.), murici (*Byrsonima crassifolia* HBK), puça (*Mouriri pusa* Gardn.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), pau terra (*Qualea grandiflora* Mart.), entre outras (MUNIZ, 2004). Assim, a diversidade vegetal do Maranhão pode influenciar tanto a composição química quanto as propriedades biológicas dos produtos meliponícolas, em especial a geoprópolis.

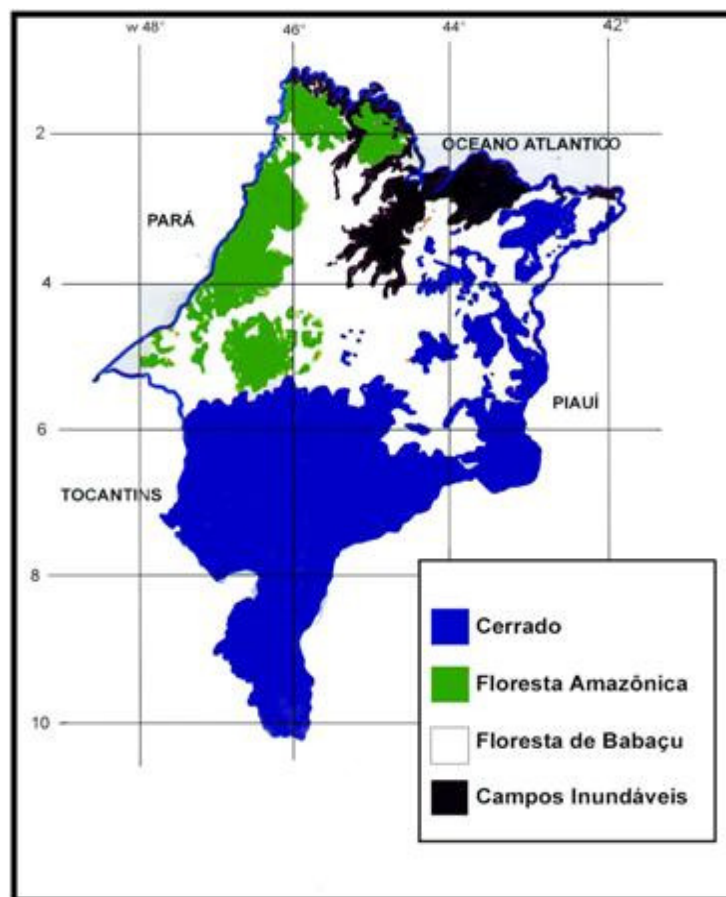


Figura 3 - Distribuição dos principais biomas do estado do Maranhão (MUNIZ, 2004).

2.2 Composição química da geoprópolis e própolis de Meliponíneos

Estudos de identificação da composição química e avaliação das atividades biológicas de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão são recentes, tendo sido iniciados nas últimas décadas. Ressalta-se ainda que, os termos própolis e geoprópolis são utilizados de forma semelhante para material proveniente das mesmas espécies de abelhas sem ferrão, o que dificulta o entendimento dos dados. Neste trabalho será utilizado o termo geoprópolis para material proveniente de espécies do gênero *Melipona*, enquanto própolis para as demais espécies de abelhas com ou sem ferrão.

Os primeiros relatos sobre a composição química de geoprópolis e própolis de meliponíneos são descritos por Greenaway et al. (1990) analisando geoprópolis de *Melipona* sp. e própolis de *Nannotrigona tristella* Cockrell, *Scaptotrigona* sp. e *Tetragonisca* sp., do Equador. Segundo os resultados há uma maior concentração de ácidos fenólicos, entre eles o ácido 3,5-dihidrobencóico, diferentemente da própolis de abelhas *Apis mellifera* da Europa e

da América do Norte, rica em flavonoides. Segundo os autores essas abelhas sem ferrão provavelmente coletavam materiais das flores de *Dalechampia* sp. e *Clusia* sp.

Mais tarde, Tomas-Barberan et al. (1993), analisando a própolis de *Friseomelitta varia*, *Scaptotrigona depilis*, *Paratrigona anduzeie* geoprópolis de *Melipona compressipes fasciculata*, *Melipona favosa*, oriundas da Venezuela, identificaram compostos fenólicos do tipo benzofenonas preniladas, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM).

Em 1998, Bankova et al. identificaram mais de cinquenta compostos, principalmente compostos fenólicos e triterpenos como as benzofenonas, ácidos fenólicos, pinobaksina e β -amirina, na geoprópolis de várias espécies de *Melipona* e na própolis de *Tetragona clavipes*.

Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos foram detectados como componentes da própolis de *Frieseomelitta silvestrii*, *Frieseomelitta silvestrii languida* e *Frieseomelitta varia*, produzidas nos estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais no Brasil (PATRICIO et al., 2002), e também na geoprópolis mexicana produzida por *Melipona becheii* (PINO et al., 2006).

A análise da própolis de *Tetragonisca angustula* de diferentes estados brasileiros apresentou compostos fenólicos, triterpenos, ácidos orgânicos, álcoois, ácidos graxos, açúcares e aminoácidos (VELIKOVA et al., 2000a; MIORIN et al., 2003; PEREIRA et al., 2003; SAWAYA et al., 2006). Segundo Sawaya et al. (2009), a composição química da própolis de *Scaptotrigona* sp. e *Apis mellifera* varia de acordo com a espécie de abelha, origem geográfica e época de coleta, diferente da própolis de *Tetragonisca angustula*, cuja composição química da própolis independe da região de coleta.

Estudos com própolis produzida por diferentes espécies de abelhas sem ferrão obtidas em várias localidades do Brasil foram analisados, visando à identificação da composição química e fonte vegetal usada pelas abelhas. Os dados obtidos mostraram que a maioria das abelhas coletou resinas de *Schinus terebenthifolius* R., espécie com ampla distribuição geográfica no território brasileiro. Nesse estudo, os autores enfatizaram que as abelhas estudadas ignoraram resinas de *Baccharis dracunculifolia* DC. que em contrapartida é muito visitada por *Apis mellifera* para a produção de própolis verde (SAWAYA et al., 2007; 2011).

Segundo Kujumgiev et al. (1999) e Pereira et al. (2003) tanto a geoprópolis de espécies de *Melipona* como a própolis de *Apis mellifera* apresentam como constituintes majoritários compostos aromáticos e terpenos. Estes resultados foram confirmados por Velikova et al. (2000a;b), ao avaliarem por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de

massas (CG/EM), amostras de geoprópolis e própolis brasileiras obtidas nos estados de Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná e Mato Grosso do Sul de 12 espécies de abelhas sem ferrão. Foram identificados compostos fenólicos e terpênicos, principalmente derivados do ácido gálico, ácido caurenóico e β -amirina, além de açúcares.

A geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* em diferentes localidades do estado do Maranhão, tem sido objeto de estudo nos últimos anos, por pesquisadores da Universidade Federal do Maranhão, com o objetivo de identificar suas características físicas, físico-químicas, químicas e ações biológicas. Os resultados mostram que a geoprópolis maranhense apresenta coloração variando entre preto e o marrom avermelhado, é inodora, com predominância do sabor amargo (DUTRA et al., 2008; NOGUEIRA, 2008; CUNHA et al., 2009).

Resultados prévios do nosso grupo quanto à composição química da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, também detectaram a presença de compostos fenólicos, triterpenos e saponinas, além de elevados teores de polifenóis e flavonoides totais, a partir da quantificação por métodos espectrométricos na região do UV-Vis (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009). Indicando predominância de compostos fenólicos e terpênicos, da mesma forma do que o descrito por Bankova; Popova (2007).

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* produzida em diferentes municípios da Baixada maranhense, apresentaram quando analisados por CG-EM, ácido gálico, ácido cinâmico e ácido protocatecuico, quercetina, ácido ursólico, ácido oleanólico, β -amirina, cicloursano, cicloartenol, ácido 3-oxo-urs-12-en-24-oico, lanosterol, acetato de lanosterol, além de ácidos orgânicos, ácidos graxos, iridóides, açúcares e álcoois (ABREU, 2011; BATISTA, 2011). Flavonoide derivado do canferol (3,7-di-O-metil-canferol) foi identificado por CLAE-EM na geoprópolis produzida no município de Palmeirândia, região da Baixada maranhense (SANTOS, 2010).

As análises dos dados indicam que na geoprópolis de *Melipona fasciculata*, há predominância de compostos fenólicos, flavonoides e terpenos, além de esteróides, cumarinas, iridóides, ácidos graxos, açúcares e álcoois conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão

Espécie de abelha	Material	Local de origem	Classe de compostos	Substâncias	Método analítico	Referência
<i>Frieseomelitta silvestrii</i>	Própolis	Brasil, GO	Monoterpenos	α -Felandreno, borneol, acetato de bornila, β -cariofileno	CG-EM	Patrício et al., 2002
			Sesquiterpenos	α -Ylangeno, α -copaeno, α -cubebeno, α -bergamoteno, α -humuleno, γ -muroleno, α -muruleno, γ -cadineno, δ -cadineno, espatulenol		
			Hidrocarboneto	Heptacosano, pentacosano		
<i>Frieseomelitta silvestrii languida</i>	Própolis	Brasil, MG	Monoterpenos	α -Felandreno, sabineno, α -terpineno, γ -terpineno, α -terpineol	CG-EM	Patrício et al., 2002
			Diterpeno	Manool, totarol, ferruginol, sugiol		
			Ácidos graxos	Ácido mirístico, ácido palmítico		
			Álcool	2-Undecanol		
			Cetonas	2-Pentadecanona, 2-tridecanona,		
			Hidrocarboneto	Heptacosano, nonacosano, hentriacontano, dotriacontano		
<i>Frieseomelitta varia</i>	Própolis	Brasil, SP	Ácido orgânico	Ácido acético	CG-EM	Patrício et al., 2002
			Monoterpenos	α -Pineno, canfeno, β -pineno, 3-careno, terpineno-4-ol		
			Sesquiterpenos	α -Ylangeno, α -cubebeno, α -copaeno, β -cubebeno, α -gurjuneno, γ -elemeno, simulareno, trans- β -farneseno, α -amorfeno, germacreno D, α -cadineno, cadina-1,4-dieno, elemol, espatulenol		
			Triterpenos	α -Amirina, β -amirina		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

<i>Frieseomelitta varia</i>	Própolis	Venezuela	Compostos Fenólicos	Benzofenonas preniladas	CLAE-EM	Tomás-Barberan et al., 1993
<i>Melipona beecheii</i>	Geoprópolis	México, YU	Monoterpenos	3,5,5-trimetil-2-ciclopenten-1-ona, (Z)-3-hexanol, santolina trieno, triciclono, α -tujeno, α -pineno, canfeno, tuja-2,4(10)-dieno, β -pineno, 6-metil-5-hepteno-2-ona, mirceno, α -felandreno, δ -3-careno, p-menta-1-eno, limoneno, 1,8-cineol, m-cimeno, γ -terpineno, cis-sabineno hidratado, trans-óxido de linalol, óxido de α -pineno, crisantenona, trans-2,8-p-metandieno-1-ol, α -camfolenal, trans-pinocarveol, cis-verbenol, trans-verbenol, pinocarvona, bomeol, cis-pinocanfona, terpineno-4-ol, p-cimeno-8-ol, α -terpineol, mirtenal, mirtenol, verbenona, trans-carveol, carvona, acetato de bornila	CG-EM	Pino et al., 2006
			Sesquiterpenos	δ -elemeno, α -cubebeno, ciclosativeno, α -copaeno, β -burboneno, β -cubebeno, β -elemeno, β -cariofileno, trans- α -bergamoteno, α -humoleno,		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

				alo-aromadendreno, γ -muroleno, biciclogermacreno, α -muroleno, germacreno A, β -bisaboleno, γ - cardineno, cubebol, δ -cardineno, β - vetiveno, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol, epóxido α - humuleno I, epóxido α -humuleno II, epi- α -cardinol, α -murolol, α - cardinol		
			Hidrocarboneto	Heptadecano		
<i>Melipona</i>	Geoprópolis	Brasil, PI	Monoterpenos	α -Pineno	CG-EM	Bankova et al.,
<i>compressipes</i>			Sesquiterpenos	Nerolidol, espatulenol, t-murolol		1998; 1999;
			Diterpenos	Ácido dehidroabiético, ácido diterpênico 1, Ácido diterpênico 2		Kujumgiev et al., 1999
			Triterpenos	Friedooleanona-3-ona		
			Ácidos Fenólicos	Ácido gálico, ácido p- hidroxibenzóico, ácido cinâmico, ácido cis-p-cumárico, ácido trans-p- cumárico, metil p-cumarato		
			Compostos	Hidroquinona, etilfenol		
			Fenólicos			
			Flavonoides	Pinobanksina, dihidroximetoxiflavonona		
			Ácidos graxos	Ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido capróico		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

			Álcool Fenólico	3-(2-OH-fenil)-propanolol,3-(4-OH-fenil)-propanolol, 1-feniletanol-2-feniletanol, álcool benzílico,		
			Aldeídos Fenólicos	Benzaldeído		
			Cetonas	OH-acetofenona		
			Cumarinas	Cumaronas		
			Hidrocarbonetos alifáticos	Hidrocarbonetos com cadeia de C8-C25		
			Hidrocarbonetos aromáticos	Alquibenzenos,alquilnaftalenos		
			Ácido inorgânico	Ácido fosfórico		
			Açúcar	Glicose		
<i>Melipona compressipes</i>	Geoprópolis	Venezuela	Compostos Fenólicos	Benzofenonas preniladas	CLAE-EM	Tomás-Barberan et al., 1993
<i>Melipona fasciculata</i>	Geoprópolis	Brasil, MA	Triterpenos, Fenólicos, Flavonoides Saponinas		Prospecção química	Abreu et al., 2006; Dutra et al., 2008; Cunha et al., 2009;
			Triterpenos	Ácido ursólico, ácido oleanólico, β -amirina, ácido 3-oxo-urs-12-en-24-oico, cicloursano,cicloartenol	CG-EM	Abreu, 2011; Batista, 2011
			Esteróides	Lanosterol, acetato de lanosterol		
			Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cinâmico		
			Flavonóide	Quercetina		
			Ácidos orgânicos	Ácido cítrico, ácido quínico, ácido		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

			Ácidos graxos	Ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido melísico, ácido octenóico, ácido cáprico, ácido pentacosenóico, ácido eicosanóico		
			Açúcares e álcoois	Glicose, arabinose, fucose, galactose, glucitol, xilose, ribose, eritritol, arabitol, sorbitol, manose, ácido glucônico		
			Iridóide	Aucubina		
			Flavonóide	3,7-di-O-metil-canferol (kumatakenina)	CLAE-EM	Santos, 2010
<i>Melipona sp</i>	Geoprópolis	Equador	Ácidos Fenólicos	3,5-dihidroxibenzóico	CG-EM	Greenway et al., 1990
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Geoprópolis	Brasil, PR	Monoterpenos	Terpineno-4-ol, p-menta-1,4-dien-8-ol, trans-carveol, carvona, p-cimeno, p-cimeno-8-ol, p-cimeno-7-ol, timol, sabineno, β -tujona, umbellulona, 2-careno, car-3-em-2-ona, α -pineno, β -pineno, trans-pinocarveol, verbenol, verbenona, aldeído α -canfoleno,	CG-EM	Bankova et al., 1998; 1999; Velikova et al., 2000a,b
			Sesquiterpenos	β -burboneno, aromadendreno, spatulenol, óxido de cariofileno,		
			Diterpenos	Ácido ent-kaur-16-em-19-oico, ácido ent-15 β -(3-metilbutanoiloxi-16-kauren-19-oico, ácido ent-15- β -hidroxi-16-kauren-19-oico, ácido		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

			Triterpenos	Álcool triterpênico do tipo amirinal, álcool triterpênico do tipo amirina 2, álcool triterpênico		
			Ácidos graxos	Ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido margarínico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido pentadecanóico, ácido isovaleriânico		
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido dihidroferúlico, ácido caféico		
			Fenólicos	Álcool p-cumárico, p-cresol		
			Aldeídos fenólicos	Benzaldeído, 4-isopropilideno benzaldeído, vanilina, coniferilaldeído		
			Açúcares	Pentose		
			Hidrocarbonetos alifáticos	C8-C25		
			Hidrocarbonetos aromáticos	Alquibenzenos, alquilnaftalenos		
			Cumarinas	Cumarona		
<i>Melipona favosa</i>	Geoprópolis	Venezuela	Fenólicos	Benzofenonas preniladas	CLAE-EM	Tomás-Barberan et al., 1993
<i>Melipona favora orlinge</i>	Geoprópolis	Brasil, MS	Diterpenos Triterpenos	Ácidos diterpênicos Álcool triterpênico	CG-EM	Velikova et al., 2000a

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

<i>Melipona scutellaris</i>	Geoprópolis	Brasil, PE	Ácidos fenólicos	Ácido benzóico, ácido cinâmico	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Açúcares			
<i>Melipona marginata</i>	Geoprópolis	Brasil, PE	Ácidos fenólicos	Ácido benzóico, ácido cinâmico	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Açúcares			
<i>Lestrimellata spp.</i>	Própolis	Brasil, PR	Diterpenos	Ácidos diterpênicos	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Triterpenos	Álcool triterpênico		
<i>Nanotrigona testicularis</i>	Própolis	Brasil, MG	Diterpenos	Ácidos diterpênicos	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Triterpenos	Álcool triterpênico		
<i>Plebeia spp.</i>	Própolis	Brasil, PR	Diterpenos	Ácidos diterpênicos	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Triterpenos	Álcool triterpênc		
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico, ácido cinâmico		
			Açúcares			
<i>Plebeia remota</i>	Própolis	Brasil, PR	Diterpenos	Ácidos diterpênicos	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Triterpenos	Álcool triterpênico		
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico, ácido cinâmico		
			Açúcares			
<i>Plebeia droryana</i>	Própolis	Brasil, MG	Triterpenos	Álcool triterpênico	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Ácidos Fenólicos	Ácido caféico		
			Açúcares			
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Própolis	Brasil, PR	Diterpenos	Ácidos diterpênicos	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Triterpenos	Álcool triterpênico		
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico		
			Açúcares			

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

<i>Scaptotrigona depilis</i>	Própolis	Venezuela	Compostos Fenólicos	Benzofenonas preniladas	CLAE-EM	Tomás-Barberan et al., 1993
<i>Tetragonisca angustula</i>	Própolis	Brasil, PR	Triterpenos	Álcool triterpênico	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico, ácido caféico		
			Açúcares			
<i>Tetragonisca angustula</i>	Própolis	Brasil, MG	Triterpenos	Álcool triterpênico	CG-EM	Velikova et al., 2000a
			Ácidos Fenólicos	Ácido benzóico, ácido caféico		
			Açúcares			
<i>Tetragonisca angustula</i>	Própolis	Brasil, MG,PR	Ácidos Fenólicos	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	CLAE	Miorin et al., 2003
<i>Tetragonisca angustula</i>	Própolis	Brasil, SP	Triterpenos	Obtusifoliol, β -amirina, lupenona, cicloartenol, lupeol, friedour-7-en-ona, friedour-7-en-ol, acetato de β -amirina, acetato de lupeol	CG-EM	Pereira et al., 2003
			Ácidos Fenólicos	Ácido p-hidroxibenzóico, ácido p-hidroxifenil-acético, ácido p-hidroxidi-hidrocinâmico, ácido o-cumárico, ácido dihidroxibenzóico, ácido p-cumárico, ácido caféico,		

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

			Ácido orgânico	Ácido láctico, ácido hidroxi-metil-butírico, ácido malônico, ácido hexanedióico, ácido succínico, ácido dihidroxipropanóico, ácido fumárico, ácido málico		
			Ácidos graxos	Ácido hexadecanóico, ácido linoléico, ácido octadecanóico, ácido tetracosanóico, ácido oléico, ácido hexacosanóico, ácido octacosanóico		
			Álcool	Glicerol, isômero de butanetriol		
			Açúcar	Frutose, eritrose, eritritol		
			Aminoácidos	5-oxoprolina, valina, leucina		
<i>Tetragonisca angustula</i>	Própolis	Brasil, MG, PR, BA, SC, SP	Triterpenos	Ácido masticadienóico, ácido masticadienólico	EM	Sawaya et al., 2006
			Ácidos Fenólicos	Ácido cinâmico	CLAE	Miorin et al., 2003
<i>Tetragona clavipes</i>	Própolis	Brasil, PR	Monoterpenos	Terpineno-4-ol, p-menta-1,4-dien-8-ol, trans-carveol, p-cimeno, p-cimeno-8-ol, umbelulona, car-3-em-2-ona, α -pineno, trans-pinocarveol, verbenol, verbenona, α -aldeído canfoleno	CG-EM	Bankova et al., 1998; 1999
			Sesquiterpenos	Nerolidol, β -cariofileno, γ -cadineno, δ -cadineno, espatulenol, α -muroleno, α -gurjuneno, α -copaeno, α -calakoreno, t-murolol, β -selineno,		Velikova et., 2000a

Tabela 1- Revisão de dados da literatura sobre a composição química da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

	γ-gurjuneno, aromadendreno, aloaromandreno, ledol, ledol diastereoisomero 1, ledol diastereoisomero 2
Diterpenos	Kaur-16-ano, ácido diterpênico 1, ácido diterpênico 2, ácido diterpênico 3, ácido diterpênico 4, ácido hidroxiditerpênico
Triterpenos	β-amirina, álcool triterpênico do tipo amirina 1, álcool triterpênico do tipo amirina 2, álcool triterpênico do tipo amirina 3, álcool triterpênico, friedooleanona-3-ona, cetona triterpênica
Ácidos Fenólicos	Ácido fenetil caféico, ácido cinâmico, ácido dihidrocinâmico, ácido benzil benzoato, ácido etil dihidrocinamato, ácido-p- hidroxibenzóico, ácido benzil caféico, ácido benzóico, ácido trans-p-cumárico, ácido prenil caféico
Álcool Fenólico	Álcool benzílico, 2-feniletanol
Fenólicos	p-vinilfenol
Hidrocarbonetos	Hidrocarbonetos alifáticos (C8-C25)

2.3 Atividades biológicas da geoprópolis e própolis de Meliponíneos

Os principais dados quanto às propriedades biológicas da própolis e geoprópolis obtida das abelhas sem ferrão estão sumarizados na Tabela 2, e mostram que a ação mais frequentemente avaliada foi a atividade antimicrobiana, seguida da atividade antioxidante. Também foram avaliadas as atividades antitumorais, imunomoduladora, antiinflamatória, analgésica, antinociceptiva, antiproliferativa, antiviral e citotóxica.

Um dos primeiros relatos da atividade da própolis de abelhas sem ferrão é relatado por Kujumgiev et al. (1999), que detectaram ação antibacteriana, antifúngica e antiviral em extratos obtidos da geoprópolis de *Melipona compressipes fasciculata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* oriunda dos estados do Piauí e Paraná, Brasil.

Velikova et al. (2000a) avaliaram amostras de geoprópolis e própolis brasileiras, oriundas dos estados de Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná e Mato Grosso do Sul, produzidas por: *Melipona quadrifasciata*, *Melipona faveolata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona marginata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Plebeia remota*, *Plebeia* sp., *Plebeia droryana*, *Tetragonisca angustula*, *Nanotrigona testaceicornis*, *Lestrimellata* sp e *Tetragona clavipes*. Detectaram nos extratos atividade antimicrobiana, para os microrganismos testados, associando a atividade às elevadas concentrações de ácidos diterpênicos presentes nas amostras. Neste estudo também foi avaliada a atividade citotóxica.

Ácidos diterpênicos como o ácido caurenóico e seus derivados foram isolados da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* do estado do Paraná, Brasil e relacionado a atividade antibacteriana detectada (VELIKOVA et al., 2000b).

A atividade antimicrobiana da própolis de *Nanotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula*, *Trigona spinipes*, *Scaptotrigona* sp, *Partamona* sp e geoprópolis de *Melipona scutellaris*, *Melipona* sp e *Melipona mandacaia*, oriundas dos estados de São Paulo e Pernambuco, Brasil foi descrita por Fernandes Jr et al. (2001). Mais tarde Miorin et al. (2003) e Pereira et al. (2003), ao avaliarem a ação antimicrobiana da própolis de *Tetragonisca angustula* produzida nos estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil, obtiveram resultados semelhantes, inclusive para *Staphylococcus aureus*, bactéria normalmente resistente a maioria dos antibióticos comerciais disponíveis no mercado.

Segundo Manrique; Santana, (2008) além da atividade antibacteriana a geoprópolis produzida por *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes* e as própolis de

Tetragonisca angustula e *Nannotrigona* sp., oriunda do Brasil e da Venezuela, apresentam também atividade antioxidante.

Os resultados descritos por Muli et al. (2008) mostram que a própolis de *Dactylurina schimidti*, do Quênia, apresentou atividade antibacteriana mais efetiva do que o mel produzido pela mesma espécie de abelha. Também apresentaram atividade antimicrobiana os extratos obtidos das amostras de própolis de *Trigona laeviceps* da Tailândia, inclusive com ação antitumoral e citotóxica (UMTHONG et al., 2009; 2011).

A própolis oriunda do Maranhão produzida por *Scaptotrigona* sp e a geoprópolis de *Melipona fasciculata* apresentam efeito antimicrobiano (MACIEL, 2005; FARNESI et al., 2007, 2009; DUAILIBE et al., 2007; LIBÉRIO, 2010; LIBÉRIO et al., 2011; SANTOS, 2010; ABREU, 2011; BATISTA, 2011), atividade antioxidante (SAWAYA et al., 2009; AZEVEDO, 2009; ABREU, 2011; SANTOS, 2010; BATISTA, 2011); citotóxica (CANTANHEDE et al., 2007, CANTANHEDE, 2008; SANTOS, 2008; SANTOS, 2010) e antiproliferativa para células tumorais (BORGES et al., 2011) e antitumoral (ARAÚJO et al., 2010). As amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* apresentam também atividade antinociceptiva, antiinflamatória, analgésica (GOMES et al., 2003; GOMES, 2005; COSTA et al., 2004; MACHADO, 2008; ARAÚJO, 2012), antitumoral e imunomoduladora (ASSUNÇÃO, 2011).

Os dados apresentados tanto na Tabela 1 quanto a composição química, bem como na Tabela 2 quanto à atividade biológica mostram grande variação, possivelmente decorrente da interação das abelhas com fontes vegetais distintas. Por isso o conhecimento sobre a origem geográfica e, principalmente as principais espécies vegetais utilizadas pelas abelhas, são importantes no controle de qualidade e na padronização das amostras de própolis e geoprópolis para uma efetiva aplicação terapêutica (GUZMÁN, 2005).

Na América do Sul, em especial no Brasil, a grande diversidade vegetal utilizadas pelas abelhas sem ferrão, para a retirada de resinas, para produção da própolis e geoprópolis, dificulta a correlação destes produtos com as fontes vegetais. Diferentemente das regiões da Europa, América do Norte e Oeste da Ásia onde a fonte dominante de própolis é o exsudado do botão de álamo, *Populus* sp (MARKHAM et al., 1996; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997), desta maneira uma menor variação da composição química é observada nas regiões temperadas, onde seus principais compostos bioativos são os compostos fenólicos, em especial os flavonoides (BURDOCK, 1998; BANKOVA, 2005).

Tabela 2 - Atividade biológica da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão

Espécie de abelha	Atividade Biológica	Microorganismo/Célula	Referência
<i>Dactylurina schimidti</i>	Antimicrobiana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i>	Muli et al., 2008
<i>Lestrimellata spp.</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000b
<i>Melipona compressipes fasciculata</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Influenza aviário</i> ; <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Kujumgiev et al., 1999; Bankova et al., 1999 ; Manrique; Santana, 2008; Dualibe et al., 2007; Libério, 2010; Libério et al., 2011; Maciel, 2005; Maciel, 2005; Abreu, 2011; Farnesi, 2007
	Antiinflamatória, Antinociceptiva e Analgésica		Gomes, 2005; Nogueira et al., 2004a; Costa et al., 2004; Machado, 2008; Araujo, 2012; Araujo et al., 2012
	Citotóxica	<i>Artemia salina</i>	Cantanhede et al., 2007; Cantanhede 2008; Santos 2008; Santos, 2010;
	Antitumoral	Tumor de Ehrlich	Assunção, 2008; Assunção, 2011
	Antioxidante		Manrique; Santana, 2008; Santos, 2010, Abreu, 2011; Batista, 2011
	Imunomoduladora		Assunção, 2011
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Influenza aviário</i>	Kujumgiev et al., 1999; Bankova et al., 1999; Velikova et al., 2000b

Tabela 2 - Atividade biológica da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

<i>Melipona quadrifasciata</i>	Antimicrobiana, citotóxica e antioxidante	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus luteus</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> ;	Velikova et al., 2000b; Farnesi, 2007; Farnesi et al., 2009; Manrique;Santana, 2008
<i>Melipona fabora orlinge</i>	Antimicrobiana e citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000b
<i>Melipona scutellaris</i> ; <i>Melipona marginata</i> ; <i>Melipona mandacaia</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Escherichia coli</i> ; <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000a; Fernandes et al., 2001
<i>Nannotrigona</i> sp.	Antimicrobiana e antioxidante	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Manrique;Santana, 2008
<i>Nanotrigona testaceicornis</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Fernandes et al., 2001
<i>Nanotrigona testacularis</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000a
<i>Partamona</i> spp.	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Escherichia coli</i>	Fernandes et al., 2001
<i>Plebeia</i> sp.; <i>Plebeia remota</i> ; <i>Plebeia droryana</i>	Antimicrobiana e citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000a
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Antimicrobiana e citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000a

Tabela 2 - Atividade biológica da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (continuação)

<i>Scaptotrigona sp.</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus</i> <i>sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	Farnesi , 2007; Farnesi et al., 2009, Fernandes et al., 2001
	Antioxidante Antitumoral	Células de glioblastoma, Tumor de Ehrlich	Sawaya et al., 2009 Araújo et al., 2010; Borges et al., 2011
<i>Tetragonisca angustula</i>	Antimicrobiana, citotóxica e antioxidante	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Enterococcus sp.</i> <i>Candida</i> <i>albicans</i>	Velikova et al., 2000a; Fernandes et al., 2001; Miorin et al., 2003; Manrique; Santana, 2008
<i>Tetragona clavipes</i>	Antimicrobiana e citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i>	Velikova et al., 2000a; Bankova et al., 1999
<i>Trigona spinipes</i>	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>enterococcus sp.</i>	Fernandes et al., 2001
<i>Trigona laeviceps</i>	Antimicrobiana, citotóxica e antitumoral	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> Carcinoma de colon, mama, hepático, pulmão e estômago	Umthong et al., 2009; 2011

2.4 Patentes de produtos com geoprópolis de *Melipona fasciculata*

As diferentes atividades biológicas apresentadas pela geoprópolis de *Melipona fasciculata*, permitiu o desenvolvimento de produtos tecnológicos que estão em processo de registro de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI. O primeiro registro de pedido de patente com geoprópolis refere-se, à obtenção de um produto para uso tópico, para ser utilizado no controle de bactérias cariogênicas requerido por Libério et al. (2009) (PI0905583-5). O segundo pedido de patente refere-se a obtenção de formulações farmacêuticas com ação cicatrizante, antiinflamatória e analgésica requerido por Costa et al. (2011) (PI1102701-0).

2.5 Leishmaniose

As leishmanioses constituem zoonoses de animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo roedores, marsupiais (gambá), edentados (tatus, tamanduá, preguiça), canídeos e mesmo primatas. O homem também pode representar um hospedeiro, mas parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza (NEVES, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Leishmania é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (DE SOUSA et al., 2008). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o tipo de desenvolvimento no intestino do inseto vetor. Cerca de 20 espécies de ambos os subgêneros apresentam capacidade de induzir um complexo de manifestações patológicas em humanos conhecidas coletivamente como leishmanioses (CUPOLILLO et al., 2000).

O ciclo da *Leishmania* inclui duas formas com características morfológicas e comportamento distintos: formas promastigotas e amastigotas.

A forma flagelada e extracelular, denominada promastigotas, tem entre 14 e 20 µm de comprimento e 1,5 a 4 µm de largura, vive no tubo digestório dos insetos vetores. Possui o corpo celular longo com núcleo situado na sua porção mediana e um flagelo longo e muito móvel, envolto pelo bolso flagelar que emerge para o exterior da célula. As formas promastigotas se reproduzem por divisão binária simples. Em geral, os parasitos se encontram agrupados, formando rosáceas, frequentemente aderidas à parede do intestino do vetor (SACKS; KAMHAMI, 2001).

As formas amastigotas são imóveis e intracelulares, são encontradas no interior de macrófagos de hospedeiros vertebrados apresentam aspecto arredondado e tem entre 2 e 6 µm de comprimento, entre 1,5 e 3 µm de largura. Apresentam corpo ovóide, achatado, com pouco citoplasma e núcleo redondo, relativamente grande e excêntrico. O cinetoplasto é bem visível e localizado perto do núcleo. O flagelo não é perdido, mas fica retido no segmento intracelular do parasito e por isso esta forma é praticamente imóvel (SACKS; KAMHAMI, 2001).

O ciclo biológico inicia-se quando fêmeas do inseto vetor, em geral espécies do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, sugam o sangue, durante o repasto, ingerindo macrófagos infectados com formas amastigotas. As formas amastigotas são liberadas no estômago do vetor onde se transformam em formas promastigotas. Em seguida, as formas promastigotas migram para o trato alimentar do inseto, onde vivem e se multiplicam. Quando o inseto vetor finalmente realiza novo repasto sangüíneo, inocula as formas promastigotasmeciclicas de *Leishmania* juntamente com a saliva. Uma vez no hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitados pelos macrófagos onde rapidamente se transformam nas formas amastigotas, multiplicando-se dentro dos macrófagos e lisando estas células. As amastigotas são então liberadas e fagocitadas por outros macrófagos, continuando o ciclo (AWASTHI et al., 2004).

Dependendo da espécie de *Leishmania*, do inseto vetor e do grau de imunidade do indivíduo estes protozoários podem permanecer na pele e causar lesões cutâneas únicas ou múltiplas o que caracteriza a leishmaniose tegumentar (LT) ou migrar para órgãos como fígado, baço, medula óssea, induzindo uma infecção sistêmica com sintomas como perda de peso, hepatoesplenomegalia, característicos da leishmaniose visceral ou calazar (LV) (ASHFORD, 2000).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países de regiões tropicais e sub-tropicais, incluindo o Brasil. Com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença e uma taxa de incidência anual de 2 milhões de novos casos (OMS, 2011).

As leishmanioses humanas constituem um complexo de enfermidades que acometem vísceras e pele, apresentando amplo espectro clínico e podem ser classificadas em visceral e tegumentar. No Brasil ocorre tanto a leishmaniose visceral (LV), como a leishmaniose tegumentar americana (LTA), principalmente nas regiões Norte e Nordeste e recentemente na região Centro-Oeste, devido principalmente às características climáticas e sócio-demográficas (VALE; FURTADO, 2005).

As infecções causadas por *Leishmanias* têm sido associadas com manifestações clínicas diferentes, incluindo a forma cutânea, muco-cutânea e cutânea difusa, todas de difícil tratamento, devido à pouca eficácia dos tratamentos convencionais e à ausência de vacinas (BASANO; CAMARGO, 2004).

O estado do Maranhão apresenta grande incidência de leishmanioses em 88% de seus municípios, sendo a região da pré-amazônica maranhense, a que apresenta os mais altos coeficientes de detecção da LTA (REBÊLO et al., 2001a; 2001b; BRASIL, 2007).

A leishmaniose tegumentar está associada a múltiplos agentes causais, sendo que *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, e mais recentemente *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lindenberg* e *Leishmania shawi* são as principais espécies que causam a doença no Brasil, enquanto a *Leishmania chagasi* é responsável pela leishmaniose visceral (VALE; FURTADO, 2005).

Leishmania amazonensis circula entre pequenos roedores da floresta e alguns marsupiais, mas é pouco encontrada entre os homens, visto que o seu principal vetor é pouco antropofílico. A doença pode ser detectada tanto nas cidades, como no meio rural, onde ocorre a maior incidência (REY, 2001). Essa espécie causa principalmente lesões cutâneas (WEIGLE; SARAVIA, 1996) e está associada à leishmaniose cutânea e à leishmaniose difusa na América do Sul (GRIMALDI; TESH, 1993).

O curso clínico da leishmaniose cutânea é complexo devido à variabilidade do período de incubação, da infecção subclínica, cura espontânea, propagação metastática, reativação, reinfecções e lesões crônicas (WEIGLE; SARAVIA, 1996). Talvez por isso o seu tratamento seja problemático, pois não há vacinas para a doença e os quimioterápicos usados para o tratamento como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina apresentam eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, toxicidade elevada, inconvenientes na administração, além de ocasionarem resistência ao parasito (CROFT; COOMBS, 2003; RATH et al., 2003; OUELLETTE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

2.6 Tratamentos das leishmanioses

O tratamento para a leishmaniose é baseado no antimonial pentavalente, que é comercializado sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (CROFT; COOMBS, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003). A forma pentavalente precisa ser convertida para a forma trivalente, para ser biologicamente ativa. O mecanismo de ação destes compostos é a inibição das enzimas da via glicolítica e pela β -oxidação dos ácidos graxos nas formas amastigotas. Considerando que o antimônio é um metal

pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como do hospedeiro (BERGMAN et al., 1985). A desregulação do metabolismo do tiol, um componente envolvido com a resistência a drogas e estresse oxidativo em *Leishmania*, também parece ser uma das formas de atuação destas drogas (FREZARD et al., 2001; SHAKED-MISHAN et al., 2001; WYLLIE et al., 2004).

A anfotericina B, a pentamidina, o miltefosina e a paramomicina têm sido as drogas alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (RATH et al., 2003; CROFT; COOMBS, 2003).

A anfotericina B (Fungizone®) é um antibiótico que possui atividade antifúngica e leishmanicida. A anfotericina B liga-se ao ergosterol, principal esteróide nas membranas plasmáticas de *Leishmania* e dos fungos, causando alteração da permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (URBINA, 1997; OLLIARO, BRYCESON, 1993). Apesar de sua elevada toxicidade e da administração ser parenteral, esse agente terapêutico é usado para leishmaníase visceral e para tratar infecções sistêmicas ocasionadas por fungos (AMATO et al., 2000). Os efeitos colaterais da anfotericina B mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Estudos clínicos com a forma lipossomada de anfotericina B (AmBisome®), tem apresentado menor toxicidade do que a forma injetável convencional, com redução considerável dos efeitos nefrotóxicos (RATH et al., 2003).

Outros antifúngicos (cetoconazol, itraconazol e fluconazol) têm sido testados no tratamento de leishmaniose cutânea e visceral (CROFT; COOMBS, 2003), mas a eficácia é sempre questionável.

As pentamidinas são diaminas aromáticas, que apresentam importante atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (BERGMAN, 1998). Para o mecanismo de ação da pentamidina a teoria mais aceita tem sido a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al., 2005). Esta droga tem apresentado bons resultados em leishmaniose cutânea causadas por espécies que apresentam resistência ao tratamento com antimoniais como *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (COSTA et al., 2009). Entretanto, esta droga pode promover efeitos diabetogênicos durante o seu uso (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídico, também chamado aminosidina, foi testado no tratamento de leishmaníase visceral apresentando baixa toxicidade. Entretanto, tem seu uso limitado por apresentar nefrotoxicidade e ototoxicidade (MURRAY, 2001).

O alupuriol é um análogo da purina, foi utilizado em triagens clínicas para leishmaniose cutânea e visceral, porém os índices de cura não foram muito animadores (CROFT; COOMBS, 2003).

A miltefosina, um antineoplásico alquilfosfolipídico, usado no tratamento do câncer, tem se mostrado eficaz contra leishmaníase visceral. Com a possibilidade de administração via oral, este fármaco já vem sendo utilizado na Índia, tendo-se relatado excelentes resultados contra *Leishmania donovani*. A principal limitação da miltefosina conhecida é a atividade teratogênica que impede o seu uso durante a gravidez (CROFT; COOMBS, 2003; SUNDAR et al., 2002). A resistência aos fármacos (antimoniais pentavalentes, como Glucantime) utilizados no tratamento das leishmanioses, além dos efeitos colaterais destes compostos faz com que alternativas efetivas e seguras ao tratamento sejam estudadas.

2.7 Produtos naturais leishmanicidas

Inúmeros compostos naturais isolados de plantas tiveram e continuam tendo um grande impacto na sobrevida e no tratamento de várias enfermidades humanas. Além disso, as plantas são importantes fontes de substâncias, muitas das quais se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos. O uso de produtos naturais derivados de plantas é importante alternativa ao tratamento das leishmanioses.

Os principais metabolitos secundários encontrados nos vegetais com atividade leishmanicida incluem os ácidos fenólicos (ácido gálico e elágico), taninos hidrolisáveis (telimagrandina II), flavonoides (quercetina), alcalóides (berberina), triterpenos (ácido oleanólico) Figura 4, além de quinonas, auronas, saponinas, chalconas, lignanas, iridóides, benzopiranos e lactonas sesquiterpênicas (ROCHA et al., 2005; TASDEMIR et al., 2006; SEN; CHATTERJEE, 2011).

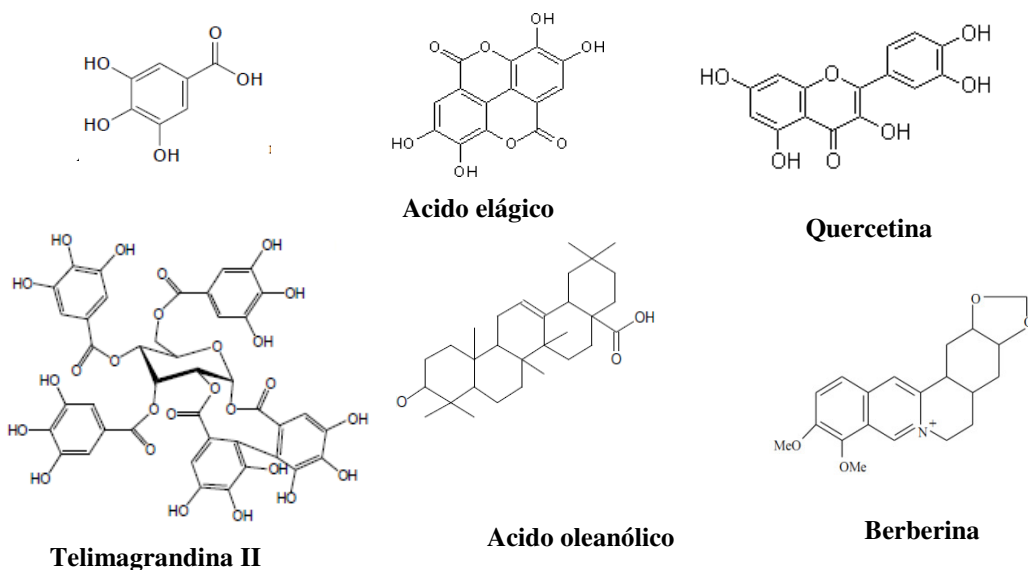


Figura 4 – Metabólitos secundários com atividade leishmanicida

Produtos de abelhas, como própolis e geoprópolis, as quais são derivadas de fontes vegetais, importantes fontes de compostos bioativos, e podem apresentar alternativas para o tratamento das leishmanioses.

Nos últimos anos as pesquisas com aprópolis de abelha com ferrão têm demonstrado diversas atividades biológicas para este produto de abelha, especialmente antimicrobiana e antiparasitária, além de composição química complexa.

Segundo Machado et al. (2007) o extrato hidrolacoólico da própolis de *Apis mellifera* no Estado de Minas Gerais, Brasil, apresentou atividade superior ao Glucantime em culturas de formas promastigotas de *Leishmania major* (48 µg/mL), *L. chagasi* (50 µg/mL), *L. braziliensis* (49 µg/mL) e *L. amazonensis* (229 µg/mL). Os autores deste estudo relacionam a atividade leishmanicida encontrada à presença de flavonoides e amirinas.

Estudos utilizando quatro extratos etanólicos de própolis tipificada oriundas dos Estado do Paraná, Minas Gerais e Alagoas foram capazes de reduzir a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*. A própolis vermelha produzida em Alagoas, que contém alta concentração de benzofenonas preniladas, embora tenha sido o mais efetvo em controlar a infecção nos macrófagos, não apresentou efeito direto sobre o parasito, sugerindo que o mecanismo de ação do extrato estava relacionado a ação imunológica sobre ativação dos macrófagos (AYRES et al., 2007).

A própolis verde de *Apis mellifera*, produzida no Estado de Minas Gerais, apresentou atividade anti-*Leishmaniain vitro* para formas promastigotas de *Leishmaniabrasiliensis*, com 79,3% de morte. Entretanto foi inativa para as formas amastigotas do parasita. Neste caso a

atividade encontrada foi relacionada à presença de ácidos fenólicos e flavonoides (POTIN et al., 2008). Além dos ácidos fenólicos e flavonoides, outros compostos encontrados na própolis já foram relacionados à atividade leishmanicida tais como: ácidos aromáticos e seus ésteres, terpenos, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e seus ésteres, alcoóis e cetonas (DURAN et al., 2008, 2011; OZBILGE et al., 2010).

Entretanto não há dados referentes à atividade leishmanicida de produtos de meliponíneos, pois os poucos trabalhos relatando a atividade leishmanicida de própolis se referem aos produtos da abelha com ferrão *Apis mellifera*.

Considerando a toxicidade, resistência e eficácia variável do arsenal terapêutico atual, a endemicidade das leishmanioses no estado do Maranhão, torna-se essencial para a descoberta de novas substâncias naturais com atividade anti-*Leishmania*, o estudo de Produtos Naturais, entre eles a geopropolis, produto de abelha com importante atividade antimicrobiana. Assim, propomos estudos com a geoprópolis maranhense de *Melipona fasciculata* com o objetivo de avaliar sua atividade leishmanicida e identificar sua composição química, contribuindo com dados científicos para a elaboração de produtos a base da geoprópolis com ação leishmanicida.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade leishmanicida de extratos e obtenção de um produto leishmanicida a base da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

3.2 Específicos

- Avaliar a ação leishmanicida do extrato e frações utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato da geoprópolis e de suas frações.
- Caracterizar a composição química do extrato e frações leishmanicida da geoprópolis.
- Obter um produto leishmanicida.

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I

Antileishmanial activity from Brazilian geopropolis

Richard Pereira Dutra, Maria Nilce Sousa Ribeiro, Rosane Nassar Meireles Guerra

Artigo submetido ao periódico Parasitology Research

(SSN: 0932-0113, print version)

(ISSN: 1432-1955, electronic version)

Fator de impacto: 1.812 Qualis Biotecnologia B2



Antileishmanial activity from Brazilian geopropolis

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	PR-2012-0688
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	09-Jul-2012
Complete List of Authors:	Dutra, Richard; Universidade Federal do Maranhão, Farmacognosia Bezerra, Jeamile; Universidade Federal do Maranhão, Imunofisiologia Silva, Mayara Cristina; Universidade Federal do Maranhão, Imunofisiologia Batista, Marisa Cristina; Universidade Federal do Maranhão, Farmacognosia Abreu, Bruno Vinicius; Universidade Federal do Maranhão, Farmacognosia Sousa, Darlaine; Instituto de Botânica de São Paulo, Fitoquímica Nascimento, Flávia Raquel; Universidade Federal do Maranhão, Imunofisiologia Torres, Luce Maria; Instituto de Botânica de São Paulo, Fitoquímica Ribeiro, Maria Nilce; Universidade Federal do Maranhão, Farmacognosia Guerra, Rosane Nassar; Universidade Federal do Maranhão, Imunofisiologia
Keywords:	geopropolis, <i>Melipona fasciculata</i> , leishmanicidal activity, polyphenols, gallic acid, ellagic acid

SCHOLARONE™
Manuscripts

ABSTRACT

Geopropolis is produced by some stingless bee species such as *Melipona fasciculata* Smith and consists of a mixture of plant resins, salivary secretions of the bee, wax, and soil. This bee product has a complex chemical composition and various pharmacological applications. This study evaluated the *in vitro* leishmanicidal activity of extracts of *M. fasciculata* geopropolis obtained in the State of Maranhão, Brazil, comparing their chemical composition and effectiveness as antileishmanial product. The extracts were prepared by maceration in 70% ethanol in water, obtaining the hydroalcoholic extracts of geopropolis, identified as: HEG1, HEG2 and HEG3. Chemical analysis was performed by combined gas chromatography-mass spectrometry. For the evaluation of antileishmanial activity, promastigote forms of *Leishmania amazonensis* were incubated in RPMI culture medium for 24 h with different concentrations of the geopropolis extracts. The extracts were effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Leishmania* promastigotes at the two highest concentrations (250 and 500 µg/mL), with HEG1 being more effective ($IC_{50} = 47 \mu\text{g/mL}$) than HEG2 ($IC_{50} = 149.5 \mu\text{g/mL}$) and HEG3 ($IC_{50} = 229 \mu\text{g/mL}$). High concentrations of gallic acid and ellagic acid, as well as fatty acids, sugars, and alcohols, were detected in the bioactive extracts. Since these compounds also presented antileishmanial activity (gallic acid: $IC_{50} = 14.48 \mu\text{g/mL}$; ellagic acid: $IC_{50} = 151.7 \mu\text{g/mL}$), we conclude that the antileishmanial activity of the active extracts of *M. fasciculata* geopropolis is related to the high content of gallic acid, especially in HEG1.

Keywords geopropolis, *Melipona fasciculata*, leishmanicidal activity, polyphenols, gallic acid, ellagic acid

Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease that occurs in countries with tropical and temperate climates. Approximately 2 million new cases are reported every year. Leishmaniasis is transmitted to humans through the bite of sand flies infected with protozoa of the genus *Leishmania* (WHO 2012).

The severity of disease varies ranging from cutaneous or mucosal to visceral or diffuse cutaneous infection. The former is generally caused by *L. amazonensis*, a species transmitted mainly in the Amazon region, which is associated with localized cutaneous lesions. In Brazil occur both American visceral leishmaniasis (AVL) and American tegumentary leishmaniasis (ATL), endemic disease in Northern and Northeastern Brazil, mainly in the states of Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (Vale and Furtado 2005).

Drugs used for the treatment of leishmaniasis include pentavalent antimonials, amphotericin B, and pentamidine. All of these drugs present variable efficacy against different *Leishmania* species and elevated toxicity and can induce resistance of the parasite (Croft and Coombs 2003; Silva-López 2010). Therefore, there is an urgent need for new drugs that can be used both for the prophylaxis and for the treatment of leishmaniasis. In this respect, bee products are promising candidates since they are important sources of bioactive compounds (Bankova and Popova 2007).

In the State of Maranhão, *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as “tiúba” or “tiúba do Maranhão”, is the most widely cultivated stingless bee species because of its high productivity of geopropolis and honey. This species is therefore one of the main sources of income for many families in the state (Dutra et al. 2008). The geopropolis produced by these bees is used by the population for the treatment of inflammation, weakness, hemorrhoids, gastritis and cough, and also as a healing agent (Santos and Antonini 2008).

Geopropolis is produced from plant resins that are mixed with pollen, wax, salivary secretions, and soil. In the beehive, this product is used to fill small cracks, to seal entry holes, and as an antimicrobial agent (Barth 2006). According to Bankova and Popova (2007), phenolic acids, triterpenes, fatty acids, and sugars are the predominant constituents of geopropolis and propolis from Meliponinae. The following activities have been attributed to this product: antibacterial (Velikova et al. 2000; Duailibe et al. 2007; Manrique et al. 2008; Libério et al. 2011), antifungal (Muli et al. 2008), antioxidant (Sawaya et al. 2009, 2011), antiproliferative, cytotoxic (Umthong et al. 2009), and antitumor (Araujo et al. 2010).

There are no reports on the leishmanicidal activity of Meliponinae products, with the few studies investigating the leishmanicidal activity of propolis using products from *Apis mellifera* bees (Ayres et al. 2007; Machado et al. 2007; Duran et al. 2008; Pontin et al. 2008; Duran et al. 2011). Therefore, the present study investigated the leishmanicidal activity and chemical composition of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in order to contribute to the bioprospecting of products with activity against *Leishmania* infection.

Material and Methods

Collection of geopropolis

Three samples were collected in the savannah region of the Municipality of Fernando Falcão (6°7'30"S 44°52'30"W) (samples 1, 2 and 3) in the State of Maranhão, Brazil, in November of 2008. Geopropolis was removed from the hives with a spatula, stored in sterile containers, and transported to the laboratory for preparation of the extracts and chemical and biological analysis.

Preparation of the geopropolis extracts

A portion (500 g) of each geopropolis sample was ground with a knife mill and macerated in 70% (v/v) ethanol in water (1:2, w/v) for 48 h. The solutions were filtered through filter paper and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Abreu et al. 2006; Dutra et al. 2008; Cunha et al. 2009). The hydroalcoholic extracts of geopropolis obtained were identified as follows: HEG1, HEG2 and HEG3.

Evaluation of leishmanicidal activity

Using 96-well flat-bottom plates (Costar), the extracts were resuspended in PBS and diluted in complete RPMI 1640 medium to final concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, and 15.62 µg/mL. Aliquots of 10 µL of the suspension containing 5×10^6 /mL promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) were added to the wells. Amphotericin B, the reference drug for the treatment of leishmaniasis, was used as positive control at the same concentrations as the extracts. Promastigote forms cultured in RPMI 1640 medium without the extracts were used as negative control. Leishmanicidal activity was evaluated after 24 h by counting the total number of live promastigotes, assessed by flagellar motility, in a Neubauer chamber under a Nikon light microscope. The results are expressed as the minimum concentration (IC₅₀) able to inhibit parasite growth and represent the mean of triplicate samples tested in three identical assays (Bezerra et al. 2006).

Analysis of the extracts by GC/MS

The HEG1, HEG2 and HEG3 extracts were derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (BSTFA/TMCS) according to Roessner et al. (2001), with modifications. A gas chromatograph (GC) (Agilent 6890) coupled to a mass spectrometer (MS) (Agilent 5973N MSD), equipped with a 30-m HP5 capillary column (0.25 mm; Agilent) and operating in the electron impact ionization mode, was used for analysis. The temperatures of the injector and detector were maintained at 230°C and 250°C, respectively. An ion source at 200°C was used. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. Analysis consisted of 5 min of isothermal heating (70°C), a temperature gradient of 5°C/min at 310°C, and a last minute of heating at 310°C. The system was then calibrated for 6 min at 70°C before automatic injection of the next sample. The mass spectra were recorded at a speed of 2 scans/second over a mass range of 50-650 m/z . The total ion chromatograms and mass spectra were analyzed using the ChemStation program (Agilent) and NIST 2.0 database.

Statistical analysis

The results are reported as the mean of three separate experiments, each in triplicate. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were obtained from linear regression analysis using dose-response curves in GraphPad Prism 5.0 program for Windows.

RESULTS

All three samples presented antileishmanial activity, with the inhibitory concentration (IC_{50}) ranging from 47.0 $\mu\text{g/mL}$ for HEG1 to 229.0 $\mu\text{g/mL}$ for HEG3. An intermediate value (149.5 $\mu\text{g/mL}$) was observed for HEG2 (Table 1). HEG1 presented the highest leishmanicidal activity since the extract was able to inhibit the growth of 100% of protozoa at concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$, whereas the other two extracts (HEG 2 and HEG 3) only exerted an inhibitory effect (100%) at the higher concentration.

GC-MS analysis of the extracts showed a similar chromatographic profile for the active samples from Fernando Falcão. The chromatograms revealed a predominance of phenolic acids, mainly gallic and ellagic acid, in the active extracts. Fatty acids, organic acids, sugars, and alcohols were also detected (Table 2).

The highest concentration of gallic acid and glucose, as well as the presence of ellagic acid, was detected in HEG1. On the basis of these results, we evaluated the leishmanicidal

activity of gallic and ellagic acid under the same conditions as those used for the analysis of the hydroalcoholic geopropolis extracts. Both phenolic compounds exerted antileishmanial activity, with gallic acid presenting higher IC₅₀ values than ellagic acid (14.48 versus 151.7 µg/mL).

3,4-Dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) and 1,2-dihydroxyanthraquinone (alizarin) were other compounds detected in the leishmanicidal extracts.

DISCUSSION

The chemical analyses showed a highest concentration of gallic acid and glucose, as well as the presence of ellagic acid, in Fernando Falcão samples, especially on HEG1, the most effective.

The observation of high concentrations of gallic acid and glucose in the leishmanicidal extracts indicates the presence of hydrolyzable tannins. The presence of hydrolyzable tannins on the leishmanicidal extracts was proved in the phytochemical approach, using ferric chloride.

The latter are polyphenol derivatives of gallic acid (gallotannins) or ellagic acid (ellagitannins) bound to a sugar molecule, generally glucose (Okuda 2005). Simple phenols and hydrolyzable tannins have been associated with leishmanicidal activity against a variety of *Leishmania* species (Kolodziej et al. 2001; Kolodziej and Kiderlen 2005).

Tasdemir et al. (2006) tested different substances belonging to the classes of phenolic acids, flavonoids and catechins *in vitro* and *in vivo* against *Leishmania donovani* and obtained a minimum inhibitory concentration (IC₅₀) of less than 30 µg/mL for gallic acid. In *in vitro* assays using different *Leishmania* species, including *L. amazonensis*, Shuaibu et al. (2008) reported a minimum inhibitory concentration higher than 150 µg/mL for ellagic acid.

The presence of gallic acid in *M. fasciculata* geopropolis is expected since this compound has been identified as one of the main compounds in geopropolis from *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona marginata*, and *Plebeia remota* (Bankova et al. 1998; Velikova et al. 2000). We found no studies in the literature reporting the presence of ellagic acid or 1,2-hydroxyanthraquinone in propolis and geopropolis samples. This is also the first study reporting the presence of protocatechuic acid in *M. fasciculata* geopropolis, although this compound has been identified in propolis from *Tetragonisca angustula* collected in the State of São Paulo, Brazil.

The therapeutic activities of geopropolis can be attributed to different substance classes, such as lignoids, carbohydrates, monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, flavonoids, and phenolic acids. The last two classes are the main compounds responsible for the biological properties of propolis (Bankova et al. 2000). The qualitative and quantitative variations in phenolic compounds seen between different bee products are mainly influenced by the plant species visited by the bees, type of bee species, geographic region, and climatic factors (Gomes-Caravaca et al. 2006). This may explain the differences observed here between leishmanicidal activity in the extracts obtained from three different locations: Fernando Falcão, a region characterized by atypical savannah vegetation.

In conclusion, the leishmanicidal activity of hydroalcoholic extracts of *M. fasciculata* geopropolis produced in the Maranhão savannah seems to be related to the presence of gallic and ellagic acid derivatives, possibly hydrolyzable tannins. In addition, the results showed that the geopropolis extracts exerted significant leishmanicidal activity against *Leishmania* promastigotes when compared to other studies. This is the first report demonstrating the leishmanicidal activity of geopropolis produced by the stingless bee, *Melipona fasciculata* and it suggests future studies regarding isolated compounds of this extract and evaluation of its effect on *in vitro* e *in vivo* infection model.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Banco do Nordeste for financial support and the Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for the doctoral fellowship granted. We are also indebted to the beekeepers for providing the geopropolis samples, and to Dra. Aldina Barral, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia, Brazil, for kindly providing the *Leishmania amazonensis*.

REFERENCES

Abreu BVB, Batista MCA, Azevedo CC et al (2006) Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no cerrado maranhense. Revista de Ciências da Saúde 8:18-24

- Araujo MJAM, Dutra RP, Costa GC et al (2010) Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff.postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Erlich em camundongos. Rev Bras Farmacogn 20:580-587
- Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S (2007) Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 102:215–220
- Bankova V, Christov R, Marcucci MC, Popov S (1998) Constituents of Brazilian geopropolis. Z Naturforsch 53:402-406
- Bankova V, Popova M (2007) Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. Pharmacognosy Reviews 1:88-92
- Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31:3-15
- Barth OM (2006) Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. Apiacta 41:71-85
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes, TC et al (2006) Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn 16:631-637
- Croft SL, Coombs GH (2003) Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol 19:502–508
- Cunha MS, Dutra RP, Batista MCA et al (2009) Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba). Cadernos de Pesquisa 16:31-38
- Duailibe SAC, Gonçalves AG, Ahid FJM (2007) Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. J Appl Oral Sci 15:420-423

- Duran G, Duran N, Culha G, Ozcan B, Oztas H, Ozer B (2008) *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitol Res* 102:1217–1225
- Duran N, Muztafa M, Culha G, Duran G, Ozer B (2011) GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res* 108: 95-105
- Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNS (2008) Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18:557-562
- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmacol Biom Anal* 41:1220-1234
- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF et al (2001) Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- α release in macrophages *in vitro*. *Planta Med* 67:825-832
- Kolodziej, H, Kinderlen AF (2005) Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 66, 2056-2071.
- Liberio AS, Pereira, ALA, Dutra RP.; Aramys SR, Araújo MJAM, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Guerra RNM, Monteiro-Neto, V (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med*.11:108-208
- Machado GM, Leon LL, De Castro SL (2007) Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:73-77

- Manrique AJ, Santana WC (2008) Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop* 26:157-166
- Muli EM, Maingi JM, Macharia J (2008) Antimicrobial properties of propolis and honey from the Kenyan stingless bee, *Dactylurina schimidti*. *Apiacta* 43:49-61
- Okuda T (2005) Systematic and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66:2012–2031
- Pontin K, Da Silva Filho AA, Santos FF et al (2008) *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 103:487–492
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell* 13:11–29
- Santos GM, Antonini Y (2008) The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 4:1-9
- Sawaya ACHF, Cunha IBS, Marcucci MC (2011) Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Central J* 5:27. doi:10.1186/1752-153X-5-27
- Sawaya ACHF, Calado JCP, Santos LC et al (2009) Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. *J ApiProduct ApiMedical Sci* 1:37- 42
- Silva-López RE (2010) Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quim. Nova* 33:1541-1548

- Shuaibu MNK, Pandey PA, Wuyep T, Yanagi, K, Hirayama et al. (2008) Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of leishmania *in vitro*. Parasitol Res 108: 1333-1338
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P 2006 Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. Antimicrob Agents Chemother 50: 1352-1364
- Umthong S, Puthong S, Canchao C (2009) *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. Am J Chin Med 37:855-865
- Vale ECS, Furtado T (2005) Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. An Bras Dermatol 80:421-428
- Velikova M, Bankova V, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A (2000) Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. Z Naturforsch 55:785-789
- WHO (2012) <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Accessed February 20, 2012

Table 1 Leishmanicidal activity of the hydroalcoholic geopropolis extracts (HEG), gallic acid, and ellagic acids against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*

Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ^a
	<i>Leishmania amazonensis</i>
HEG1	47.0
HEG2	149.5
HEG3	229.0
Gallic acid	14.48
Ellagic acid	151.7
Amphotericin B	0.16

^a Mean of the results of three separate experiments, each in triplicate.

Table 2 Chemical composition of the derivatized hydroalcoholic extracts of *Melipona fasciculata* geopropolis analyzed by combined gas chromatography-mass spectrometry

RT (min) ^a	Compound ^b	HEG1	HEG2	HEG3
		%TIC ^c		
15.25	Glycerol	0.22	0.25	0.27
21.60	Erythritol	-	1.33	0.28
24.82	D-Fructose	0.32	1.0	1.34
25.31	D-Xylose	1.17	-	-
28.17	Protocatechuic acid	0.10	0.13	0.13
26.53	D-Ribitol	-	1.14	-
26.55	Xylitol	-	1.48	-
29.17	Arabinofuranose	-	0.13	1.24
29.43	Quinic acid	1.68	0.84	1.85
30.25	D-Glucitol	0.92	-	0.14
31.06	D-Manopirranose	12.80	-	-
31.11	Gallic acid	22.3	9.05	18.9
31.90	D-Glucopyranose	24.3	1.29	14.93
32.34	Hexadecanoic acid	0.52	0.42	1.05
33.75	<i>myo</i> -Inositol	0.10	0.15	0.41
35.84	Octadecanoic acid	1.53	2.29	3.44
45.66	1,2-Dihydroxyanthraquinone	0.31	0.12	0.11
51.11	Ellagic acid	14.7	25.2	13.6

^aRetention time.

^b Name of the compounds without the trimethylsilyl (TMS) constituent.

^cThe ion current generated depends on the characteristics of the compound concerned and it is not a true quantitation

4.2 CAPÍTULO II

Atividade leishmanicida do extrato e frações da geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith

Richard Pereira Dutra, Maria Nilce Sousa Ribeiro, Rosane Nassar Meireles Guerra

Artigo a ser submetido ao BMC Complementary and Alternative Medicine
(ISSN: 1472-6882)

Fator de impacto: 2.24 Qualis Biotecnologia B1

RESUMO

Geoprópolis é produzida por espécies de abelhas sem ferrão, principalmente do gênero *Melipona*, a partir de resinas vegetais, secreções salivares, cera e terra, com composição química complexa e com várias atividades farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos extratos da geoprópolis e suas frações sobre culturas de *Leishmania amazonensis*, visando identificar os principais compostos associados a esta atividade. A amostra da geoprópolis foi coletada em meliponário no município de Fernando Falcão, Maranhão, Brasil. O extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG) foi preparado por maceração em solução hidroalcoólica a 70%. Para obtenção das frações, parte do EHG foi submetida à partição líquido-líquido com solventes de polaridades diferentes. A avaliação química foi realizada por abordagem química, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). A avaliação da atividade leishmanicida utilizou formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, incubadas em meio RPMI, durante 24h, na presença de diferentes concentrações dos extratos e frações da geoprópolis. Os extratos e as frações da geoprópolis inibiram o crescimento *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania*, sendo que a fração acetato de etila (FA) foi a mais eficiente ($CI_{50} = 29,89 \mu\text{g/mL}$), seguida das frações clorofômica (FC) ($CI_{50} = 43,21 \mu\text{g/mL}$), hidroalcoólica (FHA) ($CI_{50} = 49,48 \mu\text{g/mL}$) e do extrato hidroalcoólico (EHG) ($CI_{50} = 47,0 \mu\text{g/mL}$). A fração hexânica não apresentou atividade nas condições testadas. O EHG apresentou compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, triterpenos e ausência de flavonoides e alcalóides na abordagem fitoquímica. A análise por CG-EM, identificou os ácidos gálico e elágico, ácidos graxos, ácido orgânico, antraquinona, diterpenos, triterpenos, esteróides, açúcares e alcoóis, enquanto por CLAE-EM foram identificados galotaninos e elagitaninos. Considerando que na amostra maisleishmanicida (FA) encontramos compostos polifenólicos derivados dos ácidos gálico e elágico, sugerimos que estes compostos são os principais responsáveis pela ação leishmanicida da geoprópolis de *Melipona fasciculata*.

Palavras-chave: geoprópolis, *Melipona fasciculata*, ácido gálico, ácido elágico, taninos hidrolisáveis, *Leishmania amazonensis*, atividade leishmanicida

ABSTRACT

Geopropolis is produced by stingless bee species, particularly the genus *Melipona*, from plant resins, salivary secretions, wax and soil, with complex chemical composition and various pharmacological activities. The objective of this study was to investigate the effects of the extracts and fractions of geopropolis on *Leishmania amazonensis* cultures, to identify the major compounds associated with this activity. The sample was collected in the geopropolis meliponary the municipality of Fernando Falcão, Maranhão, Brazil. The hydroalcoholic extract of geopropolis (HEG) was prepared by steeping in water-alcohol solution to 70%. To obtain the fractional part of EHG was subjected to liquid-liquid partition solvent of different polarity. A chemical evaluation was performed by chemical approach, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS). The antileishmanial activity assessment used promastigotes of *Leishmania amazonensis*, incubated in RPMI for 24 h in the presence of different concentrations of the extract and fractions of geopropolis. The extract and fractions of geopropolis inhibited the in vitro growth of promastigotes, and the ethyl acetate fraction (AF) was the most efficient ($IC_{50} = 29.89 \mu\text{g/mL}$), followed by fractions clorofómica (CF) ($IC_{50} = 43.21 \mu\text{g/mL}$), hydroalcoholic (HAF) ($IC_{50} = 49.48 \mu\text{g/mL}$) and the hydroalcoholic extract (HEG) ($IC_{50} = 47.0 \mu\text{g/mL}$). The hexane fraction showed no activity under the conditions tested. The HEG presented phenolics, hydrolysable tannins, triterpenes and absence of flavonoids in phytochemical approach. Analysis by GC-MS, identified ellagic and gallic acids, fatty acids, organic acid, anthraquinone, diterpenes, triterpenes, steroids, sugars and alcohols, while HPLC-MS were identified gallotannins and ellagitannins. Whereas the sample more antileishmanial (AF) found polyphenolic compounds, gallic acid derivatives and ellagic, suggest that these compounds are responsible for a major share of leishmanicidal geopropolis *Melipona fasciculata*.

Keywords: geopropolis, *Melipona fasciculata*, gallic acid, ellagic acid, hydrolysable tannins, *Leishmania amazonensis*, leishmanicidal activity

Introdução

As abelhas indígenas sem ferrão (Apidae, Meliponini) são um grupo diverso de himenópteros sociais, distribuídos nas áreas tropicais e subtropicais do mundo com a maior parte de suas espécies ocorrendo nos Neotrópicos; o cultivo destas abelhas, a Meliponicultura é desenvolvida por comunidades tradicionais tendo características locais de acordo com o conhecimento regional e tradicional, tendo como principais produtos mel e cera, mas produzem resinas (CORTOPASSI-LAURINO et al, 2006). No Brasil, as abelhas sem ferrão têm importante papel na etnobotânica dos índios Cayapós (POSEY, CAMARGO, 1985; CAMARGO, POSEY, 1990). Nas regiões Norte e Nordeste essa atividade vem crescendo e especialmente no estado do Maranhão, *Melipona fasciculata* Smith é cultivada há séculos pelas populações indígenas caboclas para produção de mel, produzindo ainda, cera, geoprópolis e pólen, desempenhando um importante papel econômico como fonte de renda no interior do Estado (KERR, 1987; KERR et al., 1996; BEZERRA, 2004). Geoprópolis de *Melipona fasciculata* é produzida a partir da mistura de resinas coletadas de espécies vegetais, misturadas com cera e terra. É usado popularmente como recursos terapêuticos, para tratar processos inflamatórios, ulcerações, tumores, fraquezas, hemorróidas, gastrites, tosses e promover cicatrização (KERR, 1987; SANTOS; ANTONINI, 2008).

O estado do Maranhão, Brasil está situado em uma área de transição com as regiões nordeste, norte e centro-oeste brasileira apresentando diferentes biomas, sendo que um deste é o bioma de floresta amazônica, compreendendo diversos municípios, com característica epidemiológica importante, com maior prevalência de casos de leishmaniose tegumentar americana (COSTA et al., 1998; REBÊLO et al., 2000), causada por protozoários das espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. Muito embora a doença seja de grande prevalência mundial, os quimioterápicos usados para o tratamento são de alto custo, não apresentam um bom índice terapêutico e nem baixa toxicidade. Surge, portanto, a necessidade de estudos na busca de novos fármacos leishmanicidas e os produtos de abelhas sem ferrão podem ser promissores na busca de substâncias leishmanicidas.

A própolis e geoprópolis das abelhas sem ferrão apresentam atividade antimicrobiana (BANKOVA; POPOVA, 2007; MULI et al., 2008; DUAILIBE et al., 2007; MANRIQUE; SANTANA, 2008; FANESI et al., 2009; LIBERIO et al 2011 a, b), antioxidante (SAWAYA et al., 2009, 2011), antiproliferativa, citotóxica (UMTHONG et al., 2009, 2011), antitumoral (ARAUJO et al., 2010, BORGES et al., 2011).

Geoprópolis de *Melipona fasciculata* possui elevados teores de polifenóis e flavonoides além de triterpenos e saponinas (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Atividade leishmanicida tem sido reportada para própolis de *Apis mellifera*, abelha com ferrão (AYRES et al., 2007; MACHADO et al., 2007; DURAN et al., 2008; 2011; PONTIN et al., 2008; OZBILGE et al., 2010), entretanto não há dados na literatura sobre a atividade leishmanicida de produtos de abelhas sem ferrão, entre a geopropolis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* sobre culturas de *Leishmania amazonensis*, visando identificar a fração mais ativa e os principais compostos químicos associados a esta atividade.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta da geoprópolis

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi coletada das partes internas de uma colméia, em um meliponário localizado no município de Fernando Falcão (6°7'30"S 44°52'30"W), região sudeste do estado do Maranhão, Brasil, em novembro de 2008.

2.2. Preparação do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG).

O EHG foi preparado pelo método descrito por Dutra et al. (2008). A geoprópolis *in natura* foi pulverizada (em moinho do tipo faca) e 500 g do pó da amostra, foram macerados com etanol 70%, na proporção geoprópolis/solvente 1:2 (p/v) por 48h. A solução extrativa resultante, após a filtração para retirada da terra, foi concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se o extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG).

2.3. Partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG).

O EHG (20 g) foi dissolvido em metanol:água (1:1, v/v) sob agitação mecânica e a solução metanólica foi submetida a partição líquido-líquido utilizando hexano, clorofórmio e acetato de etila. As soluções obtidas foram filtradas (Na₂SO₄ anidro) e concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FA) e hidroalcoólica (FHA).

2.4. Abordagem fitoquímica do extrato e frações

O EHG e as frações foram submetidos à abordagem química para verificação de compostos fenólicos, taninos, flavonoides e triterpenos (MATOS, 2003).

2.4. Análise por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

2.4.1 Preparação da amostra

O EHG e as frações (FH, FC, FA e FHA) foram secas a vácuo e cerca de 1mg de cada amostra foi derivatizada com o reagente N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS), de acordo com Roessner et al. (2001). Compostos sem grupos hidroxila em suas estruturas permaneceram inalterados pelo processo de derivatização.

2.4.2 Instrumento

Análise por CG-EM foi realizada em cromatógrafo gasoso - CG (Agilent 6890) equipado com um espectrômetro de massas (Agilent 5973 NMSD), coluna capilar de 30m HP5, 0,25 mm (Agilent), com ionização por impacto de elétrons (EI). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 230°C e 250°C, respectivamente. Foi utilizada uma fonte de íons a 200°C e o hélio foi o gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. A análise foi realizada utilizando 5 min de aquecimento isotérmico (70°C); gradiente de temperatura de 5°C/min a 310°C e um último minuto de aquecimento a 310°C. O sistema foi então equilibrado por 6 min a 70°C, antes da injeção automática da próxima amostra. Os espectros de massas foram registrados com uma velocidade de 2 scan/segundo de 50-650 m/z. Os cromatogramas de íons totais (TIC) e espectros de massas foram avaliados utilizando o programa ChemStation (Agilent) e bases de dados (NIST 2.0).

2.5. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray (CLAE/DAD/EM/EM) da fração acetato de etila (FA)

2.5.1. Instrumento

A análise CLAE/DAD/EM/EM foi realizada em CLAE-SCL-10A (Shimadzu), com detector de arranjo de fotodiodo, equipado com duas bombas (LC-10AD), injetor automático e acoplado com espectrômetro de massas LC-MS/MS (Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus), com analisador tipo íon trap quadrupolo em modo *tandem*, com ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*, ESI). A fase móvel utilizada foi água Milli-Q (Millipore) com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e metanol (eluente B). A eluição foi realizada em gradiente linear de 0-1 min, 5% B; 1-60 min, 30% B; 60-90 min, 100% B, utilizando coluna analítica

C18 de fase reversa (250mm x 4,60 mm, 5 μ m, Thermo). As amostras foram diluídas em metanol e água Milli-Q 0,1% de ácido fórmico na concentração final de 5mg/mL e filtradas em filtro de seringa Nylon (0,22 μ m, Allcrom). O volume da amostra injetado no sistema foi de 25 μ L, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV-Vis em 254 nm. Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo, utilizando nitrogênio ultra-puro como gás de nebulização com fluxo de 7.0 L/min, pressão de 27 psi, potencial de 4.0 kV, temperatura de 320°C e fluxo para massas de 100 μ L/min, em baixa resolução, na faixa de 100 a 1000m/z. A identificação dos constituintes foi obtida com base na massa do íon molecular, na fragmentação do íon molecular, espectros de UV-visível encontrados na literatura ou com co-injeção de padrões.

2.6. Avaliação da atividade leishmanicida

O EHG e as frações foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e diluídos com meio RPMI 1640 completo, em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), resultando nas concentrações finais de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 e 15.62 μ g/mL. Foram adicionados aos poços 10 μ L da suspensão contendo 5×10^6 /mL de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125). Anfotericina B, droga de referência no tratamento das leishmanioses, foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. Formas promastigotas cultivadas em meio RPMI 1640 e não tratadas foram consideradas como controle negativo do ensaio. A atividade leishmanicida foi determinada após 24 horas, pela contagem do número total de promastigotas vivas, observando-se a motilidade flagelar. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer e microscópio ótico de luz comum (Nikon). Os resultados, expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI_{50}), representam a média de amostras testadas em triplicata (BEZERRA et al., 2006).

2.7. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e, em seguida, analisados pelo programa GraphPad Prism (version 5.0). A CI_{50} para a atividade leishmanicida foi calculada por regressão linear. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

Os resultados da atividade leishmanicida do EHG e das frações FH, FC, FA e FHA estão demonstradas na Tabela 1. A fração (FA) foi a mais ativa (CI_{50} 29,89 $\mu\text{g/mL}$), seguida das frações FC (CI_{50} 43,21 $\mu\text{g/mL}$) e FHA (CI_{50} 49,48 $\mu\text{g/mL}$). A fração hexânica (FH) não demonstrou atividade leishmanicida. A fração FA ocasionou total inibição no crescimento *in vitro* das formas promastigotas de *L. amazonensis* a partir da concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a fração FHA só teve efeito inibitório com a maior concentração (500 $\mu\text{g/mL}$). A fração FC não apresentou 100% de inibição em nenhuma das concentrações testadas (Figura 1).

Testes fitoquímicos detectaram a presença de compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis e triterpenos no EHG, enquanto as frações FA e FHA apresentaram somente compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis. A fração FC apresentou compostos fenólicos e triterpenos e a FH apresentou somente triterpenos (Tabela 2).

Análises por CG-EM do EHG e das frações FH, FC, FA e FHA identificaram 26 compostos, pertencentes a diferentes classes de compostos como ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, antraquinonas, diterpenos, triterpenos, esteróides, ácidos graxos, açúcares e alcoóis (Tabela 3).

Análises por CLAE-ESI-EM-EM da fração FA, identificaram 11 compostos: ácido gálico, ácido elágico, galoil-HHDP-glicose (corilagina), HHDP-glicose, di-HHDP-glicose (pedunculagina), trigaloil-glicose, digaloil-HHDP-glicose (telimagrandina I), dilactona do ácido valonéico, galoil-HHDP-DHHDP-glicose (granatina B), di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina) e trigaloil-HHDP-glicose (telimagrandina II) (Tabela 4)

4. Discussão

Atualmente não há relatos prévios da ação leishmanicida em produtos de abelhas sem ferrão, mas em própolis de *Apis mellifera*, abelha com ferrão. Segundo Machado et al. (2007) o extrato hidroalcoólico da própolis de *Apis mellifera* (Minas Gerais, Brasil) foi ativo em formas promastigotas de *L. major* (48,2 $\mu\text{g/mL}$), *L. chagasi* (49,9 $\mu\text{g/mL}$), *L. braziliensis* (48,6 $\mu\text{g/mL}$) e *L. amazonensis* (229,3 $\mu\text{g/mL}$), sendo a atividade atribuída a presença de flavonoides e triterpenos, entre elas as amirinas.

As análises por CG-EM do extrato e das frações FH, FC e FHA refletem uma complexa natureza química, contendo alguns compostos bioativos, apresentando em comum a presença dos ácidos gálico, elágico, palmítico e esteárico. Na FC foi detectado, ácido

oleanólico, β -sitosterol e ácido protocatecuico, enquanto na FHA foram identificados açúcares e alcoóis. Na fração FH, inativa para as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram identificados os diterpenos isopimárico e deidroabietico, os triterpenos β -amirina, lupenona, ácido oleanólico e estigmasterol, além de ácidos graxos. Os triterpenos β -amirina e lupenona já foram identificados em própolis de *Tetragonisca angustula* (PEREIRA et al., 2003), enquanto os ácidos graxos esteárico e palmítico, e o diterpeno deidroabietico foram encontrados em geoprópolis de *Melipona compressipes*, do estado do Piauí, Brasil (BANKOVA et al., 1998). Ácidos graxos são comuns em própolis de *Apis mellifera* (TORRES et al., 2008; DURAN et al., 2011).

No entanto a FA, fração leishmanicida, possui somente ácido gálico e D-glicopiranosose em sua composição, sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis na respectiva fração, já indicado nos testes fitoquímicos

Padrões de ácido gálico e elágico derivatizados foram analisados nas mesmas condições das frações por CG-EM, utilizando a base de dados (NIST 2.0) e dados da literatura (EL-GHORAB et al., 2002; ZOECHLING et al., 2009), demonstraram que os espectros de massas são semelhantes aos encontrados neste estudo, confirmando a presença dos ácidos gálico e elágico como os principais ácidos fenólicos identificados no extrato e frações da geoprópolis. A presença de ácido gálico em geoprópolis de *Melipona fasciculata* foi anteriormente descrita por nosso grupo, em amostras do estado do Maranhão, Brasil e em própolis de *Tetragonisca angustula*, abelha sem ferrão, do estado de Pernambuco, Brasil (BANKOVA et al., 1998; VELIKOVA et al., 2000).

A FA possui maiores concentrações de ácido gálico e maior ação leishmanicida dentre o extrato e frações testadas. Própolis de *Apis mellifera* (Paraná, Minas Gerais e Alagoas, Brasil) reduz a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis* (AYRES et al., 2007; POTIN et al., 2008), assim como a própolis oriunda da Turquia (DURAN et al., 2008, 2011; OZBILGE et al., 2010). Tasdemir et al. (2006) avaliaram o ácido gálico, além de outros ácidos fenólicos, flavonoides e catequinas, em testes *in vitro* e *in vivo* para *Leishmania donovani*, sugerindo que a atividade leishmanicida observada pode estar relacionada, com a presença dos compostos fenólicos detectados, que apresentam uma relativa toxicidade a microorganismos devido à localização e o número de grupos hidroxilas presentes nos grupamentos fenólicos, sendo que, quanto maior o número de hidroxilas, maior a toxicidade. Shuaibu et al. (2008) obteve concentração mínima inibitória maior que 150 $\mu\text{g/mL}$, para o ácido elágico em ensaios *in vitro* com *L. amazonenses*.

Visando conhecer os constituintes químicos da fração mais ativa as promastigotas de *L. amazonensis* (FA), além da identificação de ácido gálico e ácido elágico, esta fração foi

analisada por CLAE-ESI-EM/EM, onde identificamos nove taninos hidrolisáveis: galoil-HHDP-glicose (corilagina), hexahidroxidifênico-glicose (HHDP-glicose), di-HHDP-glicose (pedunculagina), trigaloil-glicose, digaloil-HHDP-glicose, (telimagrandina I), dilactona do ácido valonéico, galoil-HHDP-DHHDP-glicose (granatina B), di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina) e trigaloil-HHDP-glicose (telimagrandina II) (Tabela 4).

Taninos hidrolisáveis são polifenóis derivados do ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos), ligados a uma molécula de açúcar, geralmente a glicose (OKUDA, 2005). Compostos fenólicos simples e taninos hidrolisáveis já foram relacionados à atividade leishmanicida frente várias espécies de *Leishmania* (KOLODZIEJ et al., 2001; KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005). Estudos de Kolodziej et al. (2001), demonstraram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*), do ácido gálico e dos taninos hidrolisáveis trigaloil-glicose, casuarictina, telimagrandina I, II e pedunculagina. Esses compostos também foram identificados na fração acetato de etila obtida a partir do EHG, produzida no município de Fernando Falcão-MA e ativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis* neste estudo.

Na literatura não há dados sobre as espécies vegetais utilizadas por *Melipona fasciculata*, no município maranhense de Fernando Falcão, MA, Brasil. Segundo Carvalho; Marchini (1999), o conhecimento da vegetação utilizada pelas abelhas é importante para a exploração racional, em programas de conservação das abelhas e deve ser realizada de forma regional, pois uma mesma espécie vegetal pode apresentar recursos vegetais diferenciados para as abelhas em função das condições edafoclimáticas.

Com base nos dados biológicos e químicos sugerimos que a ação anti-*Leishmania* da geoprópolis de *Melipona fasciculata* está associada à presença dos ácidos gálico e elágico, possivelmente taninos hidrolisáveis. Entretanto, a fração clorofórmica (FC), que apresentou a segunda maior atividade leishmanicida, possui menor concentração destes compostos, sugerindo que a presença de outras substâncias ativas, tais como ácido oleanólico, β -sitosterol e ácido palmítico, já relatados como compostos leishmanicidas para *L. amazonensis* e *L. donovani* (TORRES-SANTOS et al., 2004; ROCHA et al., 2005), podem também estar associados a atividade observada.

A fração FH apresentou uma mistura de ácidos graxos, diterpenos, triterpenos e esteróides, porém não foi observada atividade leishmanicida, mesmo apresentando em sua composição substâncias leishmanicidas, o que pode ter relação com a baixa concentração destes constituintes.

5. Conclusão

O EHG e suas frações apresentaram um grande potencial anti-*Leishmania*, quando comparados a relatos prévios de própolis de *Apis mellifera*. Com base nos resultados concluímos que a geoprópolis apresenta atividade leishmanicida, sendo a fração acetato de etila (FA) a mais ativa, e sugerimos que o ácido gálico e os taninos hidrolizáveis; trigaloliglicose, casuarictina, telimagrandina I, II e pedunculagina são os principais responsáveis pela ação leishmanicida da geoprópolis de *Melipona fasciculata*. Os resultados abrem perspectivas para a continuidade das pesquisas e para o isolamento das substâncias leishmanicidas da geoprópolis e demonstram a base científica do uso popular em ulcerações da geoprópolis.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de doutorado concedida. Aos meliponicultores pelas amostras de geoprópolis e à Dra Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), Bahia, Brasil, pelas cepas de *Leishmania amazonensis*.

Referências

- ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; AZEVEDO, C. C.; NOGUEIRA, A. M. C.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Polifenóis de própolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v.8, p.18-24, 2006.
- ARAUJO, M. J. A. M.; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. R.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; LIBERIO, S. A.; MACIEL, 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 Erlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.580-587, 2010.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIOGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, p.361-367, 1998.
- 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.

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. **Apacta**, v.41, p.71-85, 2006.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-637, 2006.

BEZERRA, J. M. D. Meliponicultura: Uma atividade essencial para a economia familiar do Trópico Úmido. In: Moura, E. G. (Org.). **Agroambiente de Transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido: Atributos, Alterações e Uso na Produção Familiar**. São Luís: UEMA, 2004, p. 61-121.

BORGES, K.S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDELI, C. A.; SOARES, A.E.E.; TONE, L.G. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, p. 310–314, 2011.

CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C. Plantas visitadas por *Apis mellifera* L. no vale do Paraguaçu, Município de Castro Alves, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p.333-338, 1999.

CAMARGO J.M.F., POSEY D.A. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): notas adicionais. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi** v. 6, p. 17–42, 1990.

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

COSTA, J.M.L.; BALBY, I.A.T.; ROCHA, E.J.S.; SILVA, A.R.S.; REBÊLO, J.M.M.; FERREIRA, L.A.; GAMA, E.A.; BRANCO, M.R.F.C.; BURATTINI, M.N.; SOARES, N.J.S. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 31, p.279-288. 1998.

CUNHA, M. S.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A. N.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de própolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, p. 31-38, 2009.

DUAILIBE, 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, p.420- 423, 2007.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H.; OZER, B. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitology Research**, v.102, p.1217–1225, 2008.

- DURAN, N.; MUZTAFI, M.; CULHA, G.; DURAN, G.; OZER, B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. **Parasitology Research**, v.108, p. 95-105, 2011.
- DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de própolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.557-562, 2008.
- EL-GHORAB, A.H.; FADEL, H.M.; EL-MASSRY, K.F. The Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris*: chemical compositions of the fruit volatile oil and antioxidant activity. **Flavour and fragrance journal**, v. 17, p. 306–312, 2002.
- FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG, D. D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. 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, 2009.
- KERR, W.E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, própolis e cera. **Informe Agropecuário**, v.13, n. 149, p.15-27, 1987.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. E; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçú - Biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú, 144p., 1996.
- KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; FOO, L.Y. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- α release in macrophages *in vitro*. **Planta Medica**, v.67, p. 825-832, 2001.
- KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immunomodulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasited RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v.66, p. 2056-2071, 2005.
- LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A., DUTRA, R.P.; ARAMYS, S.R.; 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 geoprópolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMCComplementary and Alternative Medicine**, v.11, p.1-10, 2011a.
- LIBÉRIO, S. A.; RIBEIRO, M. N. S.; MONTEIRO-NETO, V.; GUERRA, R. N. M. Composições farmacêuticas e odontológicas à base de geoprópolis e uso dessas composições. **Revista de Propriedade Industrial (RPI)**, v. 2120, PI0905583-5, 2011b.
- MACHADO, G.M.C.; LEON, L L.; CASTRO, S.L. Activity of brazilian and bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 73-77, 2007.
- 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, 2008.

- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: EUFC, p.45-61, 2003 .
- 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.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution. **Phytochemistry**, v.55, p.513–529, 2000.
- OZBILGE, H.; KAYA, E.G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p. 556-560, 2010.
- PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; AQUINO NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v.34, p.291-298, 2003.
- PONTIN, K.; DA SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, F.F.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.A. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, p. 487-492, 2008.
- POSEY D.A., CAMARGO J.M.F. Additional notes on the classification and knowledge of stingless bees (Meliponinae, Apidae, Hym.) by the Kayapo Indians of Gorotide (Para, Brazil), **Ann. Carnegie Mus.** v.54, p.247–274, 1985.
- REBÊLO, J.M.M.; OLIVEIRA, S.T.; BARROS, V.L.L.; SILVA, F.S.. Flebotomíneos da Amazônia Maranhense. IV – Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. **Entomologia y Vectores**. v.7, p.61-72, 2000.
- ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p.514-535, 2005.
- ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v.3, p.11–29, 2001.
- SANTOS, G.M.; ANTONINI, Y. The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p.1-9, 2008.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CALADO, J. C. P.; SANTOS, L. C.; MARCUCCI, M. C.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. 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, 2009.
- SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.C.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v.5, p.1-10, 2011.
- TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 1352–1364, 2006.

TORRES, R.N.S., LOPES, J.A.D., MOITA NETO, J.M.; CITO, A.M.G.L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química nova**, v.31, p. 479-485, 2008.

TORRES-SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.P.; FALCÃO, C.A.B.; KAPLAN, M.A.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicinen**, v.11, p. 114-120, 2004.

UMTHONG, P. PHUWAPRAISIRISAN, S. PUTHONG AND C. CHANCHAO, *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p. 37–45, 2011.

UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CANCHAO, C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. **American Journal of Chinese Medicine**, v.37, p.855-865, 2009.

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

ZOECHLING, A.; REITER, E.; EDER, R.; WENDELIN, S.; LEIBER, F.; JUNGBAUER, A. The flavonoid kaempferol is responsible for majority of estrogenic activity in red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, p. 223–232, 2009.

Tabela 1

Atividade leishmanicida do extrato e das frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata*

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL) *
	<i>Leishmania amazonensis</i>
EHG	47,00 ± 2,70 ^a
FH	s/atividade
FC	43,21 ± 2,32 ^a
FA	29,89 ± 2,93 ^b
FHA	49,48 ± 1,40 ^a
Anfotericina B [#]	0,16 ± 0,46 ^c

EHG, extrato hidroalcoólico da geoprópolis; FH, fração hexânica; FC, fração clorofórmica; FA, fração acetato de etila; FHA, fração hidroalcoólica. Resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3), valores com letras diferentes na coluna foram diferentes estatisticamente (p<0.0001). * Concentração inibitória do crescimento parasitário, necessária para inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, calculada por regressão não linear. [#]Controle positivo

Tabela 2

Perfil fitoquímico do extrato e das frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata*

Amostras	Classes químicas			
	Fenólicos	Taninos	Flavonoides	Triterpenos
EHG	+	+	-	+
FH	-	-	-	+
FC	+	-	-	+
FA	+	+	-	-
FHA	+	+	-	-

Tabela 3

Identificação dos compostos do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e suas frações analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Composto identificado ^a	EHG	FH	FC	FA	FHA
%TIC ^b					
Ácidos graxos					
Ácido palmítico	0,52	8,18	0,96	-	0,51
Ácido margárico	-	0,02	-	-	-
Ácido esteárico	1,53	2,46	5,29	-	2,47
Ácido araquídico	-	0,33	-	-	-
Ácido beénico	-	0,60	-	-	-
Ácido lignocérico	-	0,25	-	-	-
Ácido orgânico					
Ácido quínico	1,68	-	-	-	1,01
Antraquinona					
1,2-dihidroiantraquinona	0,31	-	-	-	-
Ácido fenólicos					
Ácido gálico	22,3	-	4,80	26,16	7,68
Ácido elágico	14,7	-	1,53	-	21,60
Ácido protocatecuico	0,10	-	0,14	-	-
Diterpenos					
Ácido isopimárico	-	0,01	-	-	-
Ácido deidroabietico	-	0,13	-	-	-
Triterpenos					
β-Amirina	-	0,42	-	-	-
Lupenona	-	0,43	-	-	-
Ácido oleanólico	-	0,13	2,35	-	-
Esteróides					
Campesterol	-	0,07	-	-	-

Tabela 3

Identificação dos compostos do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e suas frações analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (continuação)

Estigmasterol	-	0,55	-	-	-
β -Sitosterol	-	-	0,39	-	-
Açúcares					
D-Fructose	0,32	-	-	-	-
D-Glicopirranose	24,3	-	-	0,15	22,60
D-Manopirranose	12,80	-	-	-	10,33
D-Xilopirranose	0,61	-	-	-	0,28
Álcoois					
Glicerol	0,22	-	-	-	0,35
Xilitol	0,92	-	-	-	1,22
<i>myo</i> -Inositol	0,10	-	-	-	0,10

^aOs nomes dos constituintes sem os trimetilsilil(TMS) substituintes.

^bÍons correntes totais. O íon corrente gerado depende da característica do composto e não é uma quantificação verdadeira. EHG, extrato hidroalcoólico; FH, fração hexânica; FC, fração clorofórmica; FA, fração acetato de etila; FHA, fração hidroalcoólica.

Tabela 4

Compostos fenólicos identificados na fração acetato de etila (FA) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray (CLAE-DAD-ESI-EM/EM)

Composto	Tr (min)	λ_{max} (nm)	MM	[M-H] ⁻ m/z	Principais íons EM/EM (m/z)	Compostos identificados
1	11,23	272	170	169	125	ácido gálico ^b
2	19,26	262	634	633	481 301 275	galoil-HHDP-glicose ^a
3	25,60	267	482	481	301 275 169	HHDP-glicose ^a
4	27,16	265	784	783	765 481 301 275	di-HHDP-glicose ^a
5	30,53	277	636	635	483 465 313 301	trigaloil-glicose ^a
6	31,98	274	786	785	633 483 313 301 275	digaloil-HHDP-glicose ^a
7	35,62	254-370	470	469	425 301	dilactona do ácido valoneico ^a
8	39,25	280-365	952	951	933 783 301	galoil-HHDP-DHHDP-glicose ^a
9	45,08	271	936	935	633 481 301 275	di-HHDP-galoil-glicose ^a
10	51,39	277	938	937	785 767 635 465 301 275	trigaloil-HHDP-glicose ^a
11	69,88	254, 363	302	301	301	ácido elágico ^{a,b}

Tr, tempo de retenção(min); λ_{max} (nm), absorção no UV-Vis; MM, massa molecular; [M-H]⁻, íon molecular; HHDP, hexahidroxidifênico.^aCompostos identificados pela primeira vez em geoprópolis. ^bCo-injeção com padrões autênticos.

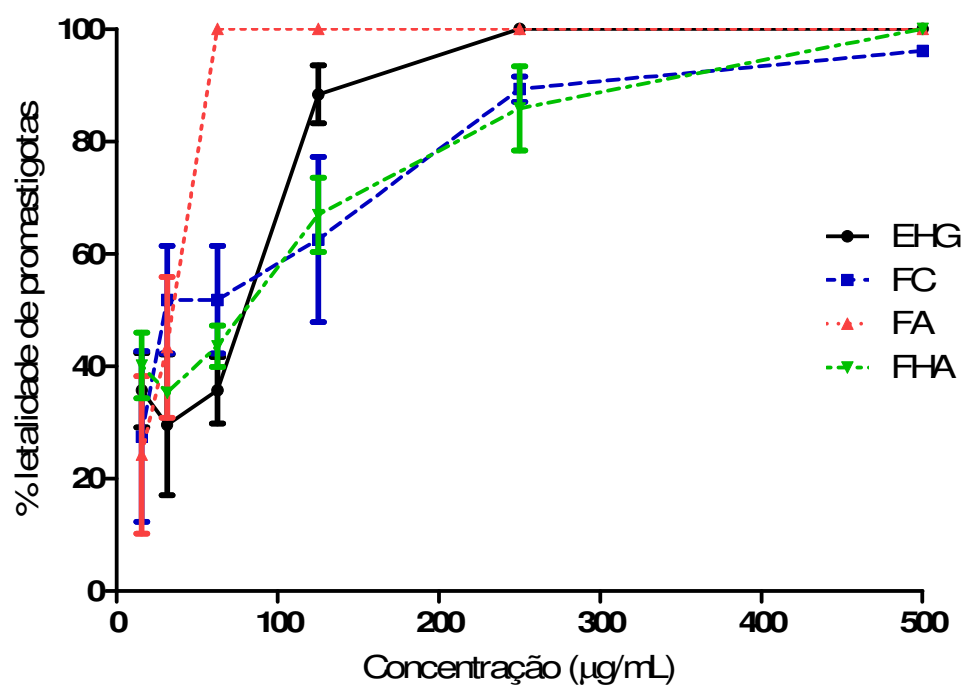


Figura 1 Percentagem de letalidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato hidroalcoólico da geoprópolis e suas frações. EHG, extrato hidroalcoólico; FC, fração clorofórmica; FA, fração acetato de etila; FHA, fração hidroalcoólica.

4.3 CAPÍTULO III

**Composição fenólica e atividade antioxidante do extrato e frações obtidas da
geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith**

Richard Pereira Dutra, Maria Nilce de Sousa Ribeiro, Rosane Nassar Meireles Guerra

Artigo a ser submetido ao Journal of Agricultural and Food Chemistry
(ISSN:0021-8561)

Fator de impacto: 2.816 Qualis Biotecnologia B1

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar e comparar o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante em geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith e identificar a composição química. O teor de fenóis totais foram determinados usando Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi determinada utilizando o radical DPPH. Cromatografia líquida de alta eficiência equipada com um sistema de díodos (CLAE-DAD) e detecção por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-EM) foi utilizada para identificar os compostos fenólicos em geoprópolis. O extrato hidroalcoólico e as frações apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH, exceto a fração hexano, e altas concentrações de polifenóis, principalmente na fração acetato de etila. As estruturas de onze compostos foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e ionização por eletrospray (CLAE-DAD-ESI-EM). A maioria destes compostos é derivada do ácido gálico, sob a forma de ésteres de galoil glicose (galotaninos) e de ésteres de galoil-hexahidroxidifênico-glicose (elagitaninos). Os resultados obtidos permitem concluir que a atividade antioxidante e os elevados teores de polifenóis da geoprópolis estão relacionados com presença de taninos hidrolisáveis.

Palavras-chave: geoprópolis, *Melipona fasciculata*, compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, atividade antioxidante, CLAE-ESI-EM

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine and compare the total phenolic content and antioxidant capacity in geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith and to identify the phenolic compounds in these respective portions. Total phenolic contents were determined colorimetrically using Folin-Ciocalteu reagent, and antioxidant capacity was determined using DPPH radical. High-performance liquid chromatography equipped with diode array (HPLC-DAD) and electrospray ionization mass spectrometric detection (ESI-MS) was used to identify the phenolic compounds in geopropolis. The hydroalcoholic extract and fractions showed antioxidant activity towards DPPH, except the hexane fraction, and high concentrations of polyphenols, mainly in the ethyl acetate fraction. The structures of eleven compounds were attempted to be identified by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI-MS). The majority of those compounds were gallic acid derivatives, in the form of either galloyl esters of glucose (gallotannins), combinations of galloyl and hexahydroxydiphenoyl esters of glucose (ellagitannins). The results showed that the antioxidant activity and high levels of polyphenols are related to the presence of hydrolyzable tannins in geopropolis.

KEYWORDS: geopropolis, *Melipona fasciculata*, phenolic compounds, hydrolyzable tannins, antioxidant activity, HPLC-ESI-MS

Introdução

Os produtos de abelhas sem ferrão são importantes fontes de compostos bioativos, entre eles a geoprópolis, que é produzida por algumas espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, a partir da mistura de resinas vegetais, acrescida de secreções salivares, cera e terra. Nas colméias este produto é utilizado para fechar pequenas frestas, vedar entradas de ventilação e como agente antimicrobiano (BARTH, 2006; MARTINS et al., 2011).

A geoprópolis e seus derivados são usados pela população como recursos terapêuticos, para tratar processos inflamatórios, tumores, fraquezas, hemorróidas, gastrites, tosse e promover cicatrização (SANTOS; ANTONINI, 2008).

Nos últimos anos, estudos com a geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* em diferentes regiões do estado do Maranhão, tem apresentado elevados teores de polifenóis e flavonoides totais, triterpenos e saponinas (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009), atividade antibacteriana (DUAILIBE et al., 2007; LIBÉRIO et al., 2011).

Os compostos fenólicos exibem uma grande variedade de propriedades fisiológicas, tais como anti-alérgica, antiaterogênicos, antiinflamatórias, antimicrobiana, anti-trombótica, cardioprotetora, vasodilatadora e antioxidante (BALASUNDRAM et al., 2006). Estudos correlacionam a composição polifenólica da própolis de *Apis mellifera* com suas propriedades antioxidantes (GREGORIS; STEVANATO, 2010).

A adição de antioxidantes aos alimentos industrializados tem sido prática corrente, razão que justifica o interesse pela pesquisa de novos compostos antioxidantes, além disso, compostos antioxidantes são usados no tratamento de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras. Todos esses fatores evidenciam a importância do uso de antioxidantes para a prevenção de tais enfermidades (APAK et al., 2007).

Entretanto as investigações quanto às atividades biológicas e composição química se concentram em produtos de abelhas com ferrão, principalmente própolis de *Apis mellifera*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e identificar a composição química da geoprópolis de *Melipona fasciculata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Padrões. Etanol, metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, reagente Folin-Ciocalteu, ácido fórmico, carbonato de sódio e sulfato de sódio anidro todos de grau analítico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes utilizados foram

de grau analítico. Os solventes utilizados nas análises cromatográficas grau HPLC (Merck) foram filtrados usando um sistema de filtração para solventes da Phenomenex. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ácido gálico, ácido elágico foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os solventes foram filtrados utilizando aparelho de filtração de solventes (Phenomenex) e degaseificada usando banho de ultrassom. A água utilizada nas análises foi purificada num aparelho Millipore Milli-Q.

Materiais. A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi coletada das partes internas de uma colméia, em um meliponário localizado no município de Fernando Falcão (6°7'30"S 44°52'30"W), região sudeste do estado do Maranhão, Brasil, em novembro de 2008.

Preparação do extrato da geoprópolis. A geoprópolis *in natura* foi triturada em moinho do tipo faca, obtendo-se a geoprópolis em pó (500 g), que foi submetida à maceração com etanol/água (70:30, v/v), na proporção geoprópolis/solvente 1:2 (p/v) por 48h. A solução extrativa resultante, após a filtração para retirada da terra, foi concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se o extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG).

EHG (20 g) foi dissolvido em metanol:água (1:1, v/v) sob agitação mecânica e a solução metanólica foi submetida a partição líquido-líquido utilizando hexano, clorofórmio e acetato de etila. As soluções obtidas foram filtradas (Na₂SO₄ anidro) e concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FA) e hidroalcoólica (FHA).

Concentração de polifenóis totais. As concentrações de polifenóis totais do extrato da (EHG), frações (FH, FC, FA, FHA) foram determinadas utilizando reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%, por espectrofotometria (espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35, PekinElmer) a 760 nm, após 2h de reação (ABREU et al., 2006; CUNHA et al., 2009). Os resultados foram expressos como equivalente de ácido gálico (%), calculados a partir de uma curva padrão de ácido gálico (1 a 30 µg/mL), usada para obtenção da equação da reta ($y = 0,0393x - 0,0384$; $R^2 = 0,99$). Todas as leituras foram realizadas em triplicatas.

Atividade antioxidante frente ao radical estável DPPH. A atividade antioxidante do extrato e das frações foram avaliadas pelo método fotolorimétrico *in vitro* utilizando o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) segundo Brand-Willians et al. (1995), com modificações. As amostras foram diluídas em diferentes concentrações em metanol P.A (1 a

100 µg/mL), em seguida adicionados a solução metanólica de DPPH (40 µg/mL). Após 30 min de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância de cada solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer) a 517nm. Padrões de ácido gálico e ácido elágico foram usados como controle positivo, nas mesmas condições das amostras.

A porcentagem de inibição foi obtida com a seguinte fórmula: Atividade antioxidante (%) = $100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100 / A_{\text{controle}}]$, onde A_{amostra} = absorbância da amostra após 30 minutos de reação, A_{branco} = absorbância do branco, e A_{controle} = absorbância do controle.

A porcentagem da atividade antioxidante foi relacionada com a concentração da amostra para a obtenção da concentração efetiva (CE_{50}), definida como a concentração da amostra necessária para causar uma inibição de 50% da concentração inicial de DPPH. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise por CLAE/UV-Vis. As análises por CLAE foram realizadas num cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Autosampler (Thermo) (San Jose, CA, EUA), equipado com um injetor com um loop de 25 µL, e um detector de UV-VIS. A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Hypersil BDS) fornecido por Thermo Electron Corporation (Waltham, MA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3 mm, 5µ, Gemini, Phenomenex). A separação dos compostos do extrato e frações da geoprópolis foi realizada à temperatura ambiente com um programa de gradiente de eluição a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As fases móveis consistiu de água Milli-Q, com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B). O seguinte gradiente linear foi aplicado: 0-1 min, 5% B; 1-60 min, 5-30% B; 60-90 min, 30-100% B, seguido por re-equilíbrio da coluna durante 10 min antes da próxima amostra. O volume de injeção no sistema de CLAE foi de 25 µL, e a detecção foi realizada a 254 nm. Antes da injeção no CLAE, cada extrato foi dissolvido no mesmo solvente utilizado para a extração (grau CLAE), para se obter uma concentração final de cerca de 5 mg/mL, e em seguida filtrada através de um filtro de seringa de Nylon (0,22 µm, Allcrom).

Análise por CLAE/DAD/ESI-EM. A EHG e FA foram analisados por CLAE (LC-10AD, Shimadzu) equipado com um detector de arranjo de diodos, acoplado a um espectrômetro de massas (Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics), com analisador tipo íon trap quadrupolo em modo *tandem*, com ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*, ESI). As condições para a diluição das amostras e composição da fase móvel foram as mesmas descritas anteriormente. As condições de ionização foram as seguintes: voltagem de electrospray com fonte de íons a 40 V, um potencial de 4,0 kV e temperatura a 320°C. Hélio

ultrapuro (He) foi usado como gás de colisão e nitrogênio (N₂) como gás de nebulização. A nebulização foi auxiliada por um gás de azoto a uma pressão de 27 psi. A dessolvatação foi facilitada utilizando uma corrente de fluxo de 7,0 L/min. As análises foram realizadas nomodo *full scan*, com ionização negativa, na faixa de 100 a 1000 m/z . As identificações foram obtidas com base na massa do íon molecular, na fragmentação do íon molecular, espectros de UV-visível encontrados na literatura ou com co-injeção de padrões.

Análise Estatística. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e, em seguida, analisados pelo programa GraphPad Prism (version 5.0). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração, Rendimento, Concentração de Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante. O extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG) apresentou rendimento de 8,8% (44 g), coloração preta, sabor amargo e odor resinoso. A partir do fracionamento do EHG, foram obtidas as frações hexânica (FH, 0,22 g); clorofórmica (FC, 2,30 g); acetato de etila (FA, 7,44 g) e hidroalcoólica (FHA, 9,3 g).

Os teores de polifenóis totais do extrato e frações estão dispostos na Tabela 1, FA (57,89 %) e o extrato bruto (47,78%) possuem maiores teores enquanto nas demais variaram de 6,32 a 35,99 %. Abreu et al. (2006) analisando geoprópolis de *Melipona fasciculata* do Cerrado maranhense, demonstraram teores de polifenóis totais variando de 14,14 a 67,46%, enquanto Cunha et al. (2009) obtiveram teores de polifenóis totais de 7,36 a 36,95%, em extratos hidroalcoólicos obtidos por processo de maceração em geoprópolis da Baixada maranhense.

O extrato hidroalcoólico (EHG) apresentou CE₅₀ de 5,24 $\mu\text{g/mL}$ e nas demais frações a CE₅₀ variou de 3,75 a 17,86 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). A fração FA, apresentou maior capacidade antioxidante, enquanto a fração hexânica (FH) não apresentou atividade.

Segundo Apak et al. (2007), os teores de polifenóis totais estão altamente correlacionados com a atividade antioxidante em ensaios com o radical DPPH. Os polifenóis são referidos como os mais abundantes e efetivos antioxidantes em amostras de própolis brasileiras de *Apis mellifera* (BASKOTA et al., 1998; DA SILVA et al., 2006; CABRAL et al., 2009). Moreira et al. (2008) também confirmam que extratos de própolis com maiores concentrações de polifenólicos totais, apresentavam também maior atividade

antioxidante. Segundo Sawaya et al. (2009) própolis de *Scaptotrigona* sp., abelha sem ferrão (dos estados do Maranhão e São Paulo, Brasil), encontraram CE_{50} 43,0 $\mu\text{g/mL}$, e sugerem que a atividade antioxidante é afetada pela composição química, sazonalidade e origem geográfica.

Identificação dos Compostos Fenólicos. Considerando que a FA e o EHG apresentaram maiores teores de polifenóis totais e foram mais efetivas frente ao radical DPPH, essas amostras foram analisadas por CLAE-UV-Vis e CLAE-DAD-EM/EM visando identificar a sua composição química.

Os cromatogramas obtidos por CLAE-UV-Vis (254 nm) do EHG e da FA (Figura 1) apresentam composições químicas semelhantes, com vários picos que foram atribuídos a presença de polifenóis com base na análise dos espectros na região do ultravioleta. Segundo Romani et al. (2011), substâncias derivadas do ácido gálico absorvem em 254 nm, enquanto os elagitaninos apresentam absorções espectrométricas, semelhantes ao ácido elágico (absorbância máxima em 254 e 366 nm).

No EHG e na fração FA foram detectados compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis na abordagem fitoquímica usando cloreto férrico. Os compostos foram identificados por CLAE-EM/EM, como ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, com base em diferentes estruturas químicas tais como ácido gálico, ácido elágico e hexahidroxidifênico-glicose (HHDP-glucose), cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 2.

Na Tabela 2 estão listados os dados de tempos de retenção (Tr), valores de absorção máxima (λ_{max}), íon molecular ($[M-H]^-$) e padrões de fragmentações EM/EM dos 11 picos de fragmentações do EHG e da FA. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com padrões autênticos quando disponíveis e dados publicados na literatura.

A fragmentação EM/EM fornece importantes informações para compostos derivados dos ácidos gálico e elágico. Assim os resultados deste estudo, demonstraram a perda de 152 e 170 Da a partir do íon molecular, indicando a presença de grupos galoil, perda de 302 Da a partir do íon molecular, que caracteriza a presença de grupos HHDP (hexahidroxidifênico); perda de grupos carboxilas (44 Da), água (18 Da), indicando a presença do grupo trisgaloil e elagitaninos C-glucosídeos, respectivamente (BARRY et al., 2001; FERNANDES et al., 2010).

A presença de elagitaninos é confirmada pelos dados que indicam a lactonização espontânea do HHDP formando o íon m/z 301, formando o ácido elágico, enquanto a lactonização parcial do HHDP forma o íon m/z 319, que sofre descarboxilação e forma o íon

m/z 275. Foi observado ainda, taninos com massas moleculares diferentes em duas unidades, devido a diferença entre um grupo HHDP ou dois grupos galoil (TAN et al., 2010).

Ácidos fenólicos. Os compostos **1** e **11** foram identificados como ácido gálico e ácido elágico, respectivamente, após comparação da fragmentação do íon molecular m/z 169 e m/z 301, respectivamente com dados da literatura e padrões autênticos

Derivados de Galotaninos e Elagitaninos. O composto **2** foi identificado como galoil-HHDP-glicose (corilagina). A fragmentação do íon molecular m/z 633 $[M - H]^-$, produziu os íons fragmentos m/z 481 (HHDP-glicose), após perder um grupo galoil e íon m/z 301, que corresponde a uma unidade de HHDP após o processo de lactonização para o ácido elágico (BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2010). O composto **3** com íon molecular m/z 481 $[M - H]^-$, seguido do íon fragmento m/z 301 (ácido elágico), após perder uma unidade de glicose foi identificado como HHDP-glicose (SANDHU; GU, 2010)

Nas amostras analisadas foram encontrados elagitaninos com $[M - H]^- m/z$ 783 e m/z 785. O composto **4** com íon molecular m/z 783 $[M - H]^-$, apresentou os íons fragmentos m/z 765 ($M - 18$ Da, após perder uma molécula de água), e m/z 481, que corresponde ao HHDP-glicose desprotonado ($M - 302$ Da, menos uma unidade HHDP) e m/z 301, que corresponde ao ácido elágico. Estes fragmentos são característicos para di-HHDP-glicose (pedunculagina).

O composto **5** com íon molecular m/z 635 $[M - H]^-$, seguido dos íons fragmentos m/z 483 $[M - H - 152]^-$, m/z 465 $[M - H - 170]^-$ e m/z 313 $[M - H - 152 - 152 - 18]^-$, indicando a perda de um grupo galoil, a perda de um ácido gálico, e a perda de um outro grupo galoil e água, juntamente com a fragmentação da glicose em um íon m/z 301, que corresponde à unidade de HHDP após lactonização para o ácido elágico. Estes fragmentos são característicos para tri-galoil-glicose (SANDHU; GU, 2010).

O composto **6** com m/z 785 $[M - H]^-$, foi identificado como di-galoil-HHDP-glicose (telimagrandina I), por apresentar os íons m/z 633 (menos um grupo galoil), m/z 483 (menos uma unidade de HHDP) e m/z 313 após perder uma unidade de HHDP, um grupo galoil e água; e m/z 301 que corresponde a uma unidade de HHDP após o processo de lactonização para o ácido elágico, seguido de uma descarboxilação (m/z 275). Esses compostos diferem em duas unidades de massa atômica do composto **4**, o que sugere um acoplamento de dois grupos galoil adjacentes em di-galoil-HHDP-glicose por oxidação intramolecular (FERNANDES et al., 2010).

O composto **7** com íon molecular m/z 469 $[M - H]^-$, seguido do íon m/z 425, após perder um grupo carboxílico (CO_2), e do íon m/z 301(ácido elágico), foi identificado como dilactona do ácido valonéico (SANZ et al., 2010; FERNANDES et al., 2010).

O composto **8** com íon molecular m/z 951 $[M - H]^-$ e seus íons fragmentos m/z 933 e m/z 915 após perdas sucessivas de molécula de água $[M - H - 18]^-$ e do íon indicando a presença do ácido elágico (m/z 301), foi identificado como galoil-HHDP-DHHDP-glicose (granatina B), esse composto faz parte do grupo de taninos tipo III (dehidroelagitaninos) (OKUDA et al., 2000; FISCHER et al., 2011).

O composto **9** com íon molecular m/z 935 $[M - H]^-$, seguido dos fragmentos m/z 633 (-302 Da, após perda um grupo HHDP), m/z 481(menos um grupo HHDP), e íon m/z 301 $[HHDP-H]^-$, seguida de uma descarboxilação (m/z 275), foi identificado como di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina) (FISCHER et al., 2011).

O composto **10** foi identificado como trigaloil-HHDP-glicose(telimagrandina II), por apresentar íon molecular m/z 937 $[M - H]^-$,seguido dos íons m/z 767 e 785 (após perder água e um grupo galoil, respectivamente), além dos íons fragmentos m/z 635 (menos um grupo HHDP), m/z 465 (menos um grupo HHDP e ácido gálico), e o íon m/z 301, que corresponde a uma unidade de HHDP após o processo de lactonização para ácido elágico, seguido de uma descarboxilação (m/z 275).A TelimagrandinaIIé produzida portransformaçãoenzimática dopentagaloilglicose.Esse composto difere da telimagrandina I por apresentar uma unidade galoil adicional ligada ao centro anoméricodonúcleoglucopiranosil(BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2010). A fragmentação dos elagitaninos encontrados na geoprópolis de *Melipona fasciculata* é ilustrada na Figura 3.

A presença de ácido gálico em geoprópolis de *Melipona compressipes* do estado do Piauí, Brasil foi demonstrada por Bankova et al. (1998), e é um dos principais constituintes em amostras de própolis de abelhas sem ferrão dos estados do Pernambuco, Paraná e São Paulo, Brasil (VELIKOVA et al., 2000).

O ácido elágico é um composto fenólico que pode ocorrer na forma livre, glicosilada ou ligado como elagitaninos, é encontrado emmorango (*Fragaria ananassa* Duch.), framboesa (*Rubus idaeus*L.), romã (*Punica granatum* L.), amora-preta (*Morus nigra*L.) e eucalipto (*Eucalyptus globules*L.). Este ácido fenólico e seus derivados (elagitaninos) têm apresentado atividades antiviral, antioxidante, anticarcinogênica,antifibrótica, quimiopreventiva (LANDETEet al., 2011) e leishmanicida (KOLODZIEJ et al., 2001).

Os compostos identificados no extrato da geoprópolis (EHG) e na fração FA foram principalmente elagitaninos. Estes compostos fenólicos são ésteres do ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e um poliol, geralmente glicose, solúveis em água, com alto

peso molecular, com capacidade de precipitação de proteínas, alcalóides e seus monômeros podem ser oxidados nas plantas e formar dímeros, trímeros e tetrâmeros com pesos moleculares de até 4000 Da. (OKUDA et al., 2000). Ressalta-se que não há na literatura dados sobre a presença de ácido elágico e taninos hidrolisáveis em amostras de geoprópolis e própolis de abelhas com ou sem ferrão.

O EHG e a FA apresentaram elevadas concentrações de polifenóis totais, alta atividade antioxidante, além do ácido gálico, elágico e taninos hidrolisáveis. A atividade antioxidante destes ácidos fenólicos apresentou CE_{50} 1,83 e 1,20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2), sugerindo que esses ácidos fenólicos sejam os responsáveis pela ação antioxidante da geoprópolis.

Estudos realizados por Zahin et al. (2010) relatam atividade antioxidante frente ao radical estável DPPH, de frutos de *Punica granatum* (romã), identificando por CLAE-EM os ácido gálico, ácido elágico, HHDP-glicose, corilagina, pedunculagina e granatina B, todos identificados neste estudo pela primeira vez em produtos de abelhas.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, ocorre pela formação de espécies de menor reatividade ou pela ação como doador de hidrogênios, dependem de sua estrutura, incluindo além da sua polaridade a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (SOARES, 2002).

A composição química e a identificação de substâncias antioxidantes são informações importantes para a compreensão das atividades biológicas da geoprópolis e para a padronização dos extratos. Além disso, a obtenção de extratos padronizados de geoprópolis agrega valor ao produto *in natura*, contribui com parâmetros para a elaboração de legislação que permita a comercialização de produtos a serem utilizados nas áreas farmacêutica e cosmética. Entretanto, são necessários mais estudos que validem os produtos de abelhas sem ferrão, em especial a geoprópolis.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de doutorado concedida. Aos meliponicultores pelas amostras de geoprópolis.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; AZEVEDO, C. C.; NOGUEIRA, A. M. C.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Polifenóis de própolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v.8, p.18-24, 2006.
- APAK, R.; GUCLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; CELIK, S.E.; BEKTASOLU, B.; BERKER K.I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v.12, p.1496-1547, 2007.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, p.361-367, 1998.
- BARRY, K.M.; DAVIES, N.W.; MOHAMMED, C. L. Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v.12, p.120–127, 2001.
- 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. **Apacta**, v.41, p.71-85, 2006.
- BASKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSHUIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 896-900, 1998.
- BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MEUDEC, E.; CHIBANE, M.; MAZAURIC, J.P.; SLIMANI, S.; HENRY, M.; CHEYNIER, V.; MADANI, K. Analysis by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.12615-12624, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERST, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebens Wissen Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, p. 1523-1527, 2009.
- CUNHA, M. S.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A. N.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de própolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, p. 31-38, 2009.
- DA 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.99, p.431–435. 2006.

DUAILIBE, 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, p.420- 423, 2007.

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

FERNANDES, A.; SOUSA, A.; MATEUS, N. CABRAL, M.; FREITA, V. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. **Food Chemistry**, v.125, p. 1398-1405, 2011.

FISCHER, U.A.; CARLE, R.; KAMMERER, D.R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, v.127, p.807-821, 2011.

GREGORIS E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 76-82, 2010.

LANDETE, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44, p. 1150-1160, 2011.

LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A., DUTRA, R.P.; ARAMYS, S.R.; 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 geoprópolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMCComplementary and Alternative Medicine**, v.11, p.1-10, 2011.

MARTINS, A.C.L.; RÊGO M.M.C; CARREIRA, L.M.M, ALBUQUERQUE, P.M.C 2011. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae) 41:183-190. **Acta Amazonica**, v.41, p.183-190, 2011.

MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollens analysis of própolis from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 3482-3485, 2008.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution. **Phytochemistry**, v.55, p.513–529, 2000.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, v.130, p. 214-221, 2012.

SANDHU, A.K.; GU, L. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 4681–4692, 2010.

SANTOS, G.M.; ANTONINI, Y. The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p.1-9, 2008.

SANZ, M.; CADAHÍA, E.; ESTERUELAS, E.; MUÑOZ, A.M.; FERNANDEZ DE SIMON, B.F.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of roasting at cooperage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 9631-9640, 2010.

SAWAYA, A. C. H. F.; CALADO, J. C. P.; SANTOS, L. C.; MARCUCCI, M. C.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. 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, 2009.

SHUAIBU, M.N.; PANDEY, K.; WUYEP, P.A.; YANAGI, T.; HIRAYAMA, K.; ICHINOSE A.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of *Leishmania* in vitro. **Parasitology Research**, v.108, p. 1333-1338, 2008.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-81, 2002.

TAN, H.P.; LING, S.K.; CHUAH, C.H. Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. **Phytochemical Analysis**. doi: 10.1002/pca.1312, 2011.

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

ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. **Mutation Research**, v.703, p. 99–107, 2010.

Tabela 1. Concentração de polifenóis totais e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da geoprópolis e frações

Amostras	Polifenóis totais (%)	Atividade antioxidante
		EC ₅₀ (µg/mL)
EHG	47,78 ± 0,04 ^b	5,24 ± 0,12 ^c
FH	6,32 ± 0,02 ^e	s/atividade
FC	20,53 ± 0,01 ^d	17,86 ± 0,05 ^a
FA	57,89 ± 0,02 ^a	3,75 ± 0,10 ^d
FHA	35,99 ± 0,04 ^c	8,81 ± 0,15 ^b
Ácido gálico [#]	-	1,83 ± 0,04 ^e
Ácido elágico [#]	-	1,20 ± 0,01 ^f

EHG, extrato hidroalcoólico da geoprópolis; FH, fração hexânica; FC, fração clorofórmica; FA, fração acetato de etila; FHA, fração hidroalcoólica. Resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3), valores com letras diferentes em cada coluna foram diferentes estatisticamente (p≤0,05).

Tabela 2. Compostos fenólicos identificados no extrato hidroalcoólico (EHG) e na fração acetato de etila (FA) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray (CLAE-DAD-ESI-EM/EM)

Composto	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	MM	[M-H] ⁻ m/z	Principais íons EM/EM (m/z)	Compostos identificados
1	11,23	272	170	169	125	ácido gálico ^b
2	19,26	262	634	633	481 301 275	galoil-HHDP-glicose ^a
3	25,60	267	482	481	301 275 169	HHDP-glicose ^a
4	27,16	265	784	783	765 481 301 275	di-HHDP-glicose ^a
5	30,53	277	636	635	483 465 313 301	trigaloil-glicose ^a
6	31,98	274	786	785	633 483 313 301 275	digaloil-HHDP-glicose ^a
7	35,62	254-370	470	469	425 301	dilactona do ácido valoneico ^a
8	39,25	280-365	952	951	933 783 301	galoil-HHDP-DHHDP-glicose ^a
9	45,08	271	936	935	633 481 301 275	di-HHDP-galoil-glicose ^a
10	51,39	277	938	937	785 767 635 465 301 275	trigaloil-HHDP-glicose ^a
11	69,88	254, 363	302	301	301	ácido elágico ^{a,b}

Tr, tempo de retenção; $\lambda_{\max}$ (nm), absorção no UV-Vis; MM, massa molecular; [M - H]⁻, íon molecular; HHDP, hexahidroxidifênico; DHHDP, dehidrohexahidroxidifênico. ^aCompostos identificados pela primeira vez em geoprópolis. ^bCo-injeção com padrões autênticos.

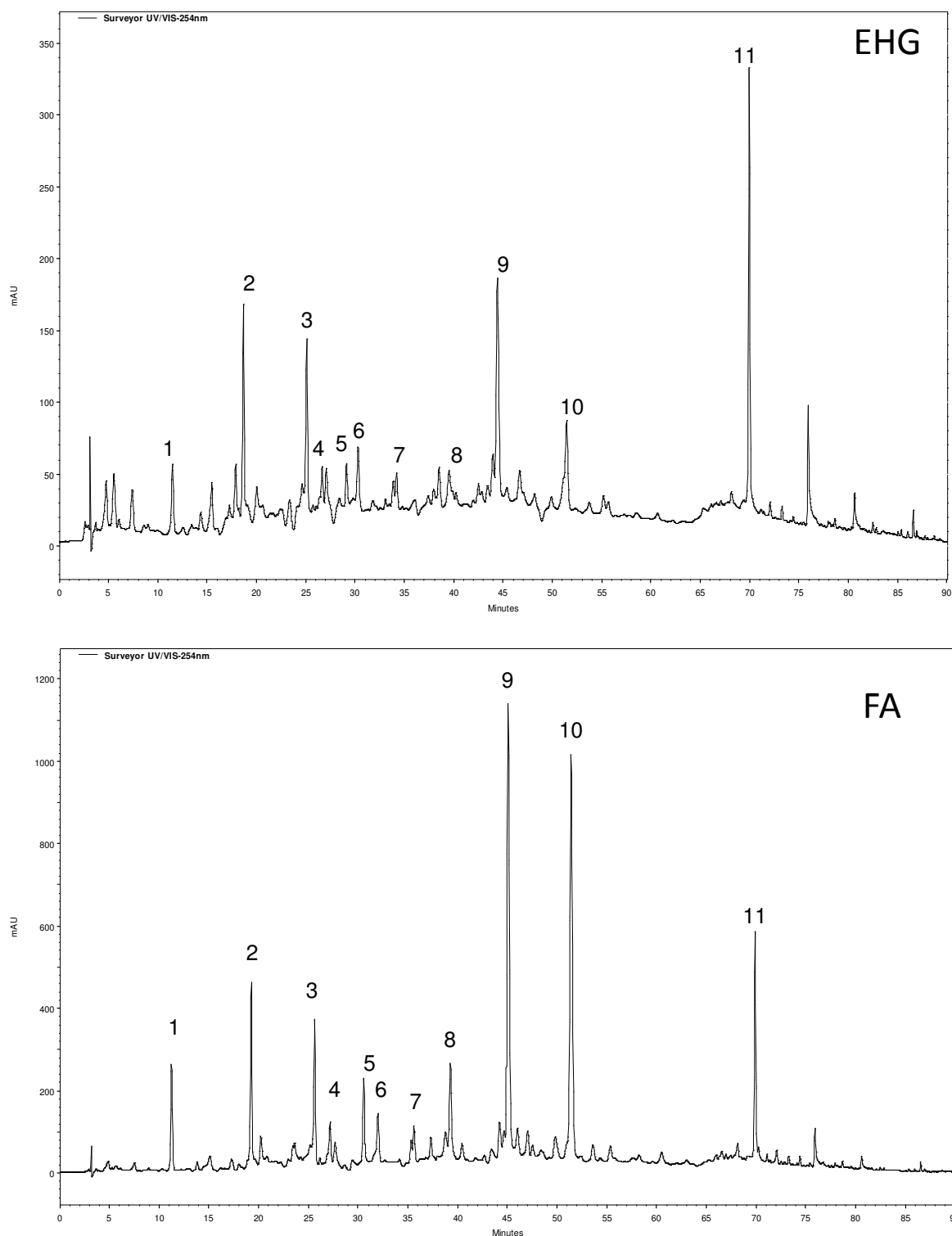


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EHG) e da fração acetato de etila (FA) em 254 nm. Ácido gálico (1), galoil-HHDP-glicose (2), HHDP-glicose (3), di-HHDP-glicose (4), trigaloil-glicose (5), digaloil-HHDP-glicose (6), dilactona do ácido valoneico (7), galoil-HHDP-DHHDP-glicose (8), di-HHDP-galoil-glicose (9), trigaloil-HHDP-glicose (10) e ácido elágico (11).

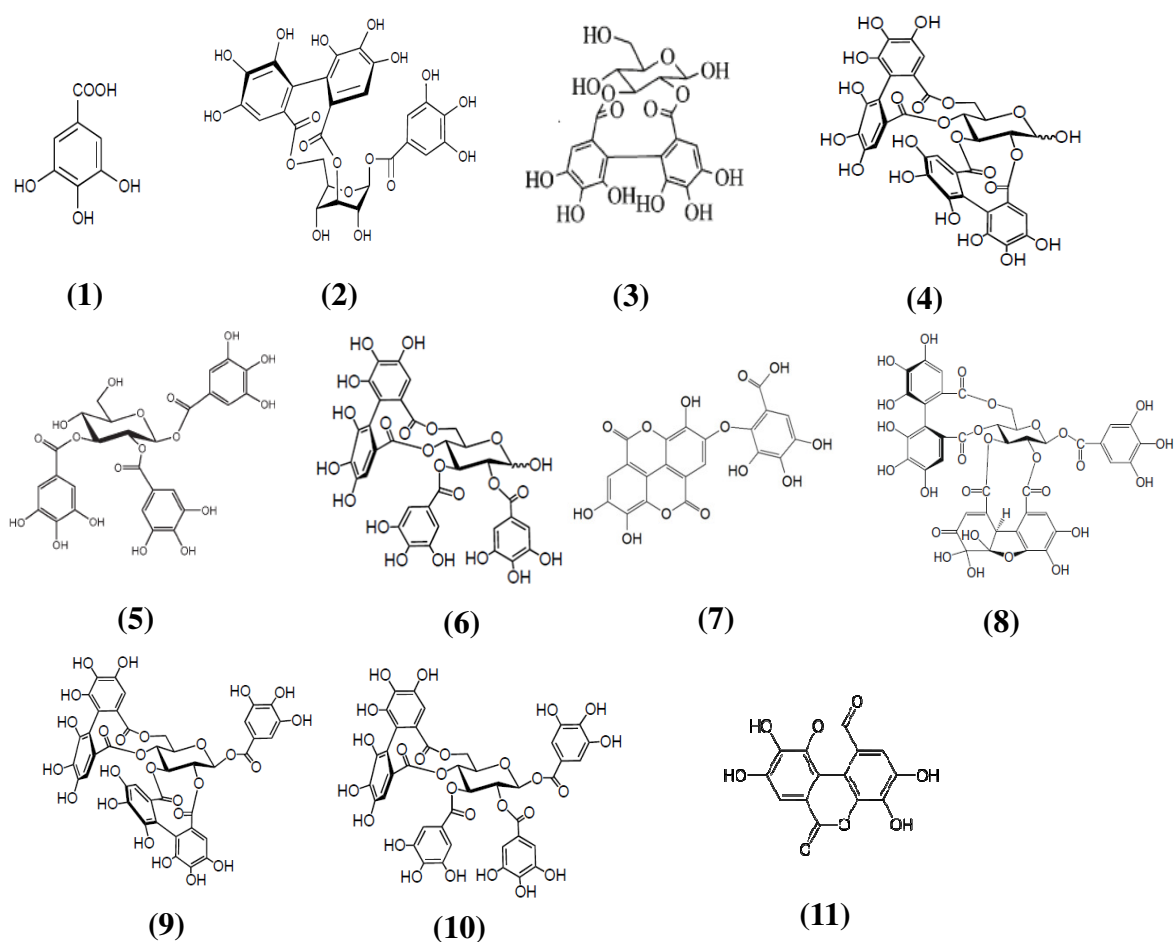


Figura 2. Estruturas químicas dos compostos fenólicos detectados na geoprópolis de *Melipona fasciculata*: Ácido gálico (1), galoil-HHDP-glicose (2), HHDP-glicose (3), di-HHDP-glicose (4), trigaloil-glicose (5), digaloil-HHDP-glicose (6), dilactona do ácido valoneico (7), galoil-HHDP-DHHDP-glicose (8), di-HHDP-galoil-glicose (9), trigaloil-HHDP-glicose (10) e ácido elágico (11).

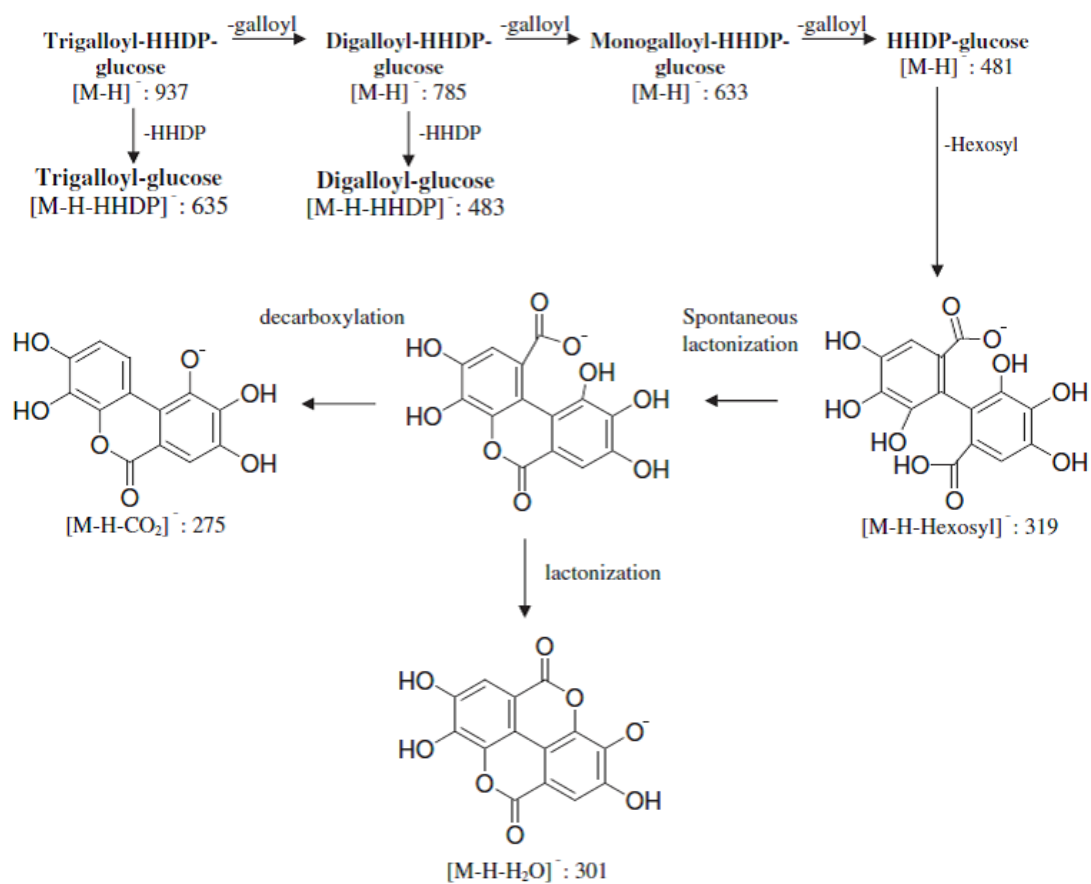


Figure 3. Fragmentações dos elagitaninos encontrados na geopropolis de *Melipona fasciculata*. HHDP, hexahidroxidifênico (Tan et al., 2011)

4.4 CAPÍTULO IV

PATENTE DEPOSITADA

“PROCESSO DE OBTENÇÃO, FORMULAÇÕES DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA GEOPRÓPOLIS BRASILEIRA DE ABELHAS SEM FERRÃO E SEU USO COMO AGENTE LEISHMANICIDA”, depositada em 05/07/2011.

RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de extratos padronizados, frações e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelhas sem ferrão, formulações de extratos padronizados, frações e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelhas sem ferrão, e o uso destas formulações como agente leishmanicida, usado no tratamento de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São apresentadas as etapas do processo de obtenção dos extratos e frações, bem como possibilidades de uso farmacêutico destes.

5. CONCLUSÕES

- Os extratos hidroalcoólicos da geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* Smith produzido em diferentes localidades do município de Fernando Falcão, estado do Maranhão apresentam características químicas e biológicas semelhantes.
- Todos os extratos hidroalcoólicos ativos contra formas promastigotas de *L. amazonensis* oriundos do Cerrado maranhense apresentaram em sua composição taninos hidrolisáveis, compostos derivados dos ácidos gálico e elágico, provavelmente os responsáveis pela atividade leishmanicida das amostras, além de ácidos orgânicos, antraquinonas, ácidos graxos, álcoois e açúcares.
- Todas as frações obtidas a partir da geoprópolis com maior ação leishmanicida foram ativas, exceto a fração hexânica (FH).
- A fração acetato de etila (FA) apresentou a maior atividade antipromastigota para *L. amazonensis*, além de apresentar elevados teores de polifenóis totais.
- O extrato hidroalcoólico da geoprópolis e as frações clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica apresentaram atividade antioxidante em ensaios *in vitro* com o radical DPPH.
- A geoprópolis de *Melipona fasciculata* é um promissor insumo na obtenção de produtos com ação leishmanicida e antioxidante.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* no estado do Maranhão, apresentou neste estudo um potencial terapêutico para o desenvolvimento de produtos com atividade leishmanicida. Este produto melipônico tem demonstrado diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva, analgésica, antitumoral, antioxidante e imunomoduladora, além de uma composição química, que varia em função da área de coleta, com predominância de compostos polifenólicos e terpênicos.

As composições químicas das amostras ativas apresentaram uma mistura de substâncias de diferentes classes químicas, principalmente ácidos fenólicos, os quais podem ser os possíveis responsáveis pelas atividades biológicas observadas, entretanto estudos complementares visando identificar o princípio ativo destas amostras são necessários.

Os dados obtidos mostram ainda que, as geoprópolis de diferentes localidades da mesma região, apresentam concentração de polifenóis e atividade leishmanicida diferentes. Essas diferenças estão relacionadas à diversidade das fontes vegetais utilizadas pelas abelhas para a elaboração da geoprópolis, reforçando que, para o maior desenvolvimento da meliponicultura é necessário preservar a vegetação do entorno, principalmente se considerarmos que estas abelhas são produtoras de alimento e importantes para o desenvolvimento da agricultura familiar no estado do Maranhão.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com dados científicos sobre a composição química e atividades biológicas da geoprópolis maranhense produzida pela *M. fasciculata*, contribuindo para a elaboração de uma legislação específica de fixação de identidade e qualidade para a geoprópolis, pois até o momento não há legislação para a comercialização de produtos melipônicos no Brasil, entre eles a geoprópolis, o que dificulta a comercialização deste produto.

Contudo, ressaltamos a importância deste trabalho por apresentar os primeiros relatos sobre atividade leishmanicida da geoprópolis, além da atividade antioxidante e composição química deste recurso natural, até o momento não aproveitado economicamente, que pode no futuro representar uma alternativa no tratamento das leishmanioses e fonte de renda para os meliponicultores.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; AZEVEDO, C. C.; NOGUEIRA, A. M. C.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Polifenóis de própolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v.8, p.18-24, 2006.
- ABREU, B.V.B. **Prospecção Química de própolis de *Melipona fasciculata* Smith**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2011.
- AMATO, V.S; PADILHA, A.R.S; NICODEMO, A.C; DUARTE, M.I.S; VALENTINI, M; UIP, D.E; BOULOS, M AND AMATO, V.N, Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, International. **Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p.153-157, 2000.
- ARAUJO, M. J. A. M; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. R.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; LIBERIO, S. A.; MACIEL, 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 Erlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.580-587, 2010.
- ARAUJO, M.A.R. Estudo sobre a atividade antiinflamatória da própolis de abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith. 2012. 78f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2012.
- ARAUJO, M.A.R.;LIBÉRIO, S.A.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 208-219, 2012.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.**International Journal of Parasitology**, v.30, p. 1269-1281, 2000.
- ASSUNÇÃO, A. K. M. **Efeito antitumoral do tratamento profilático com extrato hidroalcoólico de própolis de *Melipona fasciculata* Smith**. 2008. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2008.
- ASSUNÇÃO, A.K.M. **Efeito antitumoral do tratamento com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em modelo experimental de tumor de Ehrlich**.72f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2011.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection.**Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIOGIO, S. Effects of brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*.**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.
- AZEVEDO, C. C. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de própolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba) cultivada na região da Baixada maranhense**, 2009, 46f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2009.

BALANNA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology** v.100, n.1-2, p.114-117, 2005.

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

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.

BANKOVA, V.; R. CHRISTOV, S. POPOV, MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v.70, n.2, p.190- 193, 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. **Apacta**, v.41, p.71-85, 2006.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p. 328-337, 2004.

BATISTA, M.C.A. **Composição química e atividade antioxidante de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Palmerândia, Maranhão, Brasil.** 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2011.

BERGMAN, J.D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion on Infectious Disease**, v.11, p. 707-710, 1998.

BERGMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.27, p.916-920, 1985.

BEZERRA, J. M. D. Meliponicultura: Uma atividade essencial para a economia familiar do Trópico Úmido. In: Moura, E. G. (Org.). **Agroambiente de Transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido: Atributos, Alterações e Uso na Produção Familiar.** São Luís: UEMA, 2004, p. 61-121.

BORGES, K.S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDELI, C. A.; SOARES, A.E.E.; TONE, L.G. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, p. 310–314, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília, 2007.

BROSI, B. J. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. **Forest Ecology and Management**, v. 258, n.9, p.1830-1837, 2009.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

CANTANHEDE, D. C.; MASCENA, Z. U.; BEZERRA, J. L.; DUTRA, R. P.; COUTINHO, D. F.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Bioatividade de *Artemia salina* de extratos de própolis de *Melipona fasciculata* Smith. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.5, n.1/2, p.15, 2007.

CATANHEDE, C.C. **Avaliação da Toxicidade de Extratos Hidroalcoólicos de Própolis de *Melipona fasciculata* Smith**. 2008. 49 f. Monografia (Graduação em Farmácia-Bioquímica), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008.

COSTA, A.AU.M.L.; SALDANHA, A.C.R.; CORBETT, C.EP.; BARRAL, A.; BEZERRIL, A.C.R.; COSTA, J.M.L. Alterações ósseas causadas por *Leishmania amazonensis* na leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gazeta medica da Bahia**, v.79, p. 62-69, 2009.

COSTA, M. C. P.; BORGES, M. O. R; RIBEIRO, M. N. S. Química e Farmacologia do mel e própolis da Tiúba. Teresina, In: REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 5, 2004, Teresina. (**Mesa Redonda**), Terezina, 2004.

COSTA, M.C.P.; CAMARA, A.L.; RIBEIRO, M.N.S.; SANTOS, D.M.S.; BORGES, M.O.R.; DUTRA, R.P.; OLIVEIRA, A.R.; MACHADO, J.L.; ARAÚJO, O.C.; MELO, W. Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) para preparação de Formulações farmacêuticas de ação analgésica, antiinflamatória e cicatrizante. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, PI1102701-0A2, 11/06/2011.

CROFT S, COOMBS G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v.19, p. 502–508, 2003.

CUNHA, M. S.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A. N.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de própolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, n. 3, p. 31-38, 2009.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JR, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 142-144, 2000.

DE SOUZA W. Na introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, p. 822-838, 2008.

DUAILIBE, 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, 2007.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H.; OZER, B. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitology Research**, v.102, p.1217–1225, 2008.

DURAN, N.; MUZTAFI, M.; CULHA, G.; DURAN, G.; OZER, B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. **Parasitology Research**, v.108, p. 95-105, 2011.

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

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG, D. 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, 2009.

FARNESI, A.P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos**. 2007. 89 f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Genética), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, p.173-182, 2001.

FREZARD, F.; LAGO, EL.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of Leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p. 913-916, 2001.

GOMES, V. A. **Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do própolis de *Melipona compressipes fasciculata* (Tiúba)**. 2005, 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2005.

GOMES, V. A.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, E.C.; SANTANA, E. R.; BARROS, F. E. R.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R.; RIBEIRO, M. N. de S. Estudos das atividades antiinflamatórias e antinociceptiva da própolis de *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Tiúba). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, São Luís. **Anais...** São Luís: UFMA/PIBIC/CNPq, 2003, p.162.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p. 71-80, 2003.

GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46, p.111- 121, 1991.

GRIMALDI, G. R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230–250, 1993.

GUZMÁN, J.F.P., **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das própolis produzidas no Perú**. 2005. 70f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

KERR, W. E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, própolis e cera. **Informe Agropecuário**, v.13, n. 149, p.15-27, 1987.

- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. E; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçú - Biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú, 144p., 1996.
- KRAMP, K.L; DEWITT, K; FLORA, J.W; MUDDIMAN, D.C; SLUNT, K.M.;HOUSTON, T.A., Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p.695-698, 2005.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. U; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.**Journal Ethnopharmacology**, v.64, p.235-240, 1999.
- LIBÉRIO, S. A. **Efeitos da própolis de *Melipona fasciculata* sobre a microbiota cariogênita: prospecção de um produto**. 2010, 129p. Tese doutorado (Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.
- LIBÉRIO, S.A.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO,V.; RIBEIRO, M.N.S. Composições farmacêuticas e odontológicas à base de geoprópolis e uso dessas composições. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, PI 0905583-5 A2, 22/12 2009.
- LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A., DUTRA, R.P.; ARAMYS, S.R.; 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, p.1-10, 2011.
- MACHADO, G.M.C.; LEON, L L.; CASTRO, S.L. Activity of brazilian and bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 73-77, 2007.
- MACHADO, J. L. **Estudo das atividades antiinflamatória e antinociceptiva do própolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba)**. 2008, 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2008.
- MACIEL, A. A. B. **Atividade antimicrobiana da própolis e própolis contra periodontopatógenos**. 2005, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2005.
- 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, 2008.
- MARKHAM, R.K.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v.42, p. 205-211, 1996.
- MARTINS, A.C.L.; RÊGO MMC, CARREIRA LMM, ALBUQUERQUE PMC 2011. Espectro polínico de mel de tiúba(*Melipona fasciculata*Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). **Acta Amazonica**, v.41, p.183-190, 2011.

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, p. 913-920, 2003.

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.

MUNIZ, F. H. A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste, diversidade e estrutura . In: Moura, E. G. (Org.). **Agroambiente de Transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido**: Atributos, Alterações e Uso na Produção Familiar. São Luís: UEMA, 2004, p. 44-60.

MURRAY, H.W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p. 2185-2197, 2001.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NOGUEIRA, A. M. C. **Determinação de caracteres físicos, químicos e físico químicos de amostras de própolis de *Melípona fasciculata* Smith (tiúba) e própolis de *Scaptotrigona* sp. (tubí) cultivadas em municípios do Cerrado maranhense**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2008.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 446p., 1997.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/> Acesso 20 Fev 2011.

OLIVEIRA, M.C.; AMORIM, R.F.B.; FREITAS, R.A.; COSTA, A.L.L. Óbito em caso de leishmaniose cutâneo-mucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p. 258-260, 2005.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v.9, p.323-328, 1993.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v.7, p.257-266, 2004.

OZBILGE, H.; KAYA, E.G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, p. 556-560, 2010.

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

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

PINO, J.A.; MARBOT, R.; ZUMÁRRAGA, A.D.C.; SAURI, E. Volative constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatán. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.53-56, 2006.

PONTIN, K; DA SILVA FILHO, A.A.; SANTOS, F.F.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.A. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, p. 487-492, 2008.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v.26, p. 550-553, 2003.

REBÊLO, J.M.M.; OLIVEIRA, S.T.; BARROS, V.L.L.; SILVA, F.S.; COSTA, J.M.L.; FERREIRA, L.A.A.; SILVA, A.R. Flutuações dos flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em área de colonização recente do Município de Buriticupu, Amazonia maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 45, p. 11-16, 2001a.

REBÊLO, J.M.M.; OLIVEIRA, S.T.; SILVA, F.S.; COSTA, J.M.L. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the Amazonia of Maranhão. V. Seasonal occurrence ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Biologia**, v.61, p.107-115, 2001b.

RÊGO, M. M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; VENTURIERI, G. Menos locais para ninhos. **Ciência Hoje**, v.41, p. 50 - 51, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p.514-535, 2005.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v.55, p. 453-483, 2001.

SANTOS, J. R. **Substâncias flavonoídicas e fenólicas do extrato hidroalcoólico de geopropolis de *Melipona fasciculata***. 2010, 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2010.

SANTOS, N.C. **Avaliação da toxicidade de amostras de propolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense frente à *Artemia salina***. 2008, 50 f. Monografia. (Graduação em Farmácia-Bioquímica), Universidade Federal do Maranhão, 2008.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.C.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v.5, p.1-10, 2011.

SAWAYA, A. C. H. F.; CALADO, J. C. P.; SANTOS, L. C.; MARCUCCI, M. C.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. 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, 2009.

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, p.398-407, 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, p.93-103, 2007.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056-1069, 2011.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular Sb-V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p. 3971-3976, 2001.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002, 253p.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.; ALVES, R. M. O.; DIAS, C.S.; CLARTON, L. Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa. Série Meliponicultura, Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 46 p. 2009.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v.347, p.1739–1746, 2002.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 1352–1364, 2006.

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

URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v.114, p. 91-99, 1997.

UMTHONG, P. PHUWAPRAISIRISAN, S. PUTHONG AND C. CHANCHAO, *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p. 37–45, 2011.

UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. **American Journal of Chinese Medicine**, v.37, p.855-865, 2009.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, p.421-428, 2005.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from brazilian meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.55c, p.785 – 789, 2000a.

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

VELTHUS, H. H. W.; CORTOPASSI-LAURINO, M; PEREBOM, Z.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L..The conservative egg of the genus *Melipona* and its consequence for speciation.In: G.A.R.Melo; I. A dos Santos. **Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**.Editora UNESC, Criciúma, p. 171-176, 2003.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis.**Clinics in Dermatology**,v.14, p. 433-450, 1996.

WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S. Feral honey bee in the Sonoran Desert: propolis sources other than Poplar (*Populus* spp.). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p.530–535, 1997.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 39925-39932, 2004.

ANEXO A- Espectros de massas obtidos por CLAE-DAD-ESI-EM/EM do extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

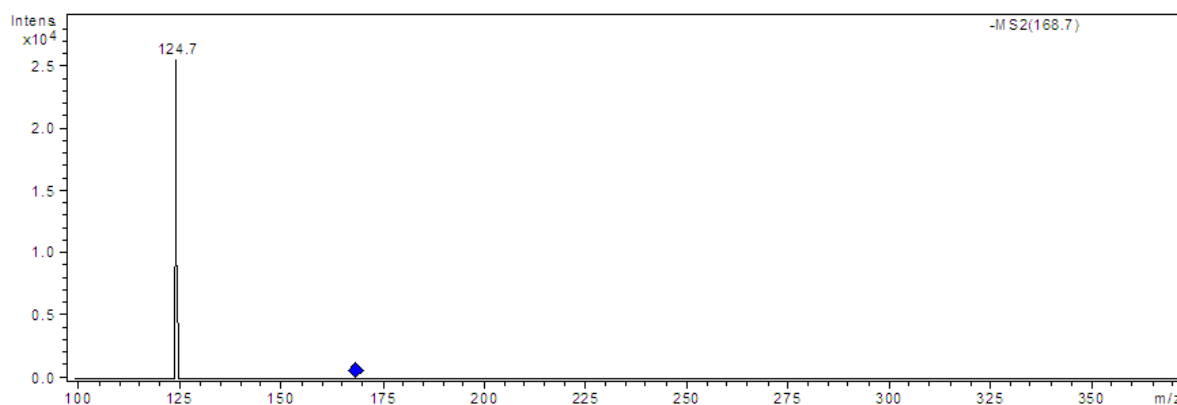


Figura 1. Espectro de massas do ácido gálico (1) ($[M-H]^-$ m/z 169) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM, em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

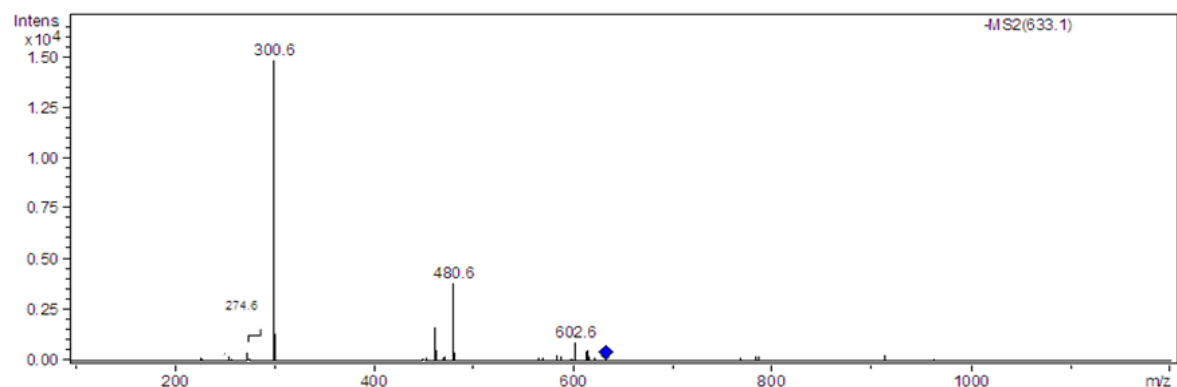


Figura 2. Espectro de massas do galoil-HHDP-glicose (corilagina) ($[M-H]^-$ m/z 633) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

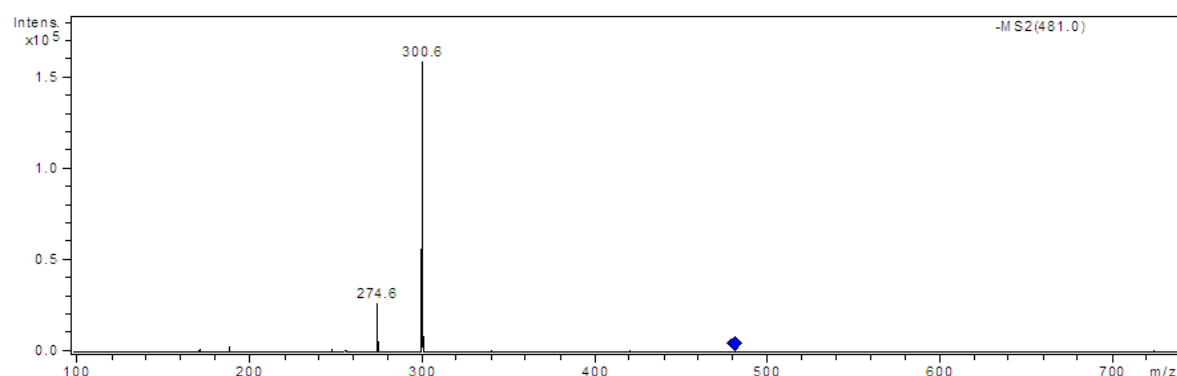


Figura 3. Espectro de massas do HHDP-glicose ($[M-H]^-$ m/z 481) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

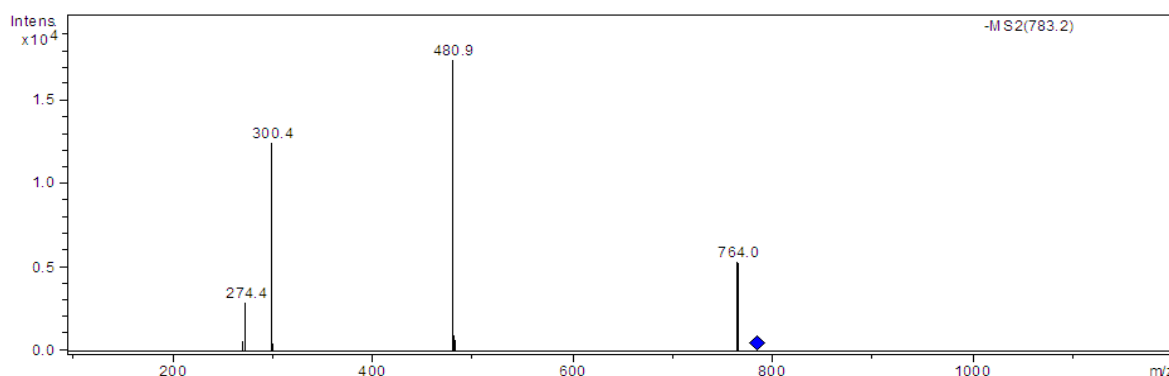


Figura 4. Espectro de massas do di-HHDP-glicose (pedunculagina) ($[M-H]^-$ m/z 783) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

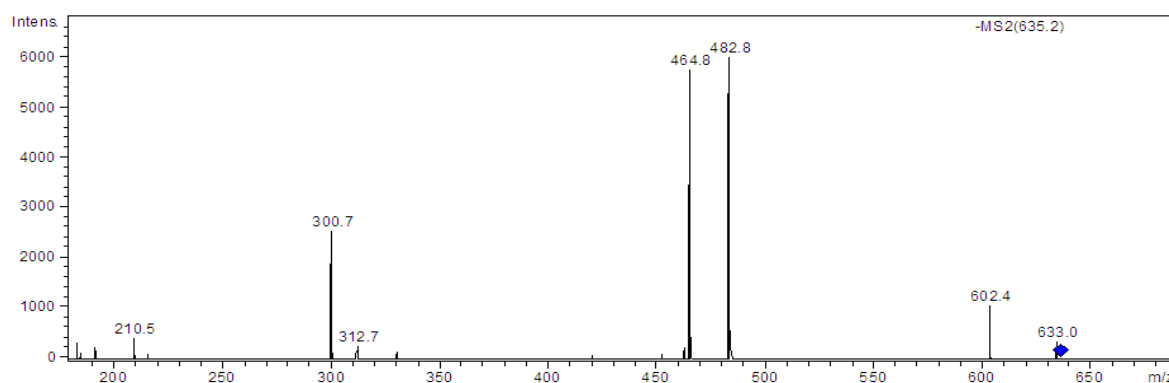


Figura 5. Espectro de massas do trigalol-glicose ($[M-H]^-$ m/z 635) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

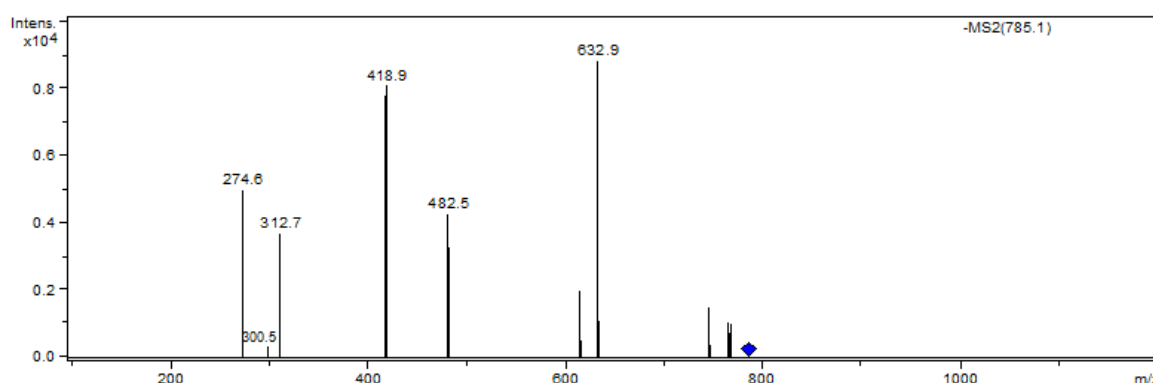


Figura 6. Espectro de massas do digalol-HHDP-glicose (telimagrandina I) ($[M-H]^-$ m/z 785) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

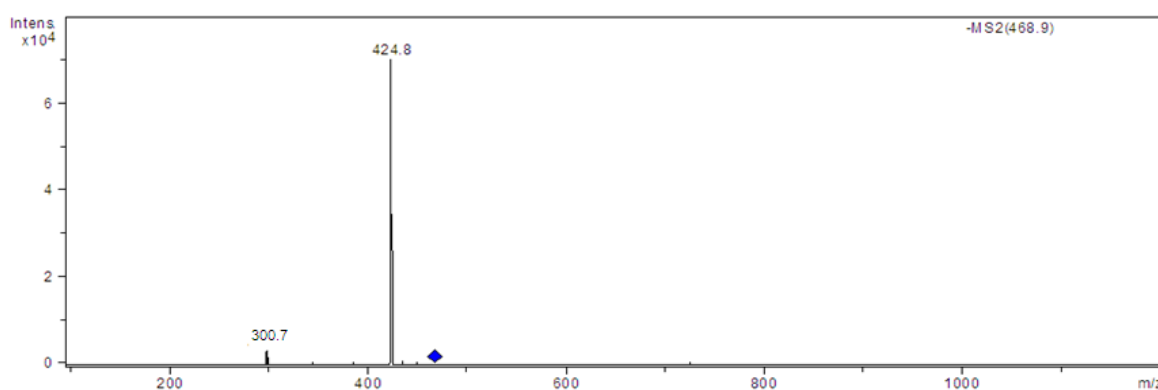


Figura 7. Espectro de massas do dilactona do ácido valonéico ([M-H]⁻ m/z 469) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

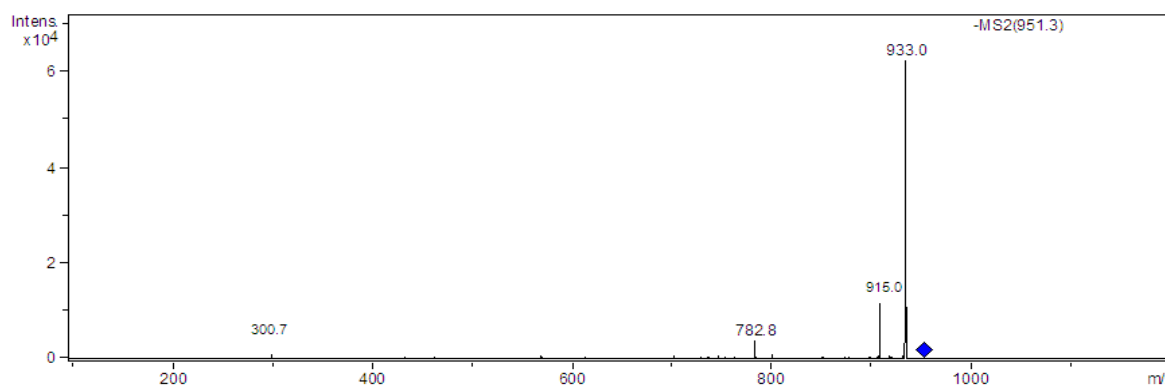


Figura 8. Espectro de massas do galoil-HHDP-DHHDP-glicose (granatina B) ([M-H]⁻ m/z 951) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

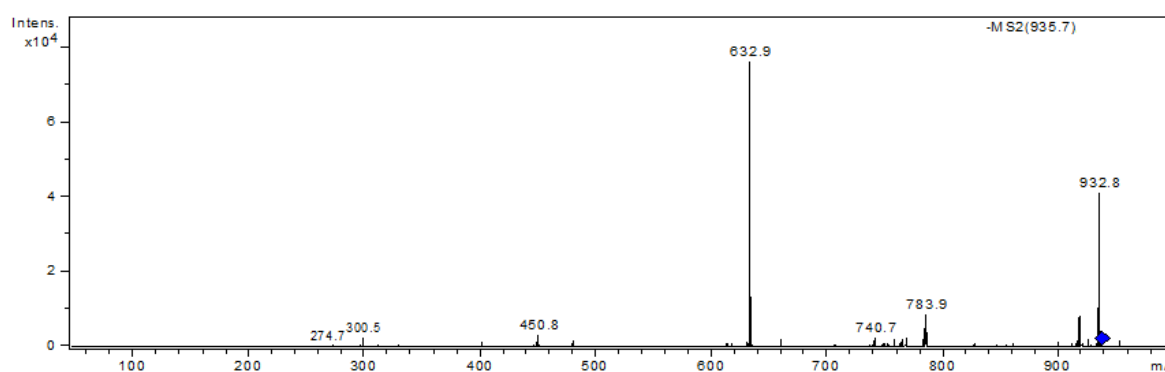


Figura 9. Espectro de massas do di-HHDP-galoil-glicose (casuarictina) ([M-H]⁻ m/z 935) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

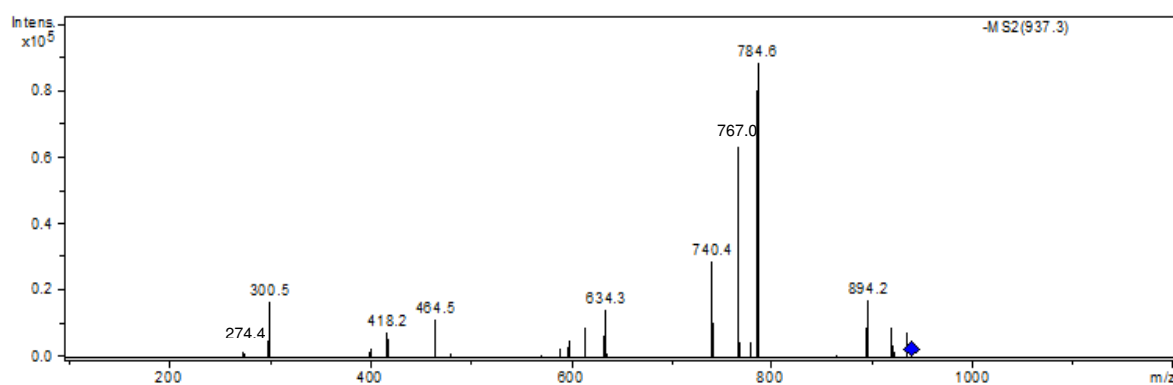


Figura 10. Espectro de massas do trigaloil-HHDP-glicose (telimagrandina II) ($[M-H]^-$ m/z 937) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

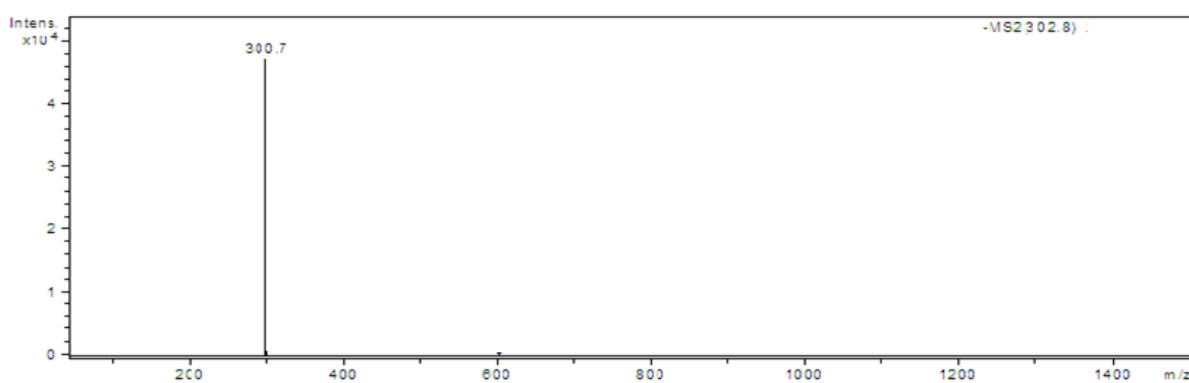


Figura 11. Espectro de massas do ácido elágico ($[M-H]^-$ m/z 302) por CLAE-DAD-ESI-EM/EM em modo negativo obtido do extrato hidroalcoólico da geoprópolis

ANEXO B - Formulário de Depósito de Pedido de Patente

< Uso exclusivo do INPI >


 5 JUL 15 3 1 000065
 Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 1.2 Qualificação: AUTARQUIA FEDERAL
 1.3 CNPJ/CPF: 06279103/0001-19
 1.4 Endereço Completo: AV. DOS PORTUGUESES, S/N, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO BACANGA
 1.5 CEP: 65085-580 1.6 Telefone: (98) 33018716 1.7 Fax:
 1.8 E-mail: gilvanda@pq.cnpq.br

☒ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):
 "PROCESSO DE OBTENÇÃO, FORMULAÇÃO DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÃO E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA GEOPRÓPOLIS BRASILEIRA DE ABELHA SEM FERRÃO E SEU USO COMO AGENTE LEISHMANICIDA"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: RICHARD PEREIRA DUTRA 6.3 CPF: 845142643-34
 6.2 Qualificação: MESTRADO
 6.4 Endereço completo: RUA 02 DO PIQUIZEIRO, CASA 02, CRUZEIRO DO ANIL, SÃO LUÍS-MA
 6.5 CEP: 65060-480 6.6 Telefone: (98) 88017856 6.7 Fax:
 6.8 E-Mail: richarddutra@ufma.br; richarddutra@oi.com.br

☒ continua em folha anexa


Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
☐ Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	01 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	10 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	04 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☐	11.7 Desenhos	fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	01 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) ANEXOS REFERENTES AOS INTENS 1 E 6				02 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 18 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

SÃO LUÍS 05/09/2011

Local e Data

Dr. Natalino Salgado Filho
REITOR

Mat UFMA-3525-4

Mat STAPE-4085-4-8
Assinatura e Carimbo



ANEXO C- Artigo publicado no Journal of Ethnopharmacology

The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci.

Journal of Ethnopharmacology 2009; 125(1):1–9.



Review

The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci

Silvana A. Libério^{a,b,*}, Antônio Luís A. Pereira^b, Maria José A.M. Araújo^a, Richard P. Dutra^d, Flávia R.F. Nascimento^{a,c}, Valério Monteiro-Neto^{c,e}, Maria Nilce S. Ribeiro^d, Azizedite G. Gonçalves^c, Rosane N.M. Guerra^{a,c}

^a Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil

^b Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil

^c Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil

^d Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil

^e Centro Universitário do Maranhão, CEP 65075-120 São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2009

Received in revised form 24 April 2009

Accepted 26 April 2009

Available online 5 May 2009

Keywords:

Propolis

Streptococcus mutans

Dental caries

Cariostatic agent

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance made by bees. It possesses many biological activities, and many studies have reported its potential application in the control of dental caries. However, variability in the chemical composition of propolis is a potential problem in its quality control, especially since propolis has already been incorporated into products for oral use. Therefore, a critical analysis of the available data on propolis is warranted. The present review discusses the *in vitro* and *in vivo* studies published in the period between 1978 and 2008 regarding the effects of propolis on *Streptococcus mutans* growth, bacterial adherence, glucosyltransferase activity, and caries indicators. Several investigations carried out with crude propolis extracts, isolated fractions, and purified compounds showed reductions in *Streptococcus mutans* counts and interference with their adhesion capacity and glucosyltransferase activity, which are considered major properties in the establishment of the cariogenic process. Data from *in vivo* studies have demonstrated reductions in *Streptococcus mutans* counts in saliva, the plaque index, and insoluble polysaccharide formation. These findings indicate that propolis and/or its compounds are promising cariostatic agents. However, the variation in the chemical composition of propolis due to its geographical distribution is a significant drawback to its routine clinical use. Thus, further studies are needed to establish the quality and safety control criteria for propolis in order for it to be used in accordance with its proposed activity.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Chemical composition of propolis	2
3. Development of caries	3
4. Propolis as a promising anticariogenic agent	3
4.1. Inhibition of MGS growth	3
4.2. Inhibition of glucosyltransferase activity	5
4.3. Effects of chemical fractions of propolis extract on MGS and glucosyltransferase activity	5
4.4. Cariostatic effects of the compounds present in propolis	5
4.5. <i>In vivo</i> studies	6
5. Trends for future research	6
6. Conclusions	7
Acknowledgments	7
References	7

Abbreviations: MGS, mutans group streptococci; BHI, brain heart infusion; GTF, glucosyltransferase; EE, ethanolic extract; MBC, minimum bactericidal concentration; MIC, minimum inhibitory concentration; HX, hexane; CHL, chloroform; EA, ethyl acetate; ET, ethanol; BUT, *n*-butanol; EEP, ethanolic extract of propolis; EP, extract of propolis.

* Corresponding author. Tel.: +55 98 2109 8548.

E-mail address: siliberio@hotmail.com (S.A. Libério).

1. Introduction

The investigation of natural products with antimicrobial activity has attracted the attention of many researchers, motivated mainly by the increasing bacterial resistance to traditional antimicrobial agents (Cragg et al., 1997; Normark and Normark, 2002; Sheldon, 2003) and the side effects frequently observed after the use of antibiotics (Cunha, 2001; Gleckman and Czachor, 2000).

Among those natural products, propolis has been considered a good candidate for an adjuvant in the treatment or prevention of many infectious diseases. Propolis is relatively non-toxic (Burdock, 1998; Cuesta et al., 2005; Jasprica et al., 2007) and displays a wide range of antimicrobial activity against a variety of bacteria, fungi, parasites, and virus (Grange and Davey, 1990; Dobrowolski et al., 1991; Amorós et al., 1992; Serkedjieva et al., 1992; Higashi and de Castro, 1994; Bankova et al., 1995; Steinberg et al., 1996; Kujumgiev et al., 1999; Sforzin et al., 2000; Ito et al., 2001; Orsi et al., 2005; Freitas et al., 2006). The use of propolis by man dates back to ancient times, when the product was employed in the embalming of bodies in Egypt (Ghisalberti, 1979).

In addition to an antimicrobial activity, other biological and pharmacological properties have also been demonstrated for propolis, including anti-inflammatory, antitumor, cytotoxic, hepatoprotective, antioxidant, hematostimulative, and immunomodulatory properties (Banskota et al., 2000; Ahn et al., 2004; Orsolic and Basic, 2005; Sforzin, 2007).

Dental caries is an infectious disease of worldwide public health concern, especially in developing countries. It is characterized by the colonization and accumulation of oral microorganisms on dental surfaces, resulting in the formation of dental plaque (or bacterial biofilm) and demineralization of the tooth structure (Selwitz et al., 2007). Many bacteria have been described in association with the cariogenic process, especially large populations of acidogenic and aciduric bacteria, such as *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus*, which are capable of demineralizing enamel by producing an acidic environment (Loesche, 1986; Leverett et al., 1993; Marsh, 1999; Featherstone, 2000).

Thus, control of the bacterial biofilm on teeth is essential to the maintenance of oral health, and can be achieved by proper oral hygiene, use of fluoride products, and regular check-ups with a dentist (Berkowitz, 2003; Selwitz et al., 2007). An additional approach is the application of chemical agents with antimicrobial activities on dental surfaces to promote a reduction in biofilm formation. Such agents have been frequently prescribed as adjuvants in the prevention or treatment of oral diseases because they can inhibit bacterial colonization, growth, and metabolism, and consequently interrupt the formation of mature biofilm, changing it at biochemical and ecological levels (Featherstone, 2000; Twetman, 2004; Paraskevas, 2005; Zhan et al., 2006; Selwitz et al., 2007).

Of the available antiseptics, chlorhexidine digluconate is the most studied and most recommended agent for use in the oral cavity (Bouwisma, 1996). However, in spite of its significant *in vitro* antimicrobial activity on cariogenic microorganisms (Jarvinen et al., 1993; McDermid et al., 1987), the use of chlorhexidine digluconate in Dentistry is still controversial because of some local side effects. Additionally, data from several studies have shown that its role in caries prevention is inconclusive (Autio-Gold, 2008).

It was previously demonstrated in rats that dental caries can be significantly reduced by propolis, which suggests its potential adjuvant effect in the control of dental caries (Ikono et al., 1991). Since that study, interest in the use of propolis against a number of oral pathogens has grown significantly (Park et al., 1998; Steinberg et al., 1996; Koo et al., 2000a, 2002b; Duarte et al., 2003; Gebara et al., 2003; Hayacibara et al., 2005; Orsolic et al., 2005; Bruschi et al., 2006; Kuru et al., 2007). Moreover, significant advances in other areas have contributed to our understanding of the chemical com-

position and variability of propolis, its pharmacological properties, and its biological activities, all of which are relevant in the treatment of oral diseases (Bankova, 2005a,b; Sforzin, 2007). This review focuses on the therapeutic application of propolis in the control of dental caries, especially on *mutans* group streptococci (MGS).

The Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Medline, Web of Science, PubMed, Highwire and Lilacs databases were searched for articles published in English from 1978 to 2008. The search terms were “*Streptococcus mutans*”, “propolis”, “dental caries”, “natural products”, “oral bacteria”, and “antimicrobial activity”.

2. Chemical composition of propolis

Propolis results from the addition of the mandibular secretions of bees to resins collected by these insects from different parts of plants. It is a structurally complex resinous, gum-like balsamic substance, which contains approximately 50–55% resins and balsams, 30% wax, 10% volatile oils, 5% pollen, and 5% other substances that vary according to the flora of the region and the bee species. Inside the hive, propolis is used by bees to line internal walls and seal possible openings to allow thermal control of the colony and prevent the entry of other insects. In addition, propolis is used to embalm dead insects and to prevent the proliferation of microorganisms in the colony (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998).

The chemical composition of propolis is highly variable and complex, due to the biodiversity of the vegetation of each region visited by bees (Koo et al., 1999; Kujumgiev et al., 1999; Sforzin et al., 2000; Velikova et al., 2000; Bankova, 2005a; Salatino et al., 2005; Katircioglu and Mercan, 2006; Melliou and Chinou, 2004; Mohammadzadeh et al., 2007). Although there are a few exceptions, the main source of propolis in temperate zones is the bud exudate of *Populus* species (Poplar). This has been concluded from studies carried out with propolis from Europe (Nagy et al., 1986; Greenaway et al., 1987; Bankova et al., 1992), North America (García-Viguera et al., 1993), New Zealand (Markham et al., 1996), and Asia (Bankova et al., 1992). However, samples of European propolis that were not of poplar origin have also been described (Bankova et al., 2002).

On the other hand, in tropical regions where there are no poplars, bees find other plant sources for propolis production. In the Sonoran Desert, *Ambrosia deltoidea* has been considered the plant source (Wollenweber and Buchmann, 1997). Some compounds detected in propolis samples from Venezuela were identical to components detected in *Clusia* species (Guttiferae), indicating that they are the source of propolis production in that country (Tomas-Barberan et al., 1993). In southeast Brazil, *Araucaria* spp. (Bankova et al., 1996) and *Baccharis* spp. (Marcucci et al., 1998) were described as the putative plant sources for propolis.

Therefore, the composition of propolis from different phyto-geographical areas are expected to vary and as a consequence, the intensity or presence of some biological activities also varies (Katircioglu and Mercan, 2006; Mohammadzadeh et al., 2007). However, even within the same country the propolis composition may be qualitatively and quantitatively different depending on the region and period of its collection (Koo et al., 1999). In Brazil, for instance, some authors have reported that propolis from distinct regions were chemically classified into 12 types (Park et al., 2002).

Among the numerous groups of substances identified in propolis samples from different localities, the most common are aromatic acids and esters, chalcones, flavonoids, terpenoids, and waxy acids. Most of the biological activities of propolis have been attributed to these compounds, especially the flavonoids (Marcucci, 1995; Marcucci et al., 2001; Park et al., 2002; Bankova, 2005b; Salatino et al., 2005; Silva et al., 2006; Trusheva et al., 2006). In this regard, antimicrobial activities have usually been attributed to flavonoids as well. However, other components present in propolis, such as

derivatives of aromatic acids and esters, terpenoids, and waxy acids may also exhibit inhibitory actions on microorganisms (Burdock, 1998; Banskota et al., 2001; Duarte et al., 2005).

According to Koo et al. (1999), data on variations in the composition of propolis contents, especially the flavonoids, are important considerations in the manufacture of oral hygiene products, since many countries do not have any kind of chemical standardization to use in the quality control. In this context, the chemical variability of propolis in different countries may be considered an important obstacle for the implementation of an international standardization. According to Bankova (2005a), standardization could be possible if the plant source and the chemical profile were taken into account.

3. Development of caries

Dental caries is caused by the interaction of multiple factors related to host, microorganisms, substrate, and time, all of which are highly relevant to the establishment of the disease. Dental caries is characterized by the loss of teeth minerals, namely hydroxyapatite, due to the action of organic acids produced during bacterial fermentation. A diet rich in fermentable carbohydrates, mainly sucrose, leads to the formation of a cariogenic dental biofilm, which consists of a structured and non-calcified aggregate of microorganisms embedded in an organic matrix formed by substances from the host saliva and diet (Gibbons and Houte, 1975; Hamada and Slade, 1980; Selwitz et al., 2007).

Thus, oral microorganisms present in the dental biofilm are considered crucial for the initiation and progression of caries. In addition, the presence of suitable substrates and physiological conditions in the host is necessary to allow the implantation and survival of these microorganisms and facilitate the development of caries (van Houte, 1994; Asokan et al., 2008; Farsi, 2008).

Besides *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus* spp., other microorganisms have cariogenic potential and are also found in the biofilm. These other microorganisms include *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, non-mutans streptococci, *Propionibacterium*, and *Rothia*, among others. However, *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. are more acidogenic and aciduric, having exhibited cariogenic activity in animal assays and a positive correlation with caries activity in humans (van Houte, 1980; Loesche, 1986; Leverett et al., 1993). Since “mutans group streptococci” are involved in the initiation and clinical evolution of caries, they are the major target in studies of control and prevention of the disease.

The term “mutans group streptococci” refers to various intimately related *Streptococcus* species that were initially described as distinct serotypes of *Streptococcus mutans* and associated with the initial establishment of caries. This designation is now limited to serotypes c, e, and f, which are more commonly isolated from the oral biofilm in humans. The second most prevalent species in man is *Streptococcus sobrinus*, previously called serotype a, and the third most common species is *Streptococcus cricetus* (Coykendall et al., 1976; Holtta et al., 1994; Islam et al., 2007).

MGS have ecological advantages in the presence of sucrose from which they synthesize extracellular polysaccharides that enhance bacterial adhesion to teeth. These polysaccharides contribute to the accumulation of cariogenic microorganisms and confer an increased capacity for diffusion to the dental biofilm. Polysaccharides such as water-insoluble glucans are synthesized by the action of specialized bacterial enzymes called glucosyltransferases (Gibbons and Houte, 1975; Hamada and Slade, 1980).

In order to prevent many oral diseases, biofilm control is carried out by its regular mechanical removal and by oral hygiene. In addition, antimicrobial agents may be used to further inhibit biofilm

development and consequently, prevent dental caries (Zanella et al., 2002; Noack et al., 2004; Twetman et al., 2004; Zhan et al., 2006). In this context, the maintenance of balance in the oral microbiota is also important because many oral microorganisms possess beneficial properties and are associated with health (Marsh, 1991). Besides using antimicrobial agents to control cariogenic bacteria, suppressing their mechanisms of virulence could also be an interesting and promising approach since it would not cause profound alterations in the oral microbiota (Li et al., 2008; Nascimento et al., 2008).

Chlorhexidine, triclosan, thymol, and cetylpyridinium chloride have been used as oral antiseptics in cariology (Bouwisma, 1996; Paraskevas, 2005). Of these antiseptics, chlorhexidine is generally accepted as the gold standard agent for the prevention or treatment of oral diseases. It is usually more effective against gram-positive microorganisms, including MGS, which are particularly sensitive to chlorhexidine. Chlorhexidine acts on the bacterial cell membrane to alter the osmotic equilibrium and to change its structure, consequently extruding the membrane. Formation of vesicles and precipitation of cytoplasm can also occur. Additionally, chlorhexidine is capable of inhibiting the production of essential enzymes, such as glucosyltransferases (Scheie and Kjeilen, 1987; Paraskevas, 2005).

According to some authors, chlorhexidine is an effective antiseptic for the reduction of biofilm and MGS salivary levels as well as the treatment of gingivitis (McDermid et al., 1987; Scheie and Kjeilen, 1987; Jarvinen et al., 1993; Zanella et al., 2002; Paraskevas, 2005). However, routine use of chlorhexidine is not advisable due to local side effects such as discoloration of teeth, tongue, restorations, and dentures, soreness of the oral mucosa, and irritation of taste buds (Twetman, 2004; Paraskevas, 2005). In a recent review, Autio-Gold (2008) argued that studies on the use of chlorhexidine rinses, gels, and varnishes for preventing caries were inconclusive. Therefore, chlorhexidine should not be recommended for this purpose.

4. Propolis as a promising anticariogenic agent

To be considered a good oral antiseptic for caries prevention, a product should possess certain important properties, including: (1) an ability to interfere with one or more steps of caries development, (2) non-toxicity to host cells, and (3) lasting residual activity. Furthermore, it is essential that the product does not cause a significant imbalance in the oral microbiota. The available studies have demonstrated that propolis (or its fractions) may fulfill requirements (1) and (2). However, there are no conclusive studies regarding the duration of its antimicrobial effects.

The characteristics of some studies carried out with propolis and the potential application of propolis in the control of caries are summarized in Table 1 and discussed below. It should be noted that most *in vitro* and *in vivo* studies on propolis and MGS were carried out in Brazil, probably because some types of Brazilian propolis display significant activity on MGS, as previously demonstrated (Park et al., 1993; Koo et al., 2000a,b).

4.1. Inhibition of MGS growth

Numerous studies have demonstrated an *in vitro* inhibition of MGS growth by propolis from different localities worldwide (Ikano et al., 1991; Steinberg et al., 1996; Park et al., 1993; Koo et al., 2000a; Sawaya et al., 2004; Uzel et al., 2005; Duarte et al., 2006; Alencar et al., 2007). Most of the *in vitro* studies reported the inhibitory activity on the basis of the agar diffusion method. However, these studies produced variable results, which may be due to the chemical variability of propolis (as discussed above), the concentration of propolis in the extract, and the solvent used for extraction (ethanol,

Table 1

Major studies with propolis and mutans group streptococci from 1991 to 2007.

Origin of propolis	Bacteria	Type of extract	Antimicrobial activity assay	Other activities investigated						Reference
				Acid production	Glucan formation	Bacterial adhesion	GTF activity ^a	Caries in rats	Bacterial counts after mouth rinse	
China and Japan	<i>Streptococcus sobrinus</i> G715, <i>Streptococcus mutans</i> JS-14, <i>Streptococcus urticatus</i> OMZ61	EE ^b	Inhibition zone	ND	Yes	ND ^c	Yes	Yes	ND	Ikeno et al. (1991)
Israel	<i>Streptococcus sobrinus</i> G715, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27351	EE	MBC ^d	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Steinberg et al. (1996)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt 1600 ^e	EE	Inhibition zone	ND	ND	ND	Yes	ND	ND	Park et al. (1998)
Brazil	<i>Streptococcus sobrinus</i> G715	EE	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	ND	Koo et al. (1999)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt 1600, <i>Streptococcus mutans</i> OMZ-17-5, <i>Streptococcus sobrinus</i> G715, <i>Streptococcus urticatus</i> HS-6 ^e	EE	Inhibition zone	ND	Yes	Yes	ND	ND	ND	Koo et al. (2000a)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt 1600, <i>Streptococcus sobrinus</i> G715, <i>Streptococcus urticatus</i> HS-6	EE	MIC/MBC ^c	ND	Yes	Yes	ND	ND	ND	Koo et al. (2000b)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt 1600, <i>Streptococcus sobrinus</i> G715, <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Streptococcus sobrinus</i> (clinical isolates) ^e	EE and fractions (HX, CHL, EA, ET) ^f	Inhibition zone/MIC/MBC	NU	NU	Yes	Yes	NU	NU	Duarte et al. (2003)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	EE	Absorbance measurement of culture	Yes	Yes	ND	Yes	ND	ND	Leitão et al. (2004)
Brazil	<i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> (sp., 1910) ^e	EE	Inhibition zone/MBC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Sawaya et al. (2004)
Greek	<i>Streptococcus mutans</i> (clinical isolates) ^e	BUT ^g	Inhibition zone/MIC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Meliou and Chinou (2004)
Turkey	<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC33478, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ^e	EE	MIC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Uzel et al. (2005)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt 1600	EE and fractions (HX, CHL, EA, ET)	MIC/MBC ^c	ND	ND	Yes	Yes	Yes	ND	Hayakawa et al. (2005)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> UA150, <i>Streptococcus sobrinus</i> G715	EE and HX fraction	Killing assay - biofilm	Yes	ND	ND	ND	Yes	ND	Duarte et al. (2006)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> (clinical isolates) ^e	EEP ^h ; EP ^h	Inhibition zone/MIC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Rezende et al. (2006)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC33478 ^e	EE	Inhibition zone/MIC	NU	NU	NU	NU	NU	NU	Bruschi et al. (2006)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> (clinical isolates)	EE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Dasilibe et al. (2007)
Brazil	<i>Streptococcus mutans</i> UA150 ^e	EE and fractions (HX, CHL)	MIC/MBC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Alencar et al. (2007)

^a GTF: glucosyltransferase.^b EE: ethanolic extract.^c MBC: minimum bactericidal concentration; MIC: minimum inhibitory concentration.^d ND: not done.^e Studies that used other bacterial species in addition to mutans group streptococci.^f HX: hexane; CHL: chloroform; EA: ethyl acetate; ET: ethanol.^g BUT: n-butanol.^h EEP: 11.0% ethanolic extract of propolis from Apis FloraTM; EP: 11.0% extract of propolis from PropomaxTM (without alcohol).

chloroform, hexane, etc.). Variable results may also be caused by variations in the susceptibility test, such as the amount and type of culture media (BHI agar, Mueller–Hinton agar, tryptic soy agar, etc.), time of incubation (24 or 48 h), interpretation of results (diameter of inhibition zone or partial measure from the edge of the disk to the edge of the inhibition zone), and the application of propolis on agar (paper disks, cylinders, or wells).

All of the above factors may interfere with the evaluation of antimicrobial susceptibility tests with natural products, the same way they do with some classical antibiotics (CLSI, 2007), which points to the need for standardization regarding diffusion tests with natural products. Furthermore, the quantitative and qualitative differences in the composition of propolis samples from different regions worldwide affect the intensity and range of its antimicrobial activity (Dobrowolski et al., 1991; Koo et al., 1999; Kujumgiev et al., 1999; Katircioglu and Mercan, 2006; Koru et al., 2007).

Some authors have proposed serial dilution in tubes as a more consistent method for the evaluation of the bacterial activity of propolis samples. The evaluation of poorly hydrosoluble samples or the comparison of propolis with distinct hydrosolubilities, may result in incorrect data by the agar diffusion method, which is one of the most widely used antimicrobial susceptibility test for the screening of natural products. The high variation in the solubility of propolis compounds and the different levels of diffusive capacity can influence the inhibition zone seen in the agar diffusion method (Sawaya et al., 2004).

Another factor that should be taken into account is the time since isolation of the bacterial strains. Bacteria recently isolated from clinical sources appear to be somewhat more resistant to propolis than laboratory strains, suggesting that the latter do not express the same level of virulence and/or resistance than those of freshly isolated MGS samples (Duarte et al., 2003).

The mechanism of the antibacterial action of propolis has not been completely elucidated. Apparently, it is associated with a synergistic action of compounds (Bonhevi et al., 1994). In this regard, studies with *Streptococcus agalactiae* have revealed that the mechanism of action might involve the formation of pseudomulticellular streptococci, disorganization of the bacterial cytoplasm and membranes, partial bacteriolysis, and inhibition of protein synthesis (Takaisikuni and Schilcher, 1994). Since propolis samples may possess high contents of distinct flavonoids, the antibacterial mechanisms associated with these substances may be the same as those of crude propolis: inhibitions of nucleic acid synthesis, cytoplasmic membrane function, and energy metabolism (Cushnie and Lamb, 2005).

4.2. Inhibition of glucosyltransferase activity

Glucosyltransferases are essential for the production of insoluble glucans because of their action on sucrose. These glucans play an important role in the initial steps of colonization and accumulation of cariogenic microorganisms, contributing to biofilm formation (Gibbons and Houde, 1975; Hamada and Slade, 1980). Thus, the effective inhibition of glucosyltransferase activity is a valuable approach in the control of caries.

In their pioneering study, Ikeno et al. (1991) observed that propolis (100 µg/ml final concentration) partially inhibited MGS glucosyltransferase activity at a level ranging from 40% to 61% depending on the bacteria species, although the type of glucosyltransferase inhibited was not determined. Later, their results were confirmed by propolis samples from different Brazilian regions at a final concentration of 200 µg/ml. They reported that all samples inhibited glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*, but with some differences in the level of inhibition, which ranged from 8% to 30.5% (Park et al., 1998). The findings of both studies are not totally comparable since different assays were used to mea-

sure glucosyltransferase activity and the chemical compositions of the propolis samples were probably variable.

In a similar investigation, Koo et al. (2000c) analyzed two chemically distinct samples of propolis and observed that they had different levels of inhibitory action on distinct types of glucosyltransferases, both in solution (75–95%) and when adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite (45–95%). One propolis sample from Brazil's south region displayed a higher inhibitory effect on glucosyltransferases B and C at concentrations ranging from 47 to 187 µg/ml. In contrast, the propolis from the southeast region exhibited a higher inhibitory effect on adsorbed glucosyltransferase D (produced by non-mutans streptococci species) at concentration ranging from 375 to 1.5 mg/ml. Duarte et al. (2003) also observed that the activities of glucosyltransferases B and C can be significantly reduced by one type of propolis, both in solution and adsorbed onto hydroxyapatite beads (85–95% inhibition), although the researchers used a higher propolis concentration (500 µg/ml). Regardless of the propolis concentration in both studies, the data are relevant when considering the role of such enzymes in the colonization of MGS on tooth surfaces.

4.3. Effects of chemical fractions of propolis extract on MGS and glucosyltransferase activity

The activity of different chemical fractions of propolis extracts on MGS and glucosyltransferase activity has been investigated by several authors (Alencar et al., 2007; Duarte et al., 2003; Hayacibara et al., 2005). Duarte et al. (2003) showed that distinct fractions (hexane, chloroform, and ethanol) of propolis from northeastern Brazil significantly inhibit glucosyltransferase activity as well as the growth and adhesion of MGS. The highest inhibitory activity of glucosyltransferase (60–90%) was observed with hexane and chloroform fractions at 100 µg/ml. Similar results were reported by Hayacibara et al. (2005), who studied propolis samples from southern and southeastern regions of Brazil at a concentration of 200 µg/ml. Apparently, compounds with anti-glucosyltransferase activity have non-polar characteristics.

Recently, Alencar et al. (2007) analyzed a different type of propolis, named red propolis, and observed that its ethanol extract and chloroform fraction were the most active against MGS and *Staphylococcus aureus*, whereas no positive results were observed for its hexane fraction. Taken together, these data support the idea that the isolation of bioactive compounds depends not only on the origin of the propolis but also on the solvent used, since compounds with distinct physical-chemical properties might be present.

Propolis fractionation may be the first step in the identification of its active compounds. This process is especially important for the types of propolis where the fractions obtained with other solvents have been more effective than the ethanolic extract and where the biological properties were not related to the synergistic effects of the distinct constituents (Alencar et al., 2007).

4.4. Cariostatic effects of the compounds present in propolis

Analysis of the antimicrobial effects of some compounds present in propolis showed that the sesquiterpene *tt*-farnesol presented a higher anti-*Streptococcus mutans* effect, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 14–28 µg/ml and minimum bactericidal concentrations (MBC) of 56–112 µg/ml. The flavonoid apigenin presented a higher potential for inhibition of glucosyltransferase activity in solution (90.5–95%) and on the surface of saliva-coated hydroxyapatite beads (30–60%) at 135 µg/ml (Koo et al., 2002c). The chemical structures of these compounds are shown in Fig. 1.

Additional investigations confirmed that apigenin has the ability to inhibit enzymatic activity, but did not possess antibacterial activity, while *tt*-farnesol displayed moderate antibacterial activity

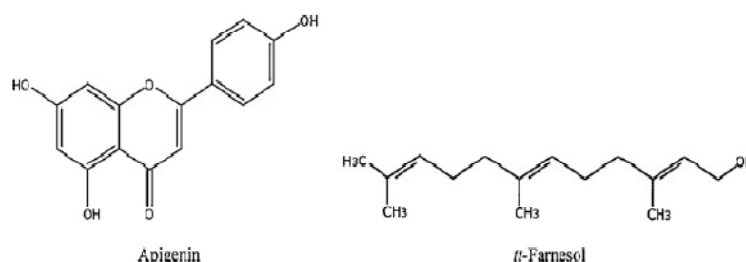


Fig. 1. Chemical structures of apigenin and tt-farnesol.

against biofilm but its effects on glucosyltransferases were not significant (Koo et al., 2002b). Later, it was found that both compounds interfered with the accumulation and polysaccharide composition of *Streptococcus mutans* biofilm without causing a great impact on bacterial viability (Koo et al., 2003). The possibility of using such purified compounds from propolis in the control or prevention of dental caries has at least two advantages over using the crude product: (1) it would be easier to standardize and (2) the enzymatic activity of a group of bacteria can be specifically interfered with without causing any evident imbalance in the oral microbiota. Such an approach would represent a novel and interesting way of treating an infectious disease without killing the etiological agent or providing a selective pressure, which is generally associated with the emergence of bacterial resistance.

Furthermore, in combination with sodium fluoride, apigenin and tt-farnesol significantly reduced the virulence of *Streptococcus mutans*, thus improving the cariostatic effect of fluoride. It was evident that the quantity of the extracellular insoluble glucans in *Streptococcus mutans* biofilm was reduced and that the combination of these agents with fluoride may be a potential alternative to the standard chemical agents used in the prevention of the cariogenic process (Koo et al., 2005).

4.5. In vivo studies

Several studies demonstrated the *in vivo* efficacy of propolis in the reduction of caries in both animals and humans. Ikeno et al. (1991) were one of the first to observe the inhibition of caries lesions in rats. The animals were fed with a highly cariogenic diet, infected with *Streptococcus sobrinus*, and treated with propolis from China at a final concentration of 1 mg/ml in drinking water. In comparison to the control group that did not receive propolis, caries inhibition was 56.2% in the group that received propolis at the same time as the inoculation with *Streptococcus sobrinus*, whereas the level of inhibition in the group where propolis was given after bacterial inoculation was 62.2%.

Similar effects were subsequently reported in a study carried out with desalivated rats, which were treated separately with propolis from two regions of Brazil (south and southeast) after experimental infection with *Streptococcus sobrinus* (Koo et al., 1999). Aliquots of 25 µl of 8% ethanolic extracts of propolis were applied on the molars of each quadrant, twice a day for 22 days using graduated syringes. Both types of propolis reduced the score and severity of smooth-surface and sulcal caries, but a statistical difference was observed only in the experiment with propolis from the southern region. These results confirmed that phytogeographical differences and composition indeed interfere with the biological activity of propolis, as discussed previously.

Cariostatic effects in rats have also been observed after the fractionation of propolis with other solvents such as hexane (Hayacibara et al., 2005; Duarte et al., 2005) and by some propolis compounds (Koo et al., 2002b). The combination of apigenin

and tt-farnesol reduced the incidence of caries on the smooth surface of rat molars more significantly than individual compounds, after topical application with the aid of a camel's hair brush twice a day for 5 weeks (Koo et al., 2002b). Furthermore, the combination of 1 mM apigenin, 5 mM tt-farnesol, and 250 ppm fluoride was highly effective in preventing caries development in rats, and its potency was comparable with that of the positive control (chlorhexidine + fluoride). It was most effective in reducing the accumulation of *Streptococcus mutans* biofilm, but did not display bactericidal activities (Koo et al., 2005). These data indicate that the analysis of purified propolis compounds may offer promising opportunities for identifying new agents with useful pharmacological properties.

Studies performed with human volunteers treated with propolis have also been reported to reduce caries indicators. Mean reductions of 38% and 42% in total bacterial and *Streptococcus mutans* counts, respectively, in the saliva of 10 volunteers were observed after mouth rinses with 10 ml of 0.2% propolis solution for 1.5 min. These inhibitory effects were observed 10 min after propolis application, and when saliva samples were cultured 1 h later, only a slight increase in the amount of *Streptococcus mutans* was observed (Steinberg et al., 1996). In contrast, Murray et al. (1997) reported that mouth rinses with 10% propolis did not promote a significant inhibition of *de novo* plaque formation.

These divergent findings are probably related to the highly variable composition of propolis samples from distinct geographical regions, since a study in volunteers that used a propolis sample containing a high concentration of flavonoids demonstrated significant reduction both in the plaque index (44.7%) and in the insoluble polysaccharide (61.7%). In this study by Koo et al. (2002a), volunteers under conditions favoring plaque accumulation used 15 ml of 3% (w/v) propolis in a hydro-alcoholic solution as mouth rinses for 1 min, twice a day, for 3 days (Koo et al., 2002a).

The results of the studies discussed so far are based on the use of propolis samples produced by *Apis mellifera* bees. Recently, an antimicrobial activity on MGS has also been reported with propolis produced by a different type of bees. Individuals performed three rinses per day for 7 days with 3 ml of an ethanolic extract of propolis produced by *Melipona (compressipes) fasciculata* bees. A decrease in the number of MGS was observed in 62% of saliva samples 1 h after the first mouth rinse and in 81% after 7 days of treatment (Duailibe et al., 2007). These data suggest that distinct bee species may have the potential to produce propolis with significant *in vivo* antimicrobial activity.

5. Trends for future research

The available data on propolis action on MGS is promising because of the real possibility of its use in the prevention of caries and possibly other oral diseases not discussed in this review. However, despite the significant effects of propolis in the control of caries, further studies are still necessary to evaluate the biological effects and the viability of using different propolis formulations

(besides hydro-alcoholic solutions), which could slowly deliver bioactive compounds and promote a long-lasting effect.

Since propolis is highly variable and complex in its chemical composition, it is possible that other purified compounds with potential for use in the control of oral diseases, such as *11*-farnesol and apigenin, exist in some propolis types. In addition, it is essential to identify the exact targets and to understand the molecular mechanisms of action of these and other putative bioactive compounds in the microbial cells. It is also desirable to clarify whether continuous exposure to these compounds can become a selective pressure in the generation of resistant mutants.

The toxic effects of propolis should be further investigated, and especially those of isolated compounds since they would be used in a higher concentration than that found in propolis extracts. The current opinion is that the use of standardized preparations of propolis is safe and less toxic than many other synthetic medicines (Moreno et al., 2005; Mohammadzadeh et al., 2007). Nevertheless, hypersensitive reactions have been reported (Bellegrandi et al., 1996; Callejo et al., 2001; Lieberman et al., 2002; Walgrave et al., 2005). Special attention should be paid to verifying, for instance, if a dose sufficient to promote the inhibition of glucosyltransferase can be reached within the oral cavity without causing major local or systemic side effects.

Some studies carried out with toothpastes and solutions for mouth rinses containing propolis have shown inhibitory activities on oral pathogens (Koo et al., 2002a; Lee et al., 2004; Sato et al., 2001). Although relevant, these data should be examined critically since the variability in the chemical composition of propolis samples from distinct regions might influence their biological activity, as previously discussed. Therefore, any propolis sample should first be tested *in vitro* for its efficacy as an anti-plaque agent before it is incorporated into toothpastes or other oral products. Further studies are necessary to validate whether these novel products are superior to the conventional ones in reducing plaque, or whether the use of purified compounds would be a more reasonable option.

6. Conclusions

Comparisons between the results of different studies investigating the efficacy of propolis as a cariostatic agent are hindered by the variation of the propolis concentrations and testing methods used. However, irrespective of the lack of standardization regarding the type of propolis, dosage, and course of therapy, several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that propolis may be used in caries prevention. It would be advantageous to standardize methods of extraction and *in vitro* testing so that the analysis of distinct propolis samples could be more systematic and the interpretation of results facilitated. Alternative mechanisms of infection prevention and treatment should also be included in initial activity screenings; targeting microbial virulence is one example of an anti-infection strategy that is not commonly screened. In addition, propolis and its derived compounds should be subjected to animal and human studies to determine their effectiveness in whole-organism systems. These studies should include specific studies on toxicity as well as the effects on normal microbiota.

Finally, due to propolis' wide range of biological activities, the potential of propolis and its compounds as cariostatic agents are an interesting contribution to the development of biotechnological products to control caries and other infectious diseases and clinical syndromes. Therefore, guidelines for quality control should be implemented since the high variability in the chemical composition of propolis is an important obstacle to be overcome before it can be recommended for routine application in dentistry clinics or in the manufacture of oral products for home use.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Banco do Nordeste for financial support, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowships granted.

References

- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Ihamasaka, T., Bang, K.S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7286–7292.
- Alencar, S.M., Oldori, T.L., Castro, M.L., Cabral, J.S., Costa Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 278–283.
- Amoros, M., Simoes, C.M., Cirre, L., Sauvage, F., Cormier, M., 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55, 1732–1740.
- Asokan, S., Muthu, M.S., Sivakumar, N., 2008. Dental caries prevalence and treatment needs of Down syndrome children in Chennai, India. *Indian Journal of Dental Research* 19, 224–229.
- Autio-Gold, J., 2008. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Operative Dentistry* 33, 710–715.
- Bankova, V., 2005a. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 114–117.
- Bankova, V., 2005b. Recent trends and important developments in propolis research. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2, 29–32.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., Popov, S., 1995. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 50, 167–172.
- Bankova, V., Dylgierov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., Zamjansan, Z., 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic composition and plant origin. *Apidologie* 23, 79–85.
- Bankova, V., Marcucci, M.C., Simova, S., Nikulova, N., Kujumgiev, A., Popov, S., 1996. Antibacterial diterpene acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 51c, 277–280.
- Bankova, V., Popova, M., Dogdanov, S., Sabatini, A.G., 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 57, 530–533.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A., Kadota, S., 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 239–246.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15, 561–571.
- Bellegrandi, S., D'Offizi, G., Ansotegui, I.J., Ferrara, R., Scala, E., Paganelli, R., 1996. Propolis allergy in an HIV-positive patient. *Journal of the American Academy of Dermatology* 35, 644.
- Berkowitz, R.J., 2003. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. *Journal of the Canadian Dental Association* 69, 304–307.
- Bonhevi, J.S., Coll, F.V., Jorci, R.E., 1994. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71, 529–532.
- Bouwsmas, O.J., 1996. The status, future, and problems of oral antiseptics. *Current Opinion in Periodontology* 3, 78–84.
- Bruschi, M.L., Lara, E.H., Martins, C.H., Vinholis, A.H., Casemiro, L.A., Panzeri, H., Gremiao, M.P., 2006. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 32, 225–238.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of *Ulm* propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36, 347–353.
- Callejo, A., Armentia, A., Lombardero, M., Martínez, C., Rebollo, S., Sedano, E., de la Fuente, R., Fernández, A., 2001. Hypersensitivity to propolis. *Alergología e Inmunología Clínica* 16, 113–117.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100 S17. Wayne, Pennsylvania 19087 1898, USA.
- Coykendall, A.L., Brathall, D., O'Connor, K., Dvorskas, R.A., 1976. Serological and genetic examination of some nontypical *Streptococcus mutans* strains. *Infection and Immunity* 14, 657–670.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60, 52–60.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Escribano, M.A., Meseguer, J., 2005. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 18, 71–80.
- Cunha, B.A., 2001. Antibiotic side effects. *Medical Clinics of North America* 85, 149–185.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343–356.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A., Dandya, R.C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti-inflammatory and

- antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 77–82.
- Duailibe, S.A., Gonçalves, A.G., Ahid, F.J., 2007. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *Journal of Applied Oral Science* 15, 420–423.
- Duarte, S., Koo, H., Bowen, W.H., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Ikegaki, M., Rosalen, P.L., 2003. 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* 26, 527–531.
- Duarte, S., Rosalen, P.L., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Bowen, W.H., Marquis, R.E., Rehder, V.L., Sartoratto, A., Ikegaki, M., Koo, H., 2006. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Archives of Oral Biology* 51, 15–22.
- Farsi, N., 2008. Dental caries in relation to salivary factors in Saudi population groups. *Journal of Contemporary Dental Practice* 9, 16–23.
- Featherstone, J.D., 2000. The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association* 131, 887–899.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforzin, J.M., Guimarães, S., 2006. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13, 170–175.
- García-Viguera, C., Ferreres, F., Tomas-Barberán, F.A., 1993. Study of Canadian Propolis by GC–MS and HPLC. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 48c, 731–735.
- Gebara, E.C., Pustiglioni, A.N., de Lima, L.A., Mayer, M.P., 2003. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral Health & Preventive Dentistry* 1, 29–35.
- Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60, 59–84.
- Gibbons, R.J., Houte, J.V., 1975. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 29, 19–44.
- Gleckman, R.A., Czachor, J.S., 2000. Antibiotic side effects. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 21, 53–60.
- Grange, J., Davey, R., 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* 83, 159–160.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whitley, F.R., 1987. The analysis of bud exudate of *Populus euramericana*, and of propolis, by gas chromatography–mass spectrometry. *Proceedings of the Royal Society London* 232, 249–272.
- Hamada, S., Slade, H.D., 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews* 44, 331–384.
- Hayacibara, M.F., Koo, H., Rosalen, P.L., Duarte, S., Franco, E.M., Bowen, W.H., Ikegaki, M., Cury, J.A., 2005. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 110–115.
- Higashi, K.O., de Castro, S.L., 1994. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology* 43, 149–155.
- Holttä, P., Alaluusua, S., Saarela, M., Asikainen, S., 1994. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scandinavian Journal of Dental Research* 102, 113–119.
- Ikeno, K., Ikeno, T., Miyazawa, C., 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Research* 25, 347–351.
- Islam, B., Khan, S.N., Khan, A.U., 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Medical Science Monitor* 13, RA196–RA203.
- Ito, J., Chang, F.R., Wang, H.K., Park, Y.K., Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K.H., 2001. Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products* 64, 1278–1281.
- Jarvinen, H., Tenovuori, J., Huovinen, P., 1993. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 1158–1159.
- Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V., 2007. In vivo study of propolis supplementation effects on anti-oxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 548–554.
- Katircioglu, H., Mercan, N., 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology* 5, 1151–1153.
- Koo, H., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Ikegaki, M., Park, Y.K., 2002a. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research* 36, 445–448.
- Koo, H., Gomes, B.P., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Park, Y.K., Cury, J.A., 2000a. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 45, 141–148.
- Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H., 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt-farnesol*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 782–789.
- Koo, H., Pearson, S.K., Scott-Anne, K., Abranches, J., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Marquis, R.E., Bowen, W.H., 2002b. Effects of apigenin and *tt-farnesol* on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiology and Immunology* 17, 337–343.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ambrosano, G.M.B., Murata, R.M., Vatsuda, R., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Park, Y.K., 2000b. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Current Microbiology* 41, 192–196.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H., 2002c. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1302–1309.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Ikegaki, M., Sattler, A., 1999. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Research* 33, 393–400.
- Koo, H., Schobel, B., Scott-Anne, K., Watson, G., Bowen, W.H., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., 2005. Apigenin and *tt-farnesol* with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *Journal of Dental Research* 84, 1016–1020.
- Koo, H., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., 2000c. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Research* 34, 418–426.
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C.H., Tunca, Y.M., Baysallar, M., Uskudar Güclu, A., Akca, E., Ozkok Tuiyu, A., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Salih, B., 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 13, 140–145.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235–240.
- Lee, S.S., Zhang, W., Li, Y., 2004. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices. *Journal of the American Dental Association* 135, 1133–1141.
- Leverett, D.H., Proskin, H.M., Featherstone, J.D., Adair, S.M., Eisenberg, A.D., Mundorff-Shrestha, S.A., Shields, C.P., Shaffer, C.L., Billings, R.J., 1993. Caries risk assessment in a longitudinal discrimination study. *Journal of Dental Research* 72, 538–543.
- Li, Y.H., Tian, X.L., Layton, G., Norgaard, C., Sisson, G., 2008. Additive attenuation of virulence and cariogenic potential of *Streptococcus mutans* by simultaneous inactivation of the ComCDE quorum-sensing system and HK/RR11 two-component regulatory system. *Microbiology* 154, 3256–3265.
- Lieberman, H.D., Fogelman, J.P., Ramsay, D.L., Cohen, D.E., 2002. Allergic contact dermatitis to propolis in a violin maker. *American Academy of Dermatology* 46, 530–531.
- Loesche, W.J., 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews* 50, 353–380.
- Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 83–99.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 105–112.
- Marcucci, M.C., Rodríguez, J., Ferreres, F., Bankova, V., Groto, R., Popov, S., 1998. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 53c, 117–119.
- Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y., 1996. HPLC and GC–MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42, 205–211.
- Marsh, P.D., 1991. The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *British Dental Journal* 171, 174–177.
- Marsh, P.D., 1999. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dental Clinics of North America* 43, 599–614, v–vi.
- McDermid, A.S., McKee, A.S., Marsh, P.D., 1987. A mixed-culture chemostat system to predict the effect of anti-microbial agents on the oral flora: preliminary studies using chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 66, 1315–1320.
- Melliou, E., Chinou, I., 2004. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica* 70, 515–519.
- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadvani, R., Samadi, N., Ostad, S.N., 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* 103, 1097–1103.
- Moreno, M.I.N., Zampini, I.C., Ordóñez, R.M., Jaime, G.S., Vattuone, M.A., Isla, M.I., 2005. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucumán, Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8957–8962.
- Murray, M.C., Worthington, H.V., Blinkhorn, A.S., 1997. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of *de novo* plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology* 24, 796–798.
- Nagy, E., Papay, V., Litkei, G., Dirya, Z., 1986. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. *Studies in Organic Chemistry (Amsterdam)* 23, 223–232.
- Nascimento, M.M., Lemos, J.A., Abranches, J., Lin, V.K., Burne, R.A., 2008. Role of RelA of *Streptococcus mutans* in global control of gene expression. *Journal of Bacteriology* 190, 28–36.
- Noack, M.J., Wicht, M.J., Haak, R., 2004. Lesion orientated caries treatment – a classification of carious dentin treatment procedures. *Oral Health & Preventive Dentistry* 2 (Suppl. 1), 301–306.
- Normark, B.H., Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252, 91–106.
- Orsi, R.O., Sforzin, J.M., Funari, S.R., Bankova, V., 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology* 5, 359–368.
- Orsolic, N., Basic, I., 2005. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 561–570.
- Orsolic, N., Sver, L., Terzić, S., Basic, I., 2005. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. *Veterinary Research Communications* 29, 575–593.
- Paraskevas, S., 2005. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *International Journal of Dental Hygiene* 3, 162–178.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2502–2506.

- Park, Y.K., Kuo, M.H., Ahren, J.A., Ikegaki, M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology* 36, 24–28.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Messias, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2, 33–38.
- Sato, M., Fujiwara, S., Nagayama, M., Yamaguchi, R., Tokuda, C., Takeuchi, H., Yamada, H., Sugimoto, H., Okihara, K., 2001. Effect of propolis and propolis-containing toothpaste on the formation of dental plaque *in vitro*. *Oral Therapeutics and Pharmacology* 20, 5–10.
- Sawaya, A.C.H.F., Souza, K.S., Marcucci, M.C., Cunha, I.B.S., Shimizu, M.T., 2004. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 104–109.
- Scheie, A.A., Kjeilen, J.C., 1987. Effects of chlorhexidine, NaF and SnF₂ on glucan formation by salivary and culture supernatant GTF adsorbed to hydroxyapatite. *Scandinavian Journal of Dental Research* 95, 532–535.
- Selwitz, R.H., Ismail, A.I., Pitts, N.B., 2007. Dental caries. *Lancet* 369, 51–59.
- Serkedjiev, J., Manolova, N., Bankova, V., 1992. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products* 55, 294–302.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 1–14.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr., A., Lopes, C.A., Bankova, V., Funari, S.R., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 243–249.
- Sheldon Jr., A.T., 2003. Antibiotic resistance: who is winning the war? Introductory remarks. *International Journal of Toxicology* 22, 129–130.
- Silva, J.E.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R., Vidal, F.V.N., 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry* 99, 431–435.
- Steinberg, D., Kaine, G., Gedalia, I., 1996. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *American Journal of Dentistry* 9, 236–239.
- Takaisikikuni, N.R., Schlicher, H., 1994. Electron-microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica* 60, 222–227.
- Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, I., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191–196.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., da Rocha Passin, F., Tsvetkova, I., 2006. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 3, 249–254.
- Twetman, S., 2004. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Research* 38, 223–229.
- Twetman, S., Petersson, L., Axelsson, S., Dahlgren, H., Holm, A.K., Kallestal, C., Lagerlof, F., Lingstrom, P., Mejare, I., Nordenram, G., Norlund, A., Soder, B., 2004. Caries-preventive effect of sodium fluoride mouthrinses: a systematic review of controlled clinical trials. *Acta Odontologica Scandinavica* 62, 223–230.
- Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, O., Sahin, R., 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160, 189–195.
- van Houte, J., 1980. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *International Dental Journal* 30, 305–326.
- van Houte, J., 1994. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research* 73, 672–681.
- Veljkova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 55, 785–789.
- Walgrave, S.E., Warshaw, E.M., Glesne, L.A., 2005. Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis* 16, 209–215.
- Wollenweber, E., Buchmann, S.L., 1997. Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplar (*Populus* spp.). *Zeitschrift für Naturforschung [C]* 52c, 530–535.
- Zanella, N.L., Bijella, M.F., Rosa, O.P., 2002. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 16, 101–106.
- Zhan, I., Featherstone, J.D., Gansky, S.A., Hoover, C.J., Fujino, T., Berkowitz, R.J., Den Besten, P.K., 2006. Antibacterial treatment needed for severe early childhood caries. *Journal of Public Health Dentistry* 66, 174–179.

ANEXO D - Artigo publicado no BMC Complementary and Alternative Medicine.

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 2011, 11:108

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith

Silvana A Liberio^{1,2†}, Antônio Luís A Pereira², Richard P Dutra^{1,4}, Aramys S Reis¹, Maria José AM Araújo¹, Nadia S Mattar¹, Lucilene A Silva¹, Maria Nilce S Ribeiro⁴, Flávia Raquel F Nascimento^{1,3}, Rosane NM Guerra^{1,3†} and Valério Monteiro-Neto^{3,5*†}

Abstract

Background: Native bees of the tribe Meliponini produce a distinct kind of propolis called geopropolis. Although many pharmacological activities of propolis have already been demonstrated, little is known about geopropolis, particularly regarding its antimicrobial activity against oral pathogens. The present study aimed at investigating the antimicrobial activity of *M. fasciculata* geopropolis against oral pathogens, its effects on *S. mutans* biofilms, and the chemical contents of the extracts. A gel prepared with a geopropolis extract was also analyzed for its activity on *S. mutans* and its immunotoxicological potential.

Methods: Antimicrobial activities of three hydroalcoholic extracts (HAEs) of geopropolis, and hexane and chloroform fractions of one extract, were evaluated using the agar diffusion method and the broth dilution technique. Ethanol (70%, v/v) and chlorhexidine (0.12%, w/w) were used as negative and positive controls, respectively. Total phenol and flavonoid concentrations were assayed by spectrophotometry. Immunotoxicity was evaluated in mice by topical application in the oral cavity followed by quantification of biochemical and immunological parameters, and macro-microscopic analysis of animal organs.

Results: Two extracts, HAE-2 and HAE-3, showed inhibition zones ranging from 9 to 13 mm in diameter for *S. mutans* and *C. albicans*, but presented no activity against *L. acidophilus*. The MBCs for HAE-2 and HAE-3 against *S. mutans* were 6.25 mg/mL and 12.5 mg/mL, respectively. HAE-2 was fractionated, and its chloroform fraction had an MBC of 14.57 mg/mL. HAE-2 also exhibited bactericidal effects on *S. mutans* biofilms after 3 h of treatment. Significant differences ($p < 0.05$) in total phenol and flavonoid concentrations were observed among the samples. Signs toxic effects were not observed after application of the geopropolis-based gel, but an increase in the production of IL-4 and IL-10, anti-inflammatory cytokines, was detected.

Conclusions: In summary, geopropolis produced by *M. fasciculata* can exert antimicrobial action against *S. mutans* and *C. albicans*, with significant inhibitory activity against *S. mutans* biofilms. The extract with the highest flavonoid concentration, HAE-2, presented the highest antimicrobial activity. In addition, a geopropolis-based gel is not toxic in an animal model and displays anti-inflammatory effect.

* Correspondence: valerio.monteiro@ceuma.br

† Contributed equally

³Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, SN, CEP: 65.080-040, São Luís, Maranhão, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Liberio et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Propolis is a generic name used for the product that results from the addition of the mandibular secretions of various bee species to resins these insects collect from the buds, flowers and exudates of different plants [1]. Distinct pharmacological activities of propolis have been demonstrated, including antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, cytotoxic, hepatoprotective and immunomodulatory properties, among others [2-4]. This diversity of pharmacological activities is related to quantitative and qualitative variations in the composition of different propolis samples [5,6].

Known pharmacological activities generally refer to propolis produced by *Apis mellifera*, the most common bee species in many countries and the main producer of honey in those countries [7]. However, some of these activities have also been observed in propolis produced by other bee species, including members of the tribe Meliponini [6,8]. Meliponines are stingless bees native to tropical and subtropical regions [9]. In the north and in some states of northeastern Brazil, *Melipona compressipes fasciculata* is the most important species for honey bee production and play an important role in flower pollination [10]. Stingless bees generally mix resinous material that they collect from plants with wax and soil and store large deposits of this material, called geopropolis, inside their hives. The final product is then used in a similar manner as propolis produced by *A. mellifera* [11].

In some countries, geopropolis has been used empirically by the population for wound healing, for the treatment of gastritis, and as an antibacterial agent [12]. Studies of ethanolic extracts of geopropolis produced by *M. compressipes* and *M. quadrifasciata anthidioides* have demonstrated its antimicrobial activity [13].

Although recent studies of *M. quadrifasciata* geopropolis have shown inhibitory activity against Gram-negative bacteria [14], this activity seems to be more pronounced against Gram-positive bacteria [6,8]. These results may be correlated with variations in chemical content, as has been observed for other types of propolis [13,15].

Due to its inhibitory effects on cariogenic microorganisms, such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp., and on bacterial enzymes (glucosyltransferases) involved in the cariogenic process, *A. mellifera* propolis has been proposed as an adjuvant for the control or prophylaxis of infectious diseases of the oral cavity, particularly dental caries [16-20].

Besides the pharmacological properties of propolis, its addition to different commercial products has drawn the attention of researchers for its possible toxicity, such as the triggering of hypersensitivity in the user. Most

results show that the use of *Apis* propolis is relatively safe, since it presents low toxicity [21-25].

Thus, the objective of the present study was to investigate the antimicrobial activity of *M. fasciculata* geopropolis extracts against oral pathogens, its effects on the viability of *S. mutans* biofilms, and the chemical contents of the extracts. A gel prepared with a geopropolis extract was further analyzed for its antimicrobial activity on *S. mutans* and its immunotoxicological potential.

Methods

Preparation and fractionation of geopropolis extracts

Samples of geopropolis produced by *M. fasciculata* were collected from bee hives located in the municipalities of Palmeirândia and São Bento, a microregion of the Western Lowland of Maranhão (2°37'30"S 44°52'30"W), the ecosystems of which include mangrove swamps, floodplains, lakes, and babassu palm forests, and in the municipality of Fernando Falcão, a microregion of Alto Mearim and Grajaú (6°7'30"S 44°52'30"W), a savannah area. These municipalities are situated in the northwestern and central region of the State of Maranhão, in northeastern Brazil.

Individual geopropolis samples were weighed and mixed with ethanol (70%, v/v) to a final proportion of geopropolis/ethanol of 30/70 (w/v). Next, the samples were triturated in a homogenizer and macerated for 48 h. The samples were then filtered through filter paper to remove the inorganic portion (soil), concentrated in a rotary evaporator and air-dried at 40°C for 48 h. The three hydroalcoholic extracts obtained (HAE-1, HAE-2 and HAE-3) were stored in a refrigerator (4-8°C) until the time of analysis. The crude extract presenting the highest activity, HAE-2, was fractionated by liquid/liquid partitioning using solvents of different polarities (hexane and chloroform) [26]. The fractions obtained, HAE-2-HF (hexane fraction) and HAE-2-CF (chloroform fraction), were concentrated, dried and stored as described above.

Preparation of a geopropolis-based gel

A geopropolis-based gel was prepared by mixing HAE-2 with 70% (w/v) Natrosol® and 30% (v/v) propylenoglicol, as vehicle, for the formulation of a 5% (w/w) gel. Patent pending under No. PI0905583-5 INPI-RIMA, Brazil.

Animals

C57Bl/6 mice, weighting 25-35 g, from the Central Animal Facility of the Federal University of Maranhão were used in the experiments with the geopropolis gel. The study was approved by the Ethics Committee for Animal Studies of the State University of Maranhão (No. 010/2007). All animals were cared for in accordance with

the guidelines of the Brazilian Council of Animal Studies.

In vitro evaluation of antimicrobial activity

Antimicrobial activity was evaluated using the agar diffusion method. For this study, 25 μ L of extract was added to wells (5 mm in diameter) in agar plates as described previously [27]. The following culture media were used: brain-heart infusion agar (BHI agar, Difco) for *S. mutans*, Rogosa agar (Difco) for *Lactobacillus acidophilus*, and Sabouraud dextrose agar (Difco) for *Candida albicans*. Twenty-four-hour cultures of *S. mutans* (ATCC 25175), *L. acidophilus* (ATCC 4356) and *C. albicans* (ATCC 18804) were used. Cultures were adjusted with sterile saline to a density equivalent to the McFarland scale No. 0.5 (10^8 CFU/mL) and inoculated onto agar plates with a sterile swab. Ethanol (70%, v/v) and an aqueous solution of chlorhexidine gluconate (0.12%, w/w) were used as negative and positive controls, respectively. Plates of *S. mutans* and *L. acidophilus* were incubated at 37°C for 48 h in 5% CO₂. *C. albicans* plates were incubated under aerobic conditions at 37°C for 24 h. After incubation, the diameters of the zones of inhibition were measured.

The minimum bactericidal concentrations (MBCs) were determined by the broth dilution technique using BHI broth (Difco). The final concentrations of tested hydroalcoholic extracts ranged from 12.5 to 0.19 mg/mL except the chloroform fraction (HAE-2-CF) for which concentrations ranged from 20 to 0.9 mg/mL. All assays were carried out in duplicate in three independent experiments. Dilutions of hydroalcoholic extracts were streaked on BHI agar plates and the MBC was determined. The MBC was defined as the lowest concentration of the extract that inhibited bacterial growth [28].

The minimum inhibitory concentration (MIC) for the geopropolis-based gel, against *S. mutans* (ATCC 25175), was determined by the broth dilution technique using BHI broth (Difco). The final concentrations of the product varied from 50 to 3.12 mg/mL and the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined as described above.

Inhibition of biofilm viability

The effect of HAE-2 on the viability of *S. mutans* (ATCC 25175) biofilms was evaluated as described previously [29,30], with some modifications. Briefly, for biofilm production, 24-well polystyrene cell-culture plates (TPP, Zellkultur und Labortechnologie, Switzerland) containing 1 mL tryptone-yeast extract broth supplemented with 1% sucrose were inoculated with approximately 1×10^6 CFU/mL of *S. mutans*. The culture medium was changed daily. On the fourth day, the culture supernatant was removed by aspiration, the

bacterial biofilm was treated with HAE-2 diluted in 1% peptone broth at a concentration corresponding to four times its MBC (25 mg/mL), and bacterial counts were evaluated at different intervals. The negative control well contained only 1% peptone broth and chlorhexidine (0.12%) was used as the positive control [31]. The treatment solution was removed by aspiration at 1-h intervals for 4 h, and the biofilm was gently washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, scraped off, and suspended in 1 mL 1% peptone broth. The suspension was sonicated twice in a Model T7 sonicating water bath (Thornton, Brazil) at 50 W with three pulses of 10 s each at intervals of 5 s [30]. After homogenization, the suspension was diluted from 10^{-1} to 10^{-4} in PBS. Aliquots (100 μ L of each dilution) were spread onto blood agar plates (blood agar base containing 5% sheep blood) and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 48 h. After incubation, CFU/mL were determined. These data were log₁₀ transformed for analysis. All assays were carried out in quadruplicate.

A bactericidal effect was attributed to geopropolis extract when it resulted in a reduction of ≥ 3 log₁₀ CFU/mL above baseline [30].

Chemical characterization

Phenolic compounds, triterpenes and alkaloids were assayed in all extracts as described previously [32-34]. Total phenol concentration was assayed by spectrophotometry with the Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Brazil) and 20% sodium carbonate solution for 2 h at room temperature in the dark. Known concentrations of gallic acid were used as standards. Measurements were made in a spectrophotometer (Cary 50 UV-VIS, Agilent, USA) at 760 nm and the results were expressed as a percentage of gallic acid [33]. The calibration equation for gallic acid (Sigma) was $y = 0.06352x - 0.06132$ ($R^2 = 0.99$) where y is absorbance and x is mg/mL of gallic acid.

The concentration of total flavonoids was determined by spectrophotometry in 2% aluminum chloride for 30 min at room temperature in the dark. Known concentrations of quercetin were used as standards and measurements were made at 425 nm. The results were expressed as a percentage of quercetin [33]. The calibration equation for quercetin (Merck) was $y = 0.07347x - 0.00868$ ($R^2 = 0.99$) where y is absorbance and x is mg/mL of quercetin. After linear regression analysis (CI 95%), both gallic acid and quercetin showed linear responses with different concentrations in the residue analysis. The relative standard deviations of the slopes were $< 5\%$ for both standards (gallic acid, $n = 9$; quercetin, $n = 6$).

According to the Brazilian legislation, total phenols and flavonoids contents should be included in the

chemical analysis as one of the quality criterion of propolis extracts [35].

The detection of triterpenes was performed by the Lieberman-Buchard reaction. Briefly, 2 mL of extract were mixed with 2 mL of chloroform. The mixture was filtered in the presence of Na_2SO_4 and 1 mL of acetic anhydride was added. After the addition of 3 drops of concentrated H_2SO_4 , a change in color to brownish/red indicated the presence of triterpenes [32].

Total alkaloid content of extracts was determined using the Dragendorff's, Hager's, and Mayer's reagents [34]. Three aliquots of dried geopropolis extracts (10 mg) were dissolved in 1 mL of distilled water that had been acidified to pH 2.0-2.5 with 0.01 N HCl. Alkaloids were then investigated with 5 drops of each reagent separately in each tube.

Animal experimental procedures

The animals were divided in three groups of 6 animals each, as follows: saline (S) - received a topical application of a sterile 0.85% NaCl (w/v) solution; GS - received a topical application of the pure gel base; and GP - received the gel base with HAE-2. The gel was applied topically to the oral cavity of the mice (25 μL /application), for a period of 1 minute, on four consecutive days.

Assessment of biochemical parameters and cytokine production

For the biochemical and immunological analysis, blood samples were collected from the retro-orbital plexus on the seventh day after treatment. The samples were transferred to conical plastic tubes, with or without EDTA, and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. Biochemical assessment consisted of a micro-assay to determine the serum concentrations of calcium, urea, cholesterol, triglycerides, albumin and glucose. The analysis were performed by means of automated procedures on an Architect - C8000 apparatus (Abbott®), using reagents from Labtest (Brazil). The concentrations of IFN- γ , IL-4, TNF- α and IL-10 were determined by immunoenzymatic assay (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Recombinant cytokines were used to generate a standard curve. The limit for detection in the assay was 2 pg/mL for IFN γ , TNF α , and IL-4, and 4 pg/mL for IL-10. The concentrations of cytokines were established using the coefficient of linear regression from values obtained on the standard curve.

Macro- and microscopic assessment of the organs

The macroscopic analysis of the tongue, spleen, liver, stomach, and kidney considered the following parameters: size, weight, integrity and presence or not of changes visually detectable. Only the tongue was not weighed. For

the histopathological analysis, all organs were fixed in 10% formol and embedded in paraffin. Next, 5 μm thick sections were cut on a microtome and stained with hematoxylin and eosin. The slides were examined in a light microscope with 20, 40 and 100 $\times$ objectives. The following parameters were analyzed: the presence of vascular congestion, edema, inflammatory infiltrate, and hemorrhage. Tissue changes were scored as: 0 for absent, 1 for scarce, 2 for moderate and 3 for intense.

Statistical analysis

The results were analyzed using SPSS for Windows 16.0 software (2007). Inhibition zones were compared using the Mann-Whitney test. Total phenol and flavonoid concentrations in the extracts as well as bactericidal effects of geopropolis on *S. mutans* biofilm viability were evaluated by analysis of variance (ANOVA) in conjunction with the Tukey multiple comparisons test. Data obtained with animals were expressed as mean $\pm$ standard deviation ($\bar{X} \pm \text{SD}$) for the immunological and biochemical results, and as mean $\pm$ standard error for the histopathological data. Statistical analysis consisted of analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls test. Organ weights were subjected to Tukey's test and the histopathological data were analyzed by unpaired and single-tailed Student's *t*-tests. For all tests, effects were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Agar diffusion tests showed the antimicrobial action of geopropolis extracts (HAE-2 and HAE-3), with inhibition zones ranging from 10 to 13 mm for *S. mutans* and from 9 to 13 mm for *C. albicans*. No activity against *L. acidophilus* was detected (Table 1). HAE-2 and HAE-3

Table 1 In vitro activity of geopropolis extracts against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Candida albicans*

Extracts ^a	Inhibition zone in mm ($\bar{X} \pm \text{SD}$) ^b		
	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>L. acidophilus</i>
HAE-1	0 ^d	0 ^d	0 ^d
HAE-2	13 $\pm$ 1 ^{cd}	13 $\pm$ 3 ^c	0 ^d
HAE-3	10 $\pm$ 2 ^{cd}	9 $\pm$ 1 ^{cd}	0 ^d
HAE-2-CF	13 $\pm$ 2 ^{cd}	0 ^d	0 ^d
HAE-2-HF	0 ^d	0 ^d	0 ^d
Chlorhexidine (0.12%)	23 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	20 $\pm$ 3
Ethanol (70%)	0	0	0

^a Extracts of geopropolis from different municipalities, as shown in Table 1.

^b Average of agar diffusion tests performed in duplicate in three independent experiments.

^c Significantly different from negative control (70% ethanol).

^d Significantly different from positive control (0.12% chlorhexidine) ($p < 0.05$; Mann-Whitney test).

exhibited significant antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans* when compared to the negative control ($p < 0.05$). HAE-1 showed no antimicrobial activity against the microorganisms tested.

Evaluation of the antimicrobial activity of HAE-2 fractions revealed that only the chloroform fraction showed an inhibition zone when tested against *S. mutans* (13 mm). No antimicrobial activity of the hexane or chloroform fractions was observed against *C. albicans*. The MBC against *S. mutans* was 6.25 mg/mL for HAE-2, 12.5 mg/mL for HAE-3, and 14.5 mg/mL for the chloroform fraction HAE-2-CF. The MBC of geopropolis-based gel (prepared with HAE-2) against *S. mutans* was confirmed in 12.5 mg/mL.

Since HAE-2 presented a lower MBC than the other extracts and since the pathogenesis of the cariogenic process is related to the formation of a dental biofilm, we investigated whether this extract was able to inhibit the viability of *S. mutans* biofilms. A significant reduction in CFU/mL was observed after 2 h exposure of a biofilm to geopropolis extract HAE-2 or chlorhexidine (Figure 1). However, bactericidal effects were observed after 3 h treatment with geopropolis extract (reductions higher than $3\log_{10}$ were obtained). Chlorhexidine treatment resulted in total elimination of *S. mutans* after 3 h exposure to the biofilm.

Chemical characterization of the geopropolis extracts indicated the presence of phenolic compounds in all samples. There were significant differences ($p < 0.05$) in total phenol and flavonoid concentrations among the samples analyzed (Table 2). Phenol content differed among the three extracts studied, with the lowest concentration being observed in HAE-2. In contrast, this

extract contained the highest concentration of flavonoids. Triterpenes were detected in HAE-1 and HAE-2, but not HAE-3; alkaloids were not detected in any sample.

The experimental procedures with animals did not lead to any alteration in the serum concentration of calcium, albumin, and glucose in the GP group. On the other hand, animals in this group presented an increased concentration of urea and reduced concentrations of cholesterol, and triglycerides (Figure 2).

A significant increase in the production of IL-4 and IL-10 was observed in the GP group, while the production of IFN- γ and TNF- α was kept unaltered when compared to the S and the GS groups (Figure 3).

No significant changes were observed in the body weight of the animals and also in relation to the organs weight, with the exception of the stomach in the GS group (Table 3). Besides, no macro- or microscopic alteration was detected in the liver, kidney, or stomach. However, histopathological alterations, such as: vascular congestion, presence of edema, inflammatory infiltrate, and hemorrhage in the animal tongues, were significantly greater in the GS and S groups than in the GP group (Table 4).

Discussion

In this study we observed that geopropolis can display inhibitory effects on some oral pathogens, without detectable toxicity in mice. Furthermore, an immunomodulatory activity, due to an increased anti-inflammatory cytokines, was also detected.

The inhibitory activity displayed by geopropolis against *S. mutans* and *C. albicans* was previously observed in extracts and fractions obtained from *Apis* propolis [15-17,19,20,36,37]. However, none of the three geopropolis extracts tested in this study were seen to have antimicrobial activity against *L. acidophilus*, unlike propolis extracts [38].

The inhibitory activity of geopropolis against *S. mutans* and *C. albicans*, but not against *L. acidophilus*, corresponds with the clinical significance of these microorganisms in oral cavity diseases. Both *S. mutans* and *L. acidophilus* ferment carbohydrates, forming organic acids that promote decalcification of dental enamel and dentine. Thus, the presence of these microorganisms is frequently associated with dental caries [39,40]. *S. mutans* is responsible for the initial demineralization of dental enamel, whereas bacteria of the genus *Lactobacillus* are related to lesion progression, i.e., after the initiation of the caries process [41]. Therefore, we speculate that a product containing *M. fasciculata* geopropolis, which mainly acts on *S. mutans*, may have important implications for caries-prevention strategies because *S. mutans* growth and biofilm formation are required for the onset of dental caries.

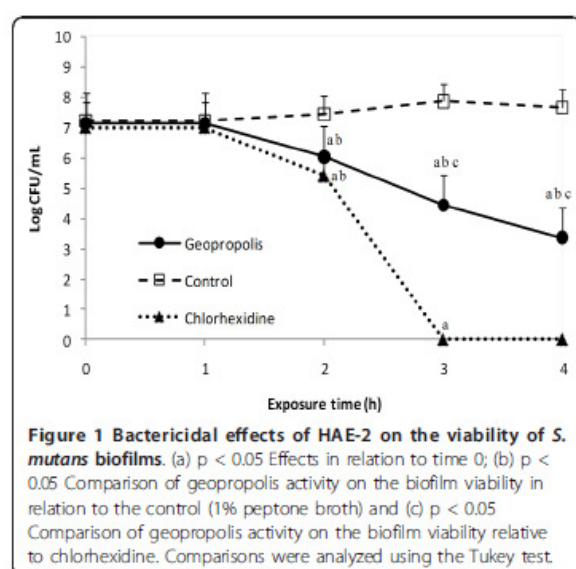


Table 2 Phenol and flavonoid concentrations of hydroalcoholic geopropolis extracts

Extract	City	Total Phenol % ($\pm$ SD) ^{a, b}	Total Flavonoids % ($\pm$ SD) ^{a, c}
HAE-1	Fernando Falcão	67.4 (2.0) ^d	1.07 (0.04) ^f
HAE-2	Palmeirândia	14.6 (2.3) ^e	2.91 (0.22) ^d
HAE-3	São Bento	51.2 (3.9) ^f	1.11 (0.01) ^f

^a Results are expressed as the average of assays carried out in triplicate.

^b Expressed as percentage of gallic acid.

^c Expressed as percentage of quercetin.

^{d, e, f} Values followed by different superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$; Tukey test).

Little is known about the antibacterial and antifungal activities of geopropolis produced by native bees such as *M. fasciculata*, especially regarding its activities against oral microorganisms. A recent *in vivo* study showed that geopropolis produced by *M. fasciculata* promoted a reduction in salivary *S. mutans* counts [42]. However, the authors did not investigate the effects of geopropolis on other microorganisms, and no *in vitro* tests were performed. We found no other studies in the literature investigating the antimicrobial activity of geopropolis produced by *M. fasciculata* against *S. mutans*. Thus, the

present findings are especially relevant since they underscore the potential for finding new active compounds that work against this microorganism in *M. fasciculata* geopropolis extracts.

The bactericidal activity of geopropolis extracts we observed against *S. mutans* biofilms is relevant not only because it confirms our *in vitro* results but also because it more closely reproduces the real conditions of the cariogenic process. Biofilm models are more relevant than studies which use planktonic cells because of the different growth of biofilm cells, their altered

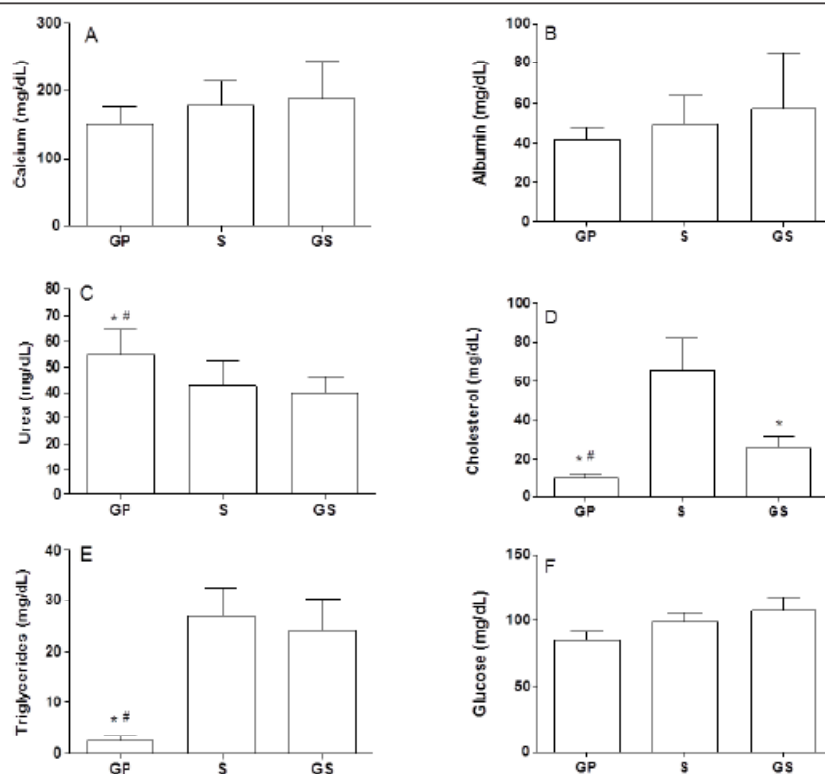


Figure 2 Biochemical assessment. Biochemical assessment of C57Bl/6 mice submitted to topical oral treatment with gel containing propolis (GP), compared to the group treated with the gel base (GS) or with saline (S). The serum concentrations of calcium (A); albumin (B); urea (C); cholesterol (D); triglycerides (E); and glucose (F) were determined. The results represent mean $\pm$ standard deviation of 6 animals/group. (*) $p < 0.05$ in relation to control and (#) $p < 0.05$ in relation to the other experimental group.

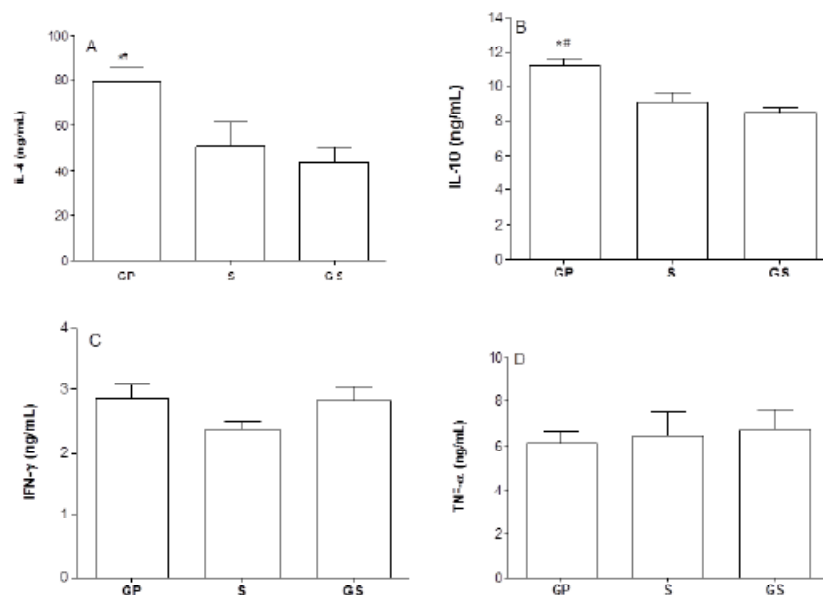


Figure 3 Serum concentration of cytokines. Serum concentration of cytokines in C57BL/6 mice treated with topical oral gel containing propolis (GP) in comparison with the group treated only with the gel base (GS), or with saline (S). ELISA was used to determine the serum concentrations of IL-4 (A); IL-10 (B); IFN-γ (C) and TNF-α (D). The results represent mean ± standard deviation of 6 animals/group. (*) p < 0.05 in relation to the control and (#) p < 0.05 in relation to the other experimental group.

metabolism as a result of a high population density and their generally higher resistance to antimicrobial agents [43].

Despite the significant *in vitro* antimicrobial activity of chlorhexidine against *S. mutans* biofilms, its use in dentistry is controversial because of local side effects, which include discoloration of the teeth, tongue, restorations, and dentures; soreness of the oral mucosa; and irritation of taste buds [44].

C. albicans is considered a commensal microorganism, inhabiting the oral mucosa and other anatomic sites. However, in certain situations, this microorganism can cause opportunistic local or systemic infections that are often severe and difficult to control, especially in hosts with specific predisposing factors [45,46]. Thus, in addition to being used to control *S. mutans* growth, products formulated from *M. fasciculata* geopropolis might

be used as adjuvants for the treatment of oral candidiasis and, ultimately, infections of other mucosa.

Chemical characterization of the extracts studied showed significant differences in the concentration of phenols and flavonoids among samples. The chemical composition of geopropolis produced by stingless bees in Brazil varies according to species. Moreover, available flora further influence the chemical composition of propolis [47]. According to Velikova et al. [6], members of the tribe Meliponini fly short distances and therefore use the first exudate sources that they encounter during their flights.

Only one of the propolis extracts (HAE-1) analyzed failed to show inhibitory activity against the microorganisms tested in this study, a finding that would suggest variations in the chemical composition of this sample. However, preliminary chemical analysis performed did

Table 3 Effect of topical oral treatment with a gel based on geopropolis (GP) from *Melipona fasciculata* Smith on organ weight in mice.

Groups	Final Weight (g)	Delta Weight	Organ weights (g)			
			Spleen	Kidney	Stomach	Liver
GP	25 ± 4	0.2	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.42 ± 0.06	1.3 ± 0.2
S	28 ± 2	-0.2	0.10 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.33 ± 0.04	1.6 ± 0.2
GS	27 ± 2	-0.2	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.55 ± 0.08*	1.5 ± 0.2

* p < 0.05 (ANOVA, followed by Tukey's test).

Table 4 Histopathological analysis of the tongue in mice that received topical oral treatment with a gel based on geopropolis (GP) from *Melipona fasciculata* Smith.

Parameters Analyzed ^a	Treatment groups ^b		
	GP	S	GS
Vascular Congestion	0.4 ± 0.1*#	1.8 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.1
Edema	0*#	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1*
Inflammatory Infiltrate	0.2 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	0*
Hemorrhage	0.4 ± 0.1*	2.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1*

(a) Tissue changes were scored as: 0 for absent, 1 for scarce, 2 for moderate and 3 for intense. Data represent the mean ± SEM of 6 animals per group

(b) GP - gel with geopropolis; GS - gel base and S - Saline

(*) p < 0.05 in relation to GP

(#) p < 0.05 in relation to S

not permit clear demonstration of such variation. Differences in its chemical content may have been influenced by its ecosystem because it originated in a savannah area, whereas HAE-2 and HAE-3 were prepared with geopropolis from an ecosystem whose vegetation comprised mangrove swamps, floodplains, lakes, and babassu palm forests.

Qualitative and quantitative differences in the composition of propolis have an important influence on its biological activity [48]. Among biologically active substances present, flavonoids are the main group contributing to the antimicrobial effects observed [21,49]. In this study, HAE-2 displayed the highest antimicrobial activity and had the greatest flavonoid concentration. Although the antimicrobial action of flavonoids is still controversial and conflicting results have been reported because of inter- and intra-assay variations in susceptibility tests, a link between flavonoids and inhibitory activity on microorganisms has been consistently demonstrated [50]. The antimicrobial activities observed here may be a product of high flavonoid concentration or, as reported for propolis produced by other bee species, a result of a synergistic action between flavonoids and other compounds present in these extracts [6,13].

Although some studies have reported cases of hypersensitivity reactions to *Apis* propolis [51,52], it is widely accepted that propolis does not present toxic effects [53,54], which confirms the results obtained with geopropolis in our study, since no macro and microscopic changes were detected in organs, which could indicate toxicity of the geopropolis-based gel on the mice.

Moreover, among the biochemical parameters studied, only an increase in the urea concentration was detected, but within the normal range for mice (41.97 mg/dl to 60.02 mg/dl), which does not indicate renal toxicity [55]. In fact, compounds like flavonoids, caffeic acid, and their esters present in propolis appear to prevent against membrane fragility in organs such liver and kidney,

decreasing the level of urea and the leakage of liver enzymes into the circulation [54,56,57].

The reduction observed in the levels of cholesterol and triglycerides can be associated to the presence of antioxidants and flavonoids. Apparently, these compounds can act as inhibitors of lipid peroxidation (LPO) by scavenging polyunsaturated fatty acids' peroxy radicals and interrupt the chain reactions [58].

Despite not having shown signs of toxicity, the increased production of IL-4 and IL-10, cytokines associated with a Th2 response, suggests an anti-inflammatory activity for the product [59]. In fact, the histopathological assessment of the tongue corroborates these data, since tissue changes were significantly lower in the GP group, possibly because of the anti-inflammatory effects of the geopropolis. Tissue alterations in the other animal groups were probably resulting from their manipulation at the time of treatment and/or collection of the material.

The immunomodulatory effect displayed has been previously reported in investigations with *Apis* propolis [4,60-63]. However, we did not find any reports describing the effects of geopropolis from native bees on the production of cytokines, specifically IL-4 and IL-10.

The potential use of propolis (or geopropolis) in dentistry is promising not only due to its antimicrobial activity against oral pathogens, but also due to its other biological and pharmacological properties, which include anti-inflammatory, antitumor, antioxidant, hematostimulative, and immunomodulatory properties [2,4,64,65]. In addition, it is considered relatively non-toxic [21,22].

Conclusions

In conclusion, our data indicate that geopropolis produced by *M. fasciculata* can exhibit antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans*. The activity against *S. mutans* was confirmed by further demonstrating the antibacterial effect of one extract on biofilm viability. The extract with the highest flavonoid concentration, HAE-2, displayed the highest antimicrobial activity. The gel maintained the antibacterial activity previously demonstrated in the geopropolis extract against *S. mutans*. Furthermore, no toxic effects were detected in mice treated with GP. On the other hand, an immunomodulatory action, due to the increase of anti-inflammatory cytokines, was observed. Our data demonstrate that geopropolis has the potential to be used for the control or prevention of diseases of the oral cavity, especially caries and candidiasis, as well as for treatment of inflammatory processes.

List of Abbreviations

HAE: Hydroalcoholic extracts of geopropolis; MBC: Minimum bactericidal concentration; HAE-2-CF: Chloroform fraction of hydroalcoholic extract No. 2

of geopropolis; HAE-2-HF: Hexane fraction of hydroalcoholic extract No. 2 of geopropolis; BHI: Brain-Heart Infusion; ATCC: American Type Culture Collection; CFU: Colony-forming unit; PBS: Phosphate-buffered saline.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Banco do Nordeste for financial support and the Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for the fellowship support.

Author details

¹Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, SN, CEP: 65.080-040, São Luís, Maranhão, Brazil. ²Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, SN, CEP: 65.080-040, São Luís, Maranhão, Brazil. ³Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, SN, CEP: 65.080-040, São Luís, Maranhão, Brazil. ⁴Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Av. dos Portugueses, SN, CEP: 65.080-040, Maranhão, Brazil. ⁵Laboratório de Microbiologia, Centro Universitário do Maranhão, Rua Josué Montello No. 1, CEP: 65.075-120, São Luís, Maranhão, Brazil.

Authors' contributions

SAL prepared the extracts, carried out the microbiological evaluation, organized the data analysis and drafted the manuscript. ALAP assisted with the data analysis and helped draft the manuscript. RPD carried out the chemical characterization and partitioned the extracts. ASR collected the geopropolis samples and helped with preparation of extracts. MJAMA helped with preparation of geopropolis extracts and animal experimental procedures. NSM helped with animal experimental procedures. LAS carried out histopathological analysis. MNSR participated in chemical characterization and helped draft the manuscript. FRFN helped with data analysis and manuscript revision. RNMG conceived the study, participated in its design and coordination, and critically reviewed the manuscript for important intellectual content. VMN conceived the study, coordinated the microbiological assays, and was involved in drafting the manuscript and revising it critically for intellectual content. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 June 2011 Accepted: 4 November 2011

Published: 4 November 2011

References

- Ghisalberti EL: Propolis: A review. *Bee World* 1979, **60**:59-84.
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Mildorikawa K, Matsushige K, Messing D, Huertas AA, Kadota S: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000, **72**(1-2):239-246.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandliya PC: Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991, **35**(1):77-82.
- Sforzin JM: Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007, **113**(1):1-14.
- Bankova V: Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005, **100**(1-2):114-117.
- Velikova M, Bankova V, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A: Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Z Naturforsch [C]* 2000, **55**(9-10):785-789.
- Pereira AL, Bicalho B, Aquino-Neto FR: Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 2003, **34**:291-298.
- Bankova V, Popova M: Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacog Rev* 2007, **1**(1):88-92.
- Roubik D: Ecology and Natural History of Tropical Bees. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1989.
- Kerr WE: Biologia e manejo da tábua: a abelha do Maranhão, São Luís, MA: EDUFMA; 1996.
- Castaldo S, Capasso F: Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitterapia* 2002, **73**(Suppl 1):51-6.

- Quezada-Euan JG, de Jesus May-itza W, Gonzalez-Acereto JA: Meliponiculture in Mexico: problems and perspectives for development. *Bee World* 2001, **82**:160-167.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999, **64**(3):235-240.
- Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AE: Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res* 2009, **8**(2):635-640.
- Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B: Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 2005, **160**(2):189-195.
- Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C: Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 1991, **25**(5):347-351.
- Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA: In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000, **45**(2):141-148.
- Liberio SA, Pereira AL, Araujo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, Ribeiro MN, Gonçalves AG, Guerra RN: The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* 2009, **125**(1):1-9.
- Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL: Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* 1998, **36**(1):24-28.
- Sawaya ACHF, Souza KS, Marcucci MC, Cunha IBS, Shimizu MT: Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Braz J Microbiol* 2004, **35**(1-2):104-109.
- Burdock GA: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998, **36**(4):347-363.
- Jasprica I, Momar A, Debeljak Z, Smolic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, et al: In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 2007, **110**(3):548-554.
- Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforzin JM: Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 2006, **105**:95-98.
- Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamed M, Ahmadvaniha R, Samadi N, Ostad SN: Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem* 2007, **103**:1097-1103.
- Moreno MIN, Zampini IC, Ordóñez RM, Jaime GS, Vattuone MA, Isla MI: Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *J Agric Food Chem* 2005, **53**:8957-8962.
- Ahuja A, (ed.): *Handbook of Bioseparations* New York: Academic Press; 2000.
- Ferro VA, Bradbury F, Cameron P, Shakir E, Rahman SR, Stimson WH: In vitro susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(3):1137-1139.
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar SM, Park YK: Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans Streptococci. *Curr Microbiol* 2000, **41**(3):192-196.
- Curran TM, Ma Y, Rutherford GC, Marquis RE: Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. *Can J Microbiol* 1998, **44**:1078-1085.
- Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abbranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH: Effects of apigenin and ttfamesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 2002, **17**(6):337-343.
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH: Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**(5):1302-1309.
- Enríquez A, Prieto E, De Los Ríos E, Ruiz S: Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. *Rev Med Vallejana* 2008, **5**(1):50-64.
- Woisky RGR, Salatino A: Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 1998, **37**:99-105.
- Matos FJA: Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC; 3 2009.

35. Brazil: Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Edited by: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília DF: Diário Oficial da União; 2001:18.
36. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M: Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol* 2007, **113**(2):278-283.
37. Steinberg D, Kaine G, Gedalia I: Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dent* 1996, **9**(6):236-239.
38. Koru O, Tolsoy F, Aciik CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A, Akca E, Ozkok Tuyulu A, Sorkun K, Tanyuksel M, et al: In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 2007, **13**(3-4):140-145.
39. Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986, **50**(4):353-380.
40. Marsh PD: Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999, **43**(4):599-614.
41. van Houte J: Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994, **73**(3):672-681.
42. Duallibe SA, Gonçalves AG, Ahid F: Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *J Appl Oral Sci* 2007, **15**(5):420-423.
43. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, Rehder VL, Sartoratto A, Ikegaki M, Koo H: The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 2006, **51**(1):15-22.
44. Twetman S: Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004, **38**(3):223-229.
45. Apkan A, Morgan R: Oral candidiasis. *J Postgrad Med* 2002, **78**:455-459.
46. Samaranayake LP: Oral candidosis: an old disease in new guises. *Dent Update* 1990, **17**(1):36-38.
47. Freitas MO, Ponte FAF, Lima MAS, Silveira ER: Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. *J Braz Chem Soc* 2008, **19**(3):532-535.
48. Katircioglu H, Mercan N: Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *Afr J Biotechnol* 2006, **5**:1151-1153.
49. Russo A, Longo R, Vanella A: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoaterapia* 2002, **73**(Suppl 1): S21-29.
50. Cushnie TPT, Lamb AJ: Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005, **26**(5):343-356.
51. Callejo A, Armentia A, Lombardero M, Asensio T: Propolis, a new bee-related allergen. *Allergy* 2001, **56**(6):579.
52. Walgrave SE, Warshaw EM, Glesne LA: Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis* 2005, **16**:209-215.
53. Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S: Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2008, **46**:2703-2712.
54. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odad E, Yildirim Z: Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004, **24**:27-35.
55. Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL: Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *Jornal Brasileiro Patol Med Lab* 2008, **44**(6):429-432.
56. Amin A, Hamza AA: Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences* 2005, **77**:266-278.
57. Suja SR, Latha PG, Pushpangandan P, Rajasekharan S: Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L) Hook against carbon tetrachloride induced liver damage in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2004, **92**:61-66.
58. Pascual C, Gonzalez R, Torricella R: Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994, **41**:9-13.
59. Wan YY, Flavell RA: The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006, **212**:114-130.
60. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Khatib AS, Hatem AM, De Vries PJF, El-Shafel S, Khatib MM: A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fund Clin Pharmacol* 2003, **17**:93-102.
61. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Badilega TC, Bufalo MC, Araújo JP Jr, Sforzin JM: Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-Like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res* 2010, **24**(8):1141-1146.
62. Orsi RO, Funari SR, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforzin JM, Bankova V: Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Animotoxins* 2000, **6**(2):205-219.
63. Sforzin JM, Orsi RO, Bankova V: Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol* 2005, **98**(3):301-305.
64. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T: Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem* 2004, **52**(24):7286-7292.
65. Orsolic N, Basic I: Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed Pharmacother* 2005, **59**(10):561-570.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/108/prepub

doi:10.1186/1472-6882-11-108

Cite this article as: Liberio et al: 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* 2011 **11**:108.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXOS E - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CEEA

DECISÃO DA CEEA/CMV/UEMA

Nº PARECER: 010/2007

Nº PROTOCOLO: 010/2007

PROJETO: Avaliação do efeito anti-inflamatório, anti-alérgico, anti-tumoral, anti-microbiano e toxicológico do tratamento com geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) em camundongos

AUTORES/EXECUTORES: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

COLABORADORES:

DATA REUNIÃO: 17/07/2007

() APROVADO

(x) APROVADO COM RECOMENDAÇÃO

() COMPENDÊNCIA

() REPROVADO

PARECER/RECOMENDAÇÃO:

O projeto foi aprovado, tendo em vista que atende aos princípios éticos e de bem estar para experimentação animal. Porém, recomenda-se como método de sacrifício o uso de anestésico geral (Thionembutal) de forma aprofundada (overdose) e não o uso do éter etílico.

DATA APROVAÇÃO: 17/07/2007 em ato *ad referendum*

ASSINATURA PRESIDENTE:

Alcides
Prof. Dr. Manoel Lúcio de Sousa
MV / UEMA / 9357

Cidade Universitária Paulo VI – Caixa Postal 09 – São Luís-MA. FONE: (98) 3257-3676 FAX: (98) 3257-3676
E-mail: mestradoev@yahoo.com.br C.G.C. 06.352.421/0001/68 – Criada nos termos da Lei 4.400 de 30/12/81