

Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna)¹

Ana Luisa Butelli Fianco²

Manuel Alves Falcão³

Eduardo Cassel⁴

Denise Milão⁵

Resumo

Própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas que coletam metabólitos secundários da flora da região, sua composição química é complexa e variada. *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona bipunctata* são abelhas nativas do Brasil e popularmente conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão”. Este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana, a presença de flavonoides e o teor de fenólicos de extratos etanólicos de própolis de duas abelhas sem ferrão, Jataí e Tubuna. As curvas de absorção indicaram presença de flavonoides e fenóis, e os valores de polifenóis totais, expressos em equivalente de ácido gálico e obtidos pelo método adaptado de Folin-Ciocalteu, foram de 5,00% para o extrato da Jataí e 6,06% para o da Tubuna. O extrato da abelha Tubuna apresentou atividade frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, o que pode ser explicado pelo maior teor de polifenóis que conferem atividades biológicas e terapêuticas à própolis.

Palavras-chave: Extratos etanólicos de própolis. Teor de polifenóis totais. Atividade antimicrobiana.

Abstract

Propolis is a resinous substance produced by bees that collect secondary metabolites from the regional flora, its chemical composition is complex and varied. Tetragonisca angustula and Scaptotrigona bipunctata are native bees from Brazil and known popularly as “indigenous stingless bees”. This study evaluated the antimicrobial activity, the flavonoids presence and the phenolic content of propolis ethanolic extracts from two stingless bees, Jataí and Tubuna. The absorption curves indicated the presence of flavonoids and phenols, and the total polyphenols values, expressed as galic acid equivalent and obtained by the Folin-Ciocalteu adapted method, were 5.00% for the Jataí extract and 6.06% for the Tubuna extract. The Tubuna bee extract showed activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus microorganisms that can be explained by the highest content of polyphenols, which gives biological and therapeutics activities to the propolis.

Keywords: Propolis ethanolic extracts. Total polyphenols content. Antimicrobial activity.

¹ Esta pesquisa teve o apoio financeiro do CNPq e CAPES.

² Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil e farmacêutica pela PUCRS. E-mail: lu_fianco@hotmail.com

³ Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, mestre pelo PGETEMA/PUCRS e farmacêutico pela PUCRS. E-mail: manuel.falcao@gmail.com

⁴ Doutor em Engenharia Química pelo Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil e coordenador do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) na PUCRS. E-mail: cassel@puccrs.br

⁵ Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS e coordenadora do Curso de Farmácia na PUCRS. E-mail: dmilao@puccrs.br

Artigo recebido em 26.09.2012 e aceito em 08.05.2013.

1 Introdução

As abelhas sem ferrão são reunidas na superfamília Apoidea e são popularmente conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997). Tradicionalmente manejadas por povos indígenas (FABICHAK, 1989), as abelhas sem ferrão são excelentes agentes polinizadores, sendo muito utilizadas com esse fim em plantações e estufas (CAUICH *et al.*, 2006), portanto, as abelhas e outros insetos essenciais para a manutenção da biodiversidade e equilíbrio da maioria dos ecossistemas terrestres (STUCHI; TAKASUSUKI; TOLEDO, 2008). Este trabalho concentra seus estudos nas abelhas sem ferrão Jataí (*Tetragonisca angustula*) e Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*). Essas são nativas do Brasil, com ampla ocorrência no Rio Grande do Sul (STUCHI; TAKASUSUKI; TOLEDO, 2008).

Os ninhos dessas abelhas apresentam, como característica marcante, uma única entrada composta por resinas em forma de funil (BLOCHTEN *et al.*, 2008). Todas as fendas e frestas dos ninhos são cobertas por uma substância resinosa, produzida pelas abelhas, através da coleta de metabólitos secundários da flora da região, denominada própolis (BARTH; DUTRA; JUSTO, 1999). A composição química da própolis é resultante, principalmente das características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004) é complexa e variada, destacando-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, os quais conferem efeitos terapêuticos à própolis (BEDASCARRASBURE *et al.*, 2004; SILICI; KUTLUCA, 2005; UZEL *et al.*, 2005; UMTHONG; PUTHONG; CHANCHAO, 2009). Os compostos fenólicos e os flavonoides podem atribuir à própolis propriedades antibacterianas (KALOGELOPOULOS *et al.*, 2009; GONSALES *et al.*, 2006; SAWAYA *et al.*, 2004; BIANCHINI; BEDENTO, 1998; BOSIO *et al.*, 2000), antifúngicas (OTA *et al.*, 2001),

antissépticas (SIMÕES; ARAUJO; ARAUJO, 2008), antivirais (HULEIHEL; ISANU, 2002), antioxidantes (MOREIRA *et al.*, 2008), anti-tumorais (DÍAZ-CARBALLO *et al.*, 2008) e anti-inflamatórias (RAMOS; MIRANDA, 2007). Observa-se na literatura que a maioria dos estudos sobre atividades terapêuticas e biológicas da própolis estão associadas à outra espécie de abelha, denominada *Apis mellifera*, pertencente à subfamília Apinae. De acordo com o trabalho de PEREIRA; BICALHO; NETO (2003), a composição química da própolis das abelhas sem ferrão e com ferrão é muito similar, não havendo muitas diferenças qualitativas, quando localizadas em regiões fitogeográficas semelhantes.

Devido ao número reduzido de estudos sobre a própolis de abelhas sem ferrão, o objetivo deste trabalho consiste em determinar a presença de flavonoides, o teor de polifenóis totais e a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos da própolis das abelhas Jataí e Tubuna.

2 Materiais e métodos

2.1 Mostra de própolis

As amostras de própolis das abelhas *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona bipunctata* foram coletadas em um meliponário, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre. As abelhas foram manejadas e conservadas de acordo com os procedimentos apresentados por WITTER; BLOCHTEIN; SANTOS (2005). A coleta de própolis da abelha Jataí ocorreu em julho/2010 e da abelha Tubuna em novembro/2009. Utilizou-se o coletor MLR3 (RECKZIEGEL, 2009), para a obtenção das amostras, através da raspagem das partes internas das caixas de abelhas. Essas amostras foram acondicionadas em ambiente fechado, ao abrigo da luz e mantidas sob refrigeração na temperatura de, aproximadamente, -20°C (CISILOTTO,

2011). Posteriormente, as amostras de própolis foram trituradas e homogeneizadas. Realizou-se a diluição de 1:1 (m/m) com etanol 70% (v/v). As soluções foram armazenadas em ambiente fechado à temperatura de 25°C, por um período de 45 dias. Uma vez ao dia, o extrato permaneceu no ultrassom, durante uma hora e foi agitado, manualmente, durante 5 minutos. Após, os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram identificados, filtrados em papel de filtro qualitativo e armazenados protegidos da luz em temperatura de aproximadamente 8°C (CISILOTTO, 2011).

2.2 Análise qualitativa de flavonoides

Foram solubilizados 21 µL do extrato etanólico de própolis em 25,0 mL de etanol P.A. e foi realizada a determinação do perfil da curva de absorção *versus* comprimento de onda no espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50, Varian). Fez-se a varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 600 nm, com intervalo de medida de 1 nm (ISLA *et al.*, 2005). Para identificação da presença de flavonoides, realizou-se a leitura nos comprimentos de onda de 270 nm a 330 nm (JURD; GEISSMAN, 1956). As medidas foram realizadas em triplicata para ambos os extratos.

2.3 Determinação de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada pelo método adaptado de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) em triplicata. Em tubos de ensaio de 15 mL foram adicionados, separadamente, 400 µL dos EEP diluídos (1,5 µL de EEP em etanol 10% (v/v) q.s.p. 1000 µL), 600 µL de etanol 10% (v/v), 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N, 1,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 17% (p/v) e 7,0 mL de água. Após a homogeneização, os tubos permaneceram em repouso por 90 minutos, em local protegido de luz.

A leitura da absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda de 725 nm no espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50, Varian) e os teores de polifenóis totais foram calculados em função da concentração de ácido gálico. O coeficiente de determinação dos dados da curva de calibração é $r^2 = 0,9985$. As leituras de absorbância foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em percentual mássico de polifenóis equivalente ao ácido gálico.

2.4 Ação antimicrobiana por bioautografia

O método da bioautografia (VALGAS, 2002) é um teste qualitativo que permite identificar a ação antimicrobiana de extratos frente a microrganismos, nesse caso, EEP das abelhas Jataí e Tubuna frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* subspécie *enterica* serovar *Choleraesius* (ATCC 10708) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para os ensaios, utilizou-se a técnica de bioautografia indireta, método pelo qual se aplica a amostra sobre uma placa cromatográfica sílica gel GF₂₅₄, que é desenvolvida com uma fase móvel adequada. Posteriormente, as placas de cromatografia em camada delgada (CCD) são cobertas por uma fina camada de meio de cultura inoculado com os microrganismos. Após o tempo de incubação (24 horas para bactérias), observa-se presença ou não de halos de inibição nas frações separadas pela CCD ou no ponto de aplicação da amostra (FRANCO, 2005; VALGAS, 2002). A metodologia da bioautografia pode ser separada em três etapas, duas preparativas (cromatografia em camada delgada e a preparação dos meios de cultura e microrganismos) e a própria bioautografia, como é descrito a seguir.

2.4.1 Cromatografia em camada delgada

Para realização do ensaio, aplicou-se

1,2 µL (0,5 mg/mL) do EEP na placa cromatográfica de camada delgada. Procedeu-se, então, à cromatografia, utilizando como fase móvel, uma solução hexano: acetato de etila (50:50). Após a migração dos solventes, as placas cromatográficas foram armazenadas por 24 horas até a total volatilização da fase móvel. Em seguida, foi aplicado 1,2 µL da amostra de EEP abaixo do ponto de origem da CCD, para observar se há inibição dos componentes do extrato total. Além disso, foram aplicados às placas cromatográficas 1,0 mg/mL de amoxicilina para as cepas utilizadas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. Chloraesius*, e 0,3 mg/mL de CEFEPIMA para *P. aeruginosa*, como controle positivo. Para observar crescimento microbiano, sem os EEP (branco), procedeu-se a mesma metodologia, criando um mesmo sistema, porém somente com a mistura de solventes na placa de CCD, sem a aplicação dos extratos.

2.4.2 Preparo do inóculo

O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton. A concentração da suspensão de microrganismos foi ajustada para a concentração de 3×10^8 UFC/mL pela escala McFarland. Para cada 100 mL de meio de cultura, foi inoculado 1 mL da suspensão de microrganismo.

2.4.3 Bioautografia

Uma fina camada do meio de cultura inoculado com o microrganismo foi adicionada a placas de Petri, cobrindo seus fundos. Em seguida, as placas cromatográficas, contendo os extratos, foram sobrepostas e cobertas com outra fina camada do meio de cultura inoculado. O mesmo procedimento foi realizado para todos os microrganismos. As placas foram incubadas em estufa com temperatura de 37°C, durante 24 horas, e os ensaios foram realizados em triplicata. Após o tempo de crescimento dos microrganismos,

uma solução de violeta INT (*p-iodonitrotetrazolium violet*) foi adicionada, para melhor visualização dos halos de inibição (FALCÃO, 2012; CHOMA; GRZELAK, 2011).

3 Resultados e discussão

3.1 Flavonoides

De acordo com a literatura, os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no UV-VIS, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção (240-285 nm e 300-400 nm) (JURD; GEISSMAN, 1956; MORAES, 2007). O pico máximo de comprimento de onda, para ambos os extratos, foi de 269,9 nm. As maiores absorbâncias foram de 0,2008 (para a *T. angustula*) e de 0,4445 (para a *S. bipunctata*), como mostra a figura 1. As curvas de absorção obtidas assemelham-se aos espectros de absorção de EEP de própolis de abelhas da espécie *Apis mellifera* de Tucumán e Jujuy, em estudo realizado na Argentina (ISLA et al., 2005).

3.2 Polifenóis totais

A partir das análises dos teores de polifenóis totais dos EEP, expressos como ácido gálico, obteve-se 5,00% para a *T. angustula* e 6,06% para a *S. bipunctata*. Os teores de polifenóis totais obtidos para a própolis das abelhas *T. angustula* e *S. bipunctata* apresentaram valores semelhantes dos encontrados por Funari e Ferro (2006), para três amostras de própolis que foram 7,39%, também expressos em ácido gálico.

GONZÁLEZ et al. (2003) determinaram os teores de substâncias fenólicas em própolis, oriundos de diferentes regiões da Argentina por três métodos colorimétricos distintos, tendo encontrado os maiores valores, para as análises em que se empregou o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância de referência.

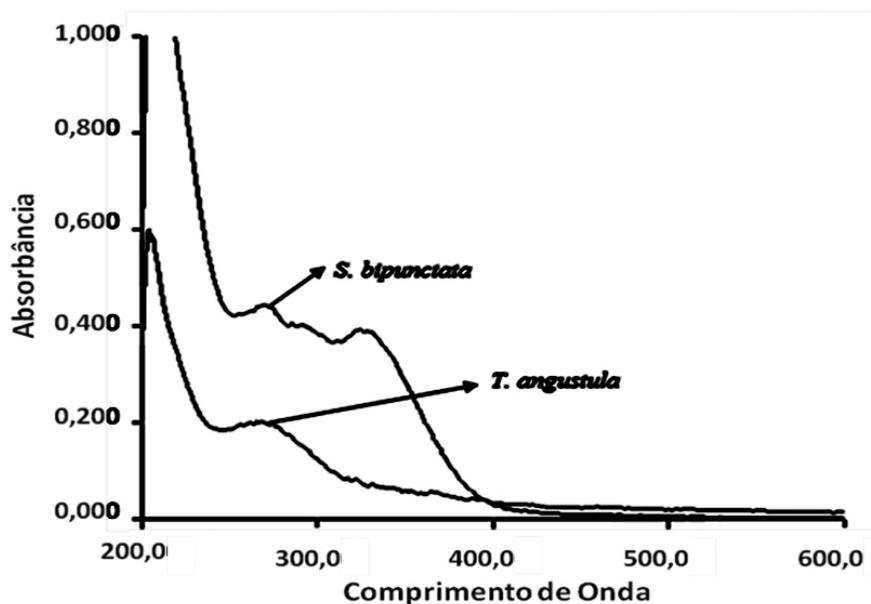


Figura 1: Curva de absorção dos extratos etanólicos da própolis (EPP) das abelhas *S. bipunctata* (Abs.: 0,4445, λ : 269,9 nm) e *T. angustula* (Abs.: 0,2008, λ : 269,9 nm)

Fonte: Os autores (2012).

3.3 Atividade antimicrobiana

O EEP da abelha Tubuna foi efetivo frente aos microrganismos *S. aureus* (bactéria gram positiva) e *E. coli* (bactéria gram negativa), gerando halo de inibição (figura 2). No entanto, o EEP da abelha Jataí não foi efetivo frente aos microrganismos testados. Como

é possível observar na figura 2, a atividade antimicrobiana pode estar relacionada a uma possível ação sinérgica dos constituintes do EEP da Tubuna, visto que a formação do halo de inibição ocorreu somente, onde a alíquota do EEP foi aplicada sem a separação dos compostos, não havendo formação de halo nas frações isoladas do extrato.

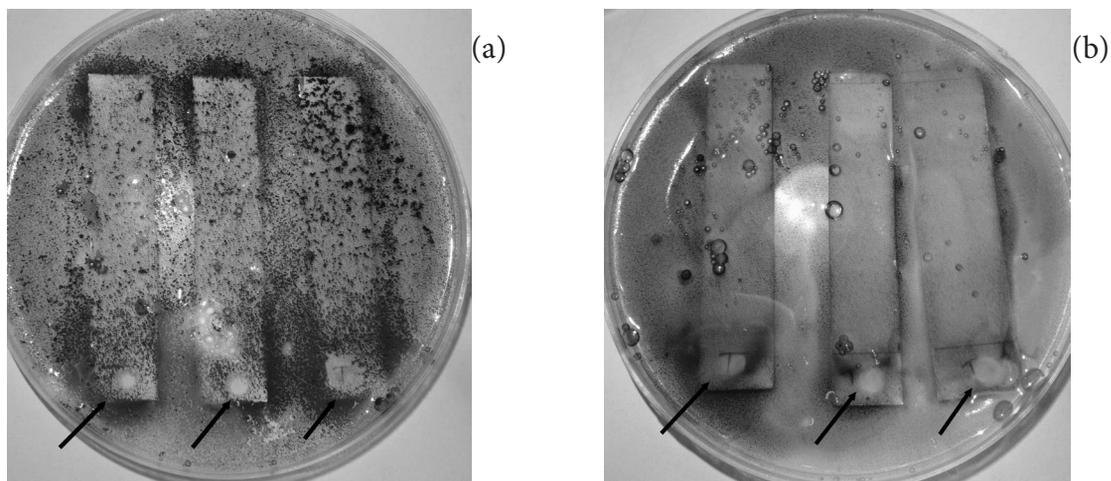


Figura 2: Placas cromatográficas com indicador p-INT. Halo de inibição nas alíquotas de EEP da abelha Tubuna aplicadas posteriormente à corrida cromatográfica (abaixo do ponto de origem) frente às bactérias *S. aureus* (a) e *E. coli* (b)

Fonte: Os autores (2012).

Os valores percentuais de polifenóis totais, obtidos pelo método adaptado de Folin-Ciocalteu, podem explicar a atividade antimicrobiana do EEP da abelha *S. bipunctata* (6,06%).

Em estudo realizado por Farnesi (2007), não foi observada ação antimicrobiana do EEP da *T. angustula* e do EEP das abelhas *S. bipunctata* em concentrações de até 400 µg/mL para os mesmos microrganismos testados neste estudo. Esses dados confirmam os resultados encontrados para os EEP da Jataí, porém diferem dos encontrados para o EEP da Tubuna, o qual demonstrou atividade antimicrobiana para os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* (FARNESI, 2007). Essa diferença nos resultados de atividade antimicrobiana pode ser explicada pela diferença na composição química da própolis, uma vez que fatores geográficos, sazonais e climáticos podem exercer influência sobre as plantas que são fontes dessa substância (CHENG; WONG, 1996).

4 Conclusão

O EEP da abelha *S. bipunctata* apresentou potencial antimicrobiano para *E. coli* e *S. aureus*, diferentemente do EEP da abelha *T. angustula*, o qual não foi efetivo frente aos microrganismos testados nas concentrações estudadas. Portanto, concluiu-se que o maior teor de compostos fenólicos, encontrados para o EEP da abelha Tubuna, pode justificar sua maior atividade antimicrobiana. A formação de halo de inibição ocorreu apenas onde o EEP foi aplicado, não estando presente nas frações isoladas do EEP da abelha Tubuna. Dessa forma, esses resultados refletem que a atividade encontrada pode estar relacionada a uma possível ação sinérgica dos constituintes do extrato.

Referências

- BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L.; JUSTO, R. L. Pollen analysis of some samples of propolis from southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, p. 663-667, 1999.
- BEDASCARRASBURE, E. *et al.* Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos Argentino. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 369-72, 2004.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, n.1, p. 149-152, 1998.
- BLOCHTEN, B. *et al.* **Manual de boas práticas para a criação e manejo racional de abelhas sem ferrão no RS: Guaraipo- *Melipona bicolor schenki*, Manduri- *Melipona marginata obscurior*, Tubuna- *Scaptotrigona bipunctata***. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008.
- BOSIO, K. *et al.* In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 174-177, 2000.
- CAUICH, O. *et al.* Polination of habanero pepper (*Capsicum chinese*) and production in enclosures using the stingless bee *Nannotrigona perilampoides*. **Journal of Apicultural Research**. v. 45, n. 3, p. 125-130, 2006.
- CHENG, P.C.; WONG, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v. 77, p. 8-15, 1996.
- CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of chromatography A**. v. 1218, n. 19, p. 2684-2691, 2011.
- CISILOTTO, J. **Avaliação do potencial citotóxico do extrato de própolis das abelhas sem ferrão, *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso, PUCRS, Porto Alegre, 2011.

- DÍAZ-CARBALLO, D. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 12, p. 9635-9643, 2008.
- FABICHAK, I. Abelhas indígenas sem ferrão Jataí. **Nobel**, São Paulo, 1989.
- FALCÃO, M. A. **Estudo da atividade anti-microbiana do óleo essencial de capim limão e suas frações para produtos de higiene corporal**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), PUCRS, Porto Alegre, 2012.
- FARNESI, A. P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e Meliponíneos em microorganismos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências – Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v. Muell. Ex. Benth., myrtaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.
- GONSALES, G. Z. *et al.* Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.
- GONZÁLEZ, M. *et al.* Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, 2003.
- HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Israel Medical Association Journal**. v. 4, n.11, p. 923-927, 2002.
- ISLA, M. I. *et al.* Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1176-1172, 2005.
- JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complex flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, 1956.
- KALOGELOPOULOS, N. *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 452-461, 2009.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.
- MORAES, R. H. **Avaliação do comportamento de flavonas e flavonóis frente à celulose microcristalina em estado sólido**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- MOREIRA, L. *et al.* Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 11, p. 3482-3485, 2008.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, 1997.
- OTA, C. *et al.* Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 375-378, 2001.
- PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; NETO,

- F. R. A. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, n. 3, p. 291-298, 2003.
- RAMOS A. F. N.; MIRANDA, J.L. Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.
- RECKZIEGEL, M. L. **Dispositivo para coleta de própolis e método de coleta de própolis**. Patente número PI0703118-1A2. 2009.
- SAWAYA, A. C. H. F. *et al.* Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.
- SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.
- SIMÕES, C. C.; ARAUJO, D. B.; ARAUJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microorganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 84-89, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.
- STUCHI, A. L. P. B.; TAKASUSUKI, M. C. C. R.; TOLEDO, V. A. A. Análise da genética de populações em abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) por meio de isoenzimas. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 68-77, 2008.
- UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CHAN-CHAO, C. Trigona laeviceps Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 37, n. 5, p. 855-865, 2009.
- UZEL, A. *et al.* Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.
- VALGAS, C. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- WITTER, S.; BLOCHTEIN, B.; SANTOS, C. Abelhas sem ferrão do Rio Grande do Sul: Manejo e Conservação. **Boletim FEPAGRO**, n. 15, ago. 2005. Disponível em: <http://www.fepagro.rs.gov.br/conteudo/776/?BOLETIM_FEPAGRO_Nº_15_-_Abelhas_Sem_Ferrão_do_Rio_Grande_do_Sul_Manejo_e_Conservação>. Acesso em: 15 jul. 2011.