

# PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, TOXICIDADE *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-RADICALAR E ANTIBACTERIANA DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA

[Phytochemical screening, *in vitro* toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis]

Déborah Munique Nogueira de Sousa<sup>1\*</sup>, Robério Gomes Olinda<sup>1</sup>, Clécio Galvão Martins<sup>2</sup>, Maria Rociene Abrantes<sup>1</sup>, Wesley Adson Costa Coelho<sup>1</sup>, Jean Berg Alves da Silva<sup>1</sup>, Selene Maia de Moraes<sup>1</sup>, Jael Soares Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Mossoró, RN, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Química em Produtos Naturais, Campus do Itaperi, Fortaleza - CE, Brasil.

**RESUMO** – No Brasil, a espécie de abelha *Melipona subnitida*, popularmente conhecida por “jandaíra” é endêmica da Caatinga nordestina. Esta espécie possui a peculiaridade de adicionar terra ou barro a sua respectiva própolis, formando geoprópolis. Este estudo objetivou caracterizar um extrato hidroalcolólico de geoprópolis (EHG) de jandaíra, através de prospecção fitoquímica e da determinação do teor de compostos fenólicos totais. Além disso, determinou-se seu potencial enquanto agente anti-radicalar e antibacteriano, pela capacidade sequestrante do radical DPPH e pelo método de difusão em ágar, respectivamente. A toxicidade *in vitro* contra o microcrustáceo *Artemia salina* também foi investigada. O EHG mostrou alto teor de compostos fenólicos totais (11,29% p/p) e potencial atividade anti-radicalar (IC<sub>50</sub> = 0,084 mg/mL). A fitoquímica revelou presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides das classes das flavonas e flavonóis, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres. Esses compostos bioativos podem ter sido os responsáveis pela atividade antibacteriana, demonstrada tanto em bactérias gram-positivas, quanto em gram-negativas, principalmente na concentração de 100 mg/mL. Aliado a isso, o EHG mostrou-se pouco tóxico (CL<sub>50</sub> = 1282,61 µg/mL). Esses comportamentos abrem perspectivas para futuros estudos da geoprópolis produzida pela abelha jandaíra, um produto nordestino com potencial benefício para a saúde, dada a presença de compostos bioativos em sua composição.

**Palavras-Chave:** atividades biológicas; geoprópolis; *Melipona subnitida*.

**ABSTRACT** – In Brazil, the bee's specie *Melipona subnitida*, popularly known as "jandaira" is endemic to northeastern Caatinga. This species has the peculiarity of add soil or clay in their respective propolis, forming geopropolis. This study aimed to characterize a geopropolis hydroalcoholic extract (GHE) of jandaira through phytochemical screening and determination of total phenolic compounds. Furthermore, it was determined its potential as antibacterial and anti-free radical agent, respectively through of: sequestering capacity of the radical DPPH and agar diffusion method. The *in vitro* toxicity against *Artemia salina* was also investigated. The GHE exhibited high content of total phenolic compounds (11.29% w/w) and potential anti-radical activity (IC<sub>50</sub> = 0.084 mg/mL). Phytochemical screening revealed the presence of hydrolysable tannins, flavonoids like flavonols and flavones, xanthonas and free pentacyclic triterpenes. These bioactive compounds may have been responsible for the antibacterial activity, as demonstrated in both gram-positive and gram-negative bacterias, mainly in the concentration of 100 mg/mL. Allied to this, the GHE showed little toxicity (LC<sub>50</sub> = 1282.61 g/mL). These characteristics create perspectives for future studies of geopropolis produced by jandaira's bee, a northeastern product with potential health benefit, given the presence of bioactive compounds in its composition.

**Keywords:** biological activities; geopropolis; *Melipona subnitida*.

\* Autor para correspondência. E-mail: deborah\_munique@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A palavra própolis é derivada do grego e significa em defesa da comunidade (*pro-*, em defesa, e *polis*, cidade ou comunidade) (Miguel & Antunes, 2011). As abelhas usam a própolis na proteção contra insetos e micro-organismos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (Bankova, 2005).

A composição química da própolis é variável e inclui em sua maior parte, flavonóides e outros ésteres fenólicos e seus derivados, compostos aromáticos, minerais e vitaminas (Cardinault et al., 2012). Uma série de propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a este produto apícola, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória e até mesmo antiácida; com usos evidenciados pelas tradições populares (Sforcin & Bankova, 2011). Dentre as muitas atividades farmacológicas atribuídas a própolis, algumas têm sido relatadas e confirmadas cientificamente, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiparasitária, cicatrizante e antimicrobiana (Sawaya et al., 2011; Fabris et al., 2013).

A própolis quando elaborada por abelhas nativas (especialmente as da tribo Meliponini) é denominada de geoprópolis, que difere daquela produzida pelas abelhas nativas da tribo Trigonini e pelas abelhas do gênero *Apis* por utilizarem terra e/ou barro, além de resinas de plantas e cera (Sawaya et al., 2011). Na região do semiárido, a abelha nativa jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) é um dos meliponíneos típicos (Nogueira-Neto, 1997). A geoprópolis, igualmente à própolis, é amplamente utilizada para tratamento de diferentes doenças (Souza et al., 2009), com algumas atividades biológicas já comprovadas (Liberio et al., 2011; Franchin et al., 2012; Cunha et al., 2013). Entretanto, em relação à geoprópolis de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*), estudos sistematizados sobre sua composição química e atividades farmacológicas são escassos.

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi caracterizar a geoprópolis de jandaíra – proveniente do semiárido nordestino – através de prospecção fitoquímica e determinação do teor de compostos fenólicos totais bem como avaliar as atividades anti-radicalar e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. Em adição, a toxicidade contra *Artemia salina* foi avaliada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra de geoprópolis (386g) de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) foi obtida na comunidade de Pedra Branca, zona rural do município de Mossoró/RN (Latitude 05°11'15" Sul e Longitude 37°20'39" Oeste, altitude 16 metros). Em seguida, a amostra foi triturada em liquidificador e macerada a frio em álcool etílico 70% na proporção de 3:7 (m/v), por sete dias (sob abrigo da luz). No oitavo dia, filtrou-se o sobrenadante e o extrato obtido foi levado à geladeira por 24 h e posteriormente ao freezer por 30 minutos, para separação da cera. Através da técnica de concentração sob pressão reduzida removeu-se o solvente do extrato (rotaevaporador Fisatom, modelo 801), obtendo-se assim o extrato hidroalcolico de geoprópolis (EHG). O rendimento da extração, assim como a porcentagem de cera, foram calculadas em relação à massa inicial de geoprópolis e expressos em porcentagem.

O EHG de jandaíra foi submetido à prospecção fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias. Dessa forma, usou-se: A) cloreto férrico para fenóis simples e taninos; B) teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides; C) teste de acidulação e alcalinização com aquecimento para teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides; leucoantocianidinas, catequinas e flavonas; D) reagente de Lieberman-Burchard para esteróides e triterpenóides; E) formação de espuma persistente pela agitação, para saponinas. O grau de presença do grupo funcional no extrato foi estabelecido como forte (+++), médio (++) , fraco (+) e ausente (-) de acordo com a intensidade de coloração/outra reação visualizada (Matos, 2009).

Em seguida, determinou-se a concentração de compostos fenólicos no EHG pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu com modificações (SCALBERT et al., 1989). O ácido gálico (0; 30; 60; 75; 90; 105; 120 mg/L) foi usado para construção da curva de calibração. 2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água 1:10 v/v) foi misturado com 1,6 mL de solução de carbonato de sódio (75 g/L) e então 0,4 mL das soluções do ácido gálico ou do EHG (0,1 mg/mL em metanol) foi adicionado.

Após 2h de incubação, mediu-se a absorvância a 765 nm, utilizando cubetas de vidro, tendo como branco metanol e todos os reagentes, exceto a amostra. As análises foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso como teor de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (GAE).

A atividade anti-radicalar foi avaliada através da capacidade dos extratos de geoprópolis em sequestrar o radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), através do método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com adaptações. Adicionou-se 0,1 mL da solução metanólica de geoprópolis – obtida a partir do EHG – (concentrações usadas para a curva: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0 mg/mL) a 3,9 mL de uma solução de DPPH  $6 \times 10^{-5}$  M e após 60 minutos, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (Hitachi U-2000) no comprimento de onda 515nm. O mesmo procedimento foi realizado com solução padrão de ácido ascórbico nas concentrações: 0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0 mg/mL. As leituras foram realizadas em triplicata e o metanol foi utilizado como branco. O resultado foi primeiramente expresso como curva do DPPH, concentrações testadas *versus* porcentagem de inibição<sup>1</sup>. Após obtenção da equação da reta ( $y = ax + b$ ) calculou-se a IC<sub>50</sub> (concentração da amostra/padrão capaz de inibir em 50% o radical DPPH), substituindo o y da equação por 50.

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{\text{Abs. branco} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. branco}} \right) \times 100$$

Para avaliação da atividade antibacteriana utilizou-se o método de difusão em ágar Mueller Hinton (AMH) pela técnica de perfuração (Ostrosky et al., 2008) contra as estirpes *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As bactérias foram primeiramente semeadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e suspensas em salina peptonada para obter turvação idêntica à do tubo número 0,5 da escala Mac Farland ( $6 \times 10^8$  micro-organismos/mL) (Koneman & Cury, 2001). Com auxílio de swabs esterilizados, a suspensão foi inoculada nas placas de AMH, em três direções, como já padronizado (Wayne, 2008). Após a completa absorção do inóculo pelo ágar, este foi perfurado com ponteiros de 200µL, estéreis e invertidas, obtendo-se poços de 5mm de diâmetro. Aos poços, foi então adicionado 1 gota do AMH para cobrir o fundo destes e, após endurecimento do ágar, adicionou-se 40µL das diferentes soluções do EHG (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 mg/mL, ao se adicionar álcool etílico 70%). As placas foram deixadas em repouso até completa absorção do extrato pelo ágar e em seguida, foram

incubadas de forma invertida, a 37°C, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata, e a atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando houve desenvolvimento de halo de inibição circundando o poço contendo as diferentes concentrações do extrato de geoprópolis. Como controle positivo empregou-se discos do antibiótico Gentamicina (10µg) e como controle negativo, 40µL de álcool etílico 70%. Os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro e expressos em milímetros (Wayne, 2008). Posteriormente, as medidas repetidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, já os dados não paramétricos, foram submetidos pelo teste de Friedman, considerando significância de 5%.

Por fim, avaliou-se a toxicidade do EHG da jandaíra através do teste de letalidade contra *A. salina*, de acordo com o método proposto por Meyer et al. (1982), com algumas modificações. Ovos de *Artemia salina* foram incubados em água do mar artificial<sup>a</sup> a temperatura ambiente por 48 horas. Com a ajuda de uma fonte de luz, as larvas foram atraídas e coletadas. Soluções do extrato de geoprópolis, em diversas concentrações, foram preparadas com o EHG mais solvente (metanol), dimetil sulfoxido (DMSO) e água do mar. Dez (10) metanúplios foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de cada uma das soluções a serem testadas. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas. Os ensaios foram realizados em triplicata e a contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas. Esse número foi usado para o cálculo da concentração capaz de matar 50% das larvas (CL<sub>50</sub>) através do programa estatístico Statplus (2009) pelo método Probit.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do EHG de jandaíra foi de 7,43% e a porcentagem de cera, 15,95%. Na abordagem fitoquímica, o extrato hidroalcolólico da geoprópolis de jandaíra apresentou-se rico em substâncias fenólicas, tais como: taninos hidrolisáveis ou pirogálicos e flavonas e xantonas, apresentou ainda triterpenos pentacíclicos livres (resultados apresentados na Tabela 1). Estes achados estão de acordo com os obtidos por Liberato et al. (2008), que analisaram amostras de própolis de *Apis mellifera* obtidas no estado Ceará e mostraram que estas eram ricas em triterpenóides pentacíclicos livres. De igual modo, amostras de geoprópolis de

<sup>a</sup> A água do mar artificial é obtida através da dissolução dos seguintes sais em 1L de água destilada: 15,153g de NaCl; 1,398g de MgCl<sub>2</sub>; 1,888g de MgSO<sub>4</sub>; 0,652g de CaCl<sub>2</sub>; 0,414g de KCl; 0,116g de NaHCO<sub>3</sub>.

tiúba (*Melipona fasciculata*), coletadas no estado do Maranhão, mostraram-se ricas em triterpenos e

compostos fenólicos (Cunha et al., 2010).

Tabela 1. Metabólitos encontrados no extrato hidroalcolóico da geoprópolis (EHG) de *Melipona subnitida* através de prospecção fitoquímica.

| Classes de metabólitos              | Extrato hidroalcolóico de geoprópolis (EHG) |
|-------------------------------------|---|
| Fenóis simples                      | -   |
| Taninos condensados                 | -   |
| Taninos hidrolisáveis               | +++   |
| Antocianinas e antocianidinas       | -   |
| Flavonas, flavonóis e xantonas      | ++  |
| Chaconas e auronas                  | -   |
| Leucoantocianidinas                 | -   |
| Catequinas                          | -   |
| Flavononas                          | -   |
| Esteróides livres                   | -   |
| Triterpenóides pentacíclicos livres | +++   |
| Saponinas                           | -   |

Reação forte (+++), média (++), fraca (+) e ausente (-).

Através da curva de calibração do ácido gálico ( $R^2 = 0,98$ ) foi possível determinar o teor de compostos fenólicos totais da geoprópolis de jandaíra. A amostra analisada obteve  $11,29 \pm 0,26\%$  (ou  $112,29\text{mg GAE/g}$  do extrato) de fenólicos totais em sua composição, encontrando-se acima do parâmetro mínimo preconizado pelo Ministério da Agricultura, que é  $5\%$  (BRASIL, 2001). Além disso, nosso resultado foi semelhante ou superior aos já descritos na literatura para alguns tipos de própolis produzida pela abelha *Apis mellifera*, tais como: própolis verde ( $7,39\%$ ) (Funari & Ferro, 2006) e própolis marrom ( $0,1$  e  $5,0\%$ ) (Bastos et al., 2011); e ainda para a geoprópolis de *Melipona scutellaris* (“uruçu”) ( $12,7\%$ ) (Franchin et al., 2012) e para a geoprópolis de jandaíra obtida no estado da Paraíba ( $6,39\%$ ) (Souza et al., 2013).

Em relação ao potencial anti-radicalar, a amostra de geoprópolis de jandaíra demonstrou  $IC_{50} = 0,084\text{ mg/mL}$ , revelando-se como um bom antioxidante, obtendo um valor próximo ao encontrado para o ácido ascórbico ( $IC_{50} = 0,049\text{ mg/mL}$ ). Em estudos anteriores, Silva et al. (2012) mostraram que o mel puro de jandaíra exibiu menor atividade anti-radicalar (contra DPPH) com valores de  $IC_{50}$  entre  $10,6$  e  $12,9\text{ mg/mL}$ . Já o extrato etanólico da geoprópolis de jandaíra obtido no estado da Paraíba exibiu alta eficiência anti-radicalar (contra DPPH) com  $IC_{50} 0,027\text{ mg/mL}$  (Souza et al., 2013), quase o dobro do que encontramos para o ácido ascórbico ( $0,049\text{ mg/mL}$ ). Esses valores podem ser explicados pela diferente composição dos compostos bioativos que pode variar de geoprópolis para geoprópolis. Os compostos fenólicos, principais constituintes da própolis, são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas fenólicas, exibindo assim, atividade sequestradora do radical.

Através do método de difusão em ágar, a atividade antibacteriana foi demonstrada qualitativamente. A medida que a concentração do extrato hidroalcolóico de geoprópolis foi aumentada, houve ampliação dos halos de inibição, exibindo ação concentração-dependente. As médias dos diâmetros de inibição (expressos em mm) das diferentes concentrações testadas estão apresentadas na Tabela 2. Como esperado, todas as bactérias demonstraram sensibilidade a Gentamicina  $10\mu\text{g}$  e o etanol  $70\%$  (controle negativo) mostrou baixa atividade inibitória contra os micro-organismos testados, sendo *E. aerogenes* a bactéria menos susceptível à amostra de geoprópolis.

As bactérias gram-negativas *E. aerogenes* e *E. coli* e a bactéria gram-positiva *S. aureus* tiveram crescimento inibido a partir do tratamento com  $25\text{ mg/mL}$  do EHG, quando comparada ao controle negativo, álcool  $70\%$  ( $p < 0,05$ ). Já a bactéria gram-negativa *S. typhimurium*, teve seu crescimento inibido somente quando tratada com concentrações iguais ou superiores a  $50\text{ mg/mL}$  do EHG e somente a concentração de  $100\text{ mg/mL}$  formou halos de inibição similares ao da Gentamicina  $10\mu\text{g}$ . A maior resistência dessa estirpe bacteriana a amostras de própolis, já foi reportada por Orsi et al. (2007). Os resultados de Campos et al. (2011), para a própolis da abelha nativa *Frieseomelitta varia* foram semelhantes aos do presente estudo, onde um extrato na concentração de  $10\text{ mg/mL}$  mostrou halo de inibição de  $8\text{ mm}$  contra *S. aureus*, enquanto amostras de própolis de *Apis mellifera*, na concentração de  $10\text{ mg/mL}$ , mostraram valores de halos de inibição entre  $10$  e  $15\text{ mm}$  contra essa mesma bactéria.

Tabela 2. Halos de inibição (mm) obtidos através do método de difusão em ágar para as diversas concentrações testadas do extrato hidroalcolico da geoprópolis (EHG) de *Melipona subnitida*.

| Bactérias             | Concentrações do EHG (mg/mL) |                            |                           |                            |                           |                          |                          | Controle +                | Controle -               |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                       | 100                          | 50                         | 25                        | 12,5                       | 6,25                      | 3,13                     | 1,56                     | Gentamicina 10µg          | Álcool 70%               |
| <i>E. aerogenes</i>   | 16,66 ± 1,15 <sup>b</sup>    | 14,00 ± 2,0 <sup>bc</sup>  | 12,33 ± 2,31 <sup>c</sup> | 6,66 ± 0,57 <sup>d</sup>   | 5,0 <sup>d</sup>          | 5,0 <sup>d</sup>         | 5,0 <sup>d</sup>         | 22,33 ± 2,89 <sup>a</sup> | 5,66 ± 0,57 <sup>d</sup> |
| <i>E. coli</i>        | 16,33 ± 1,15 <sup>b</sup>    | 12,66 ± 0,57 <sup>c</sup>  | 13,66 ± 1,15 <sup>b</sup> | 11 <sup>cd</sup>           | 8,33 ± 2,31 <sup>de</sup> | 6,66 ± 0,57 <sup>e</sup> | 6,0 <sup>e</sup>         | 25,67 ± 2,08 <sup>a</sup> | 6,33 ± 0,57 <sup>e</sup> |
| <i>S. typhimurium</i> | 16,00 ± 2,0 <sup>ab</sup>    | 13,0 ± 2,0 <sup>b</sup>    | 8,33 ± 2,31 <sup>c</sup>  | 6,33 ± 0,57 <sup>c</sup>   | 5,50 ± 0,50 <sup>c</sup>  | 5,33 ± 0,57 <sup>c</sup> | 5,33 ± 0,57 <sup>c</sup> | 17,33 ± 1,52 <sup>a</sup> | 5,33 ± 0,57 <sup>c</sup> |
| <i>S. aureus</i>      | 12,66 ± 0,57 <sup>b</sup>    | 10,33 ± 1,15 <sup>bc</sup> | 9,0 ± 2,0 <sup>cd</sup>   | 7,33 ± 1,52 <sup>cde</sup> | 6,0 ± 1,0 <sup>de</sup>   | 5,66 ± 1,15 <sup>e</sup> | 5,0 <sup>e</sup>         | 19,33 ± 0,57 <sup>a</sup> | 5,20 ± 0,34 <sup>e</sup> |

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes significam diferença estatística (p < 0,05).

A atividade antibacteriana está relacionada diretamente à presença de compostos fenólicos presentes na amostra de própolis, onde uma maior concentração desses compostos, determina uma maior atividade antibacteriana. A amostra de geoprópolis de *M. subnitida* analisada, mostrou alto teor de compostos fenólicos totais com presença marcante de taninos hidrolisáveis, flavonóides das classes das flavonas e flavonóis, e ainda, xantonas. O mecanismo de ação dos taninos está relacionado à capacidade de precipitar proteínas, inibindo enzimas microbianas (Scalbert, 1991). Já a atividade antibacteriana dos flavonóides parece estar relacionada à inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da função da membrana citoplasmática ou ainda, a inibição do metabolismo energético das bactérias (Cushnie & Lamb, 2005).

Sabe-se que a atividade antibacteriana de vários tipos de própolis contra bacilos gram-negativos é limitada (Gonsales et al., 2006). Apesar disso, o EHG de jandaíra testado foi capaz de formar halos de inibição tanto no crescimento de bactérias gram-negativas, como de gram-positivas. Todavia, as concentrações que mostraram inibição estavam muito acima de 0,1mg/mL (valor considerado mínimo para atribuição de atividade antibacteriana a um determinado extrato), considerando assim que o EHG mostrou baixos efeitos inibitórios contra as estirpes testadas. Apesar de no início as ceras terem sido retiradas do extrato hidroalcolico, o processo utilizado não é capaz de retirá-las em sua totalidade, ficando sempre algum resíduo. A presença de ceras residuais pode ter resultado em uma diminuição na difusão do EHG e para o estudo da atividade antibacteriana desse extrato, um método como o de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (MBC) teria sido mais apropriado, pois eliminaria os interferentes da difusão.

A análise dos resultados do teste de letalidade contra *Artemia salina* foi realizada através da relação entre a dose letal média, CL<sub>50</sub>, considerando-se citotóxico valores de CL<sub>50</sub> < 1000µg/mL, que indicam potencial atividade antitumoral (McLaughlin et al., 1993). O extrato etanólico da geoprópolis de jandaíra apresentou valor médio da CL<sub>50</sub> de 1282,61µg/mL, demonstrando ausência de toxicidade. Além da atividade antitumoral, a toxicidade contra *A. salina* mostra boa correlação com as atividades inseticida (Meyer et al., 1982) e anti-*Tripanossoma cruzi* (Alves et al., 2000). Por outro lado, uma baixa toxicidade ou ainda, ausência desta, pode ser considerada uma propriedade importante no uso de extratos vegetais em ambientes naturais. Estudos de toxicidade contra *A. salina* com própolis de meliponíneos mostraram que algumas amostras não foram citotóxicas e outras, principalmente aquelas ricas em diterpenos, foram tóxicas contra o microcrustáceo (Velikova et al., 2000; Sawaya et al., 2011).

## CONCLUSÃO

A prospecção fitoquímica revelou presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides das classes das flavonas e flavonóis, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres. Como ensaio preliminar, a abordagem fitoquímica tem se mostrado útil, no entanto, investigações acerca da elucidação dos compostos majoritários da geoprópolis de jandaíra, através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, são necessárias. O EHG mostrou alto teor de compostos fenólicos totais e potencial atividade anti-radicalar. A atividade antibacteriana foi demonstrada tanto em bactérias gram-positivas, quanto em gram-negativas, apesar das concentrações capazes de formar halos de inibição serem bastante superiores a do controle positivo usado, Gentamicina 10 µg. Devido a provável presença de resíduos de ceras, a avaliação da atividade antibacteriana do EHG seria mais

apropriada através de um método de microdiluição, que retira o interferente da difusão. No ensaio de toxicidade contra *Artemia salina*, o EHG mostrou-se pouco tóxico. Apesar da baixa atividade antibacteriana, este estudo abre perspectivas para futuros estudos de geoprópolis de jandaíra, um produto nordestino com potencial benefício para a saúde pública, dada a presença de compostos bioativos em sua composição.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa.

### REFERÊNCIAS

- Alves, T. M. A.; Silva, A. F.; Brandão, M.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia Júnior, A.; Zani, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- Bastos, E. M. A. F.; Galbiati, C.; Loureiro, E. M.; Scoaris, D. O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. *Instrução Normativa No 3, de 19 de janeiro de 2001*. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.
- Campos, V. A. C.; Santos Júnior, H. M.; Oliveira, D. F.; Carvalho, H. W. P.; Machado, A. R. T.; Tirelli, A. A. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1043-1049, 2011.
- Cardinault, N.; Cayeux, M. O.; Sert, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- Cunha, M. S.; Dutras, R. P.; Batista, M. C. A.; Abreu, B. V. B.; Santos, J. R.; Neiva, V. A.; Amaral, F. M. M.; Ribeiro, M. N. S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba). *Cadernos de Pesquisa*, v. 16, n. 3, 2010.
- Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L. C. C.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. *BMC Complementary Alternative Medicine*, v. 13, p. 23, 2013.
- Cushnie, T. P.; Lamb, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- Fabris, S.; Bertelle, M.; Astafyeva, O.; Gregoris, E.; Zangrando, R.; Gambaro, A.; Lima, G.; Stevanato, R. Antioxidant properties and chemical composition relationship of europeans and brazilians propolis. *Pharmacology*, v. 4, 2013.
- Franchin, M.; Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Koo, H.; De Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Geoprópolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 2, p. 709-15, 2012.
- 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.; Orsi, R. O.; Fernandes Júnior, A.; Rodrigues, P.; Funari, S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.
- Júnior, A. F.; Lopes, M. M. R.; Colombari, V.; Monteiro, A. C. M.; Vieira, E. P. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. *Ciência Rural*, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.
- Koneman, E. W. Trad. Cury, A. E. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. MEDSI, Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 5a. Ed.
- Liberato, M. C. T. C.; Alexandrino, C. D.; Batista, W. P.; Morais, S. M. Prospecção fitoquímica e caracterização de própolis do Ceará. In: 48º Congresso Brasileiro de Química, 2008, Rio de Janeiro, Brasil. *Anais do XLVIII Congresso Brasileiro de Química - Química na Proteção ao Meio Ambiente e à Saúde*.
- Liberio, S.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A. M.; Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N.; Nascimento, F. R. F.; Guerra, R. M. N.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geoprópolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.
- Matos, F. J. D. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: edições UFC, 2009.
- Mclaughlin, J. L.; Chang, C. J.; Smith, D. L. *Simple bench-top bioassays (BS e PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress*. Nova York: Kinghorn & Balandrini, p. 112-137, 1993.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- Miguel, M. G.; Antunes, M. D. Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, v. 3, n. 4, p. 479-95, 2011.
- NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Ninth Informational Supplement M100-S9, v. 19, 1999.
- Nogueira-Neto, P. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.
- Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O.; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Marcucci, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, v. 5, n. 1, p. 27, 2011.
- Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

Scalbert, A. Monties, B.; Janinet, G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, n. 5, p. 1324-1329, 1989.

Sforcin, J. M.; Bankova, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 253-60, 2011.

Silva, T. M. S.; Santos, A. F. P.; Rodrigues, A. E.; Silva, E. M. S.; Silva, G. S.; Novais, J. S.; Santos, F. A. R.; Câmara, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 10-18, 2013.

Souza, B. A.; Carvalho, C. A. L.; Alves, R. M. O.; Dias, C. S.; Clarton, L. *Mundurí (Melipona asilvai): a abelha sestrosa*. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia., 2009.

Souza, S. A.; Câmara, C. A.; Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1-5, 2013.

Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujungiev, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 55, n. 9/10, p. 785-789, 2000.