

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana

Ivan Paulo Akatsu

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae):
composição química e atividade antimicrobiana**

Ivan Paulo Akatsu

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Entomologia.**

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Akatsu, Ivan Paulo

Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana, Ribeirão Preto, 2009. 115f; il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP – Departamento de Biologia.

Orientador: Ademilson Espencer Egea Soares

1. *Scaptotrigona*. 2. Resinas vegetais. 3. Atividade antimicrobiana..

RESUMO

Neste trabalho foram abordados quatro objetivos. Primeiro: Averiguar indícios da origem vegetal e composição química das resinas da própolis de colméias com *Scaptotrigona sp* (Barra do Corda, MA) e *Scaptotrigona aff. depilis* (Estação Experimental de Luis Antônio, SP). Segundo: Apurar a existência de atividade antimicrobiana da resina da própolis de *Scaptotrigona sp.* e *S. aff. depilis* contra microorganismos de interesse clínico. Terceiro, verificar a atividade antimicrobiana das resinas da própolis de *Scaptotrigona sp.* e *S. aff. depilis*, contra microorganismos isolados das próprias colméias. Averiguar a composição química de resina vegetal após a manipulação destas por *Scaptotrigona aff. depilis*. Através de “ESI(-) fingerprints” indicou-se que as resinas coletadas por *Scaptotrigona sp.* originaram-se em parte de *Schinus terebenthifolius* e contém terpenos com grupos ácidos. Já a resina coletada por *S. aff. depilis* veio em parte de conífera, provavelmente de *Pinus sp.* e possui os ácidos E/Z comúnicico, agatálico e agático. As resinas das própolis de *Scaptotrigona sp.* e *S. aff. depilis* não apresentaram atividade contra microorganismos de interesse clínico. As resinas das própolis de *S. aff. depilis* inibiram todos os microorganismos testados e as de *Scaptotrigona sp.* um fungo filamentosos. Acessoriamente se testou a atividade de mel, alimento larval e pólen fermentado de cada *Scaptotrigona* contra os microorganismos anteriores. O alimento larval de *Scaptotrigona sp.* mostrou atividade contra todos os microorganismos e o alimento de *S. aff. depilis* apenas foi ineficaz contra um fungo filamentosos. Através de caracterização por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) verificou-se que de *Hymenaea courbaril* (jatobá), provavelmente manipulada em própolis por *Scaptotrigona aff. depilis* continha triterpenos. Também verificou-se que a resina de jatobá apresentou diterpenos e um sesquiterpeno. Apesar destas resinas das própolis terem se mostrado clinicamente ineficazes, as investigações com própolis de meliponíneos devem continuar. Todos os elementos analisados mostraram atividade alguma contra os microorganismos associados à colônia. Destacam-se na contribuição da sanidade do ninho o alimento larval, independente de abelha, da própolis de *Scaptotrigona aff. depilis*, que contém provavelmente resina de *Pinus sp.*, que atesta os registros anteriores de atividade

antimicrobiana desta resina. A verificação das diferenças entre a resina de jatobá e a provável própolis originada dela merecem maiores investigações.

ABSTRACT

In the present study, we aimed at four objectives. First: Inquiring indications of the plant origin and chemical composition of the propolis resin of *Scaptotrigona sp* hives from Barra do Corda, MA, Brazil and of *Scaptotrigona aff. depilis* hives placed at Estação Experimental de Luis Antonio, SP, Brazil. Second: Investigating the existence of antimicrobial activity of *Scaptotrigona sp*'s and *Scaptotrigona aff. depilis*' propolis resins against microorganisms of clinical interest. Third: Verifying the antimicrobial activity of *Scaptotrigona sp*'s and *Scaptotrigona aff. depilis*' propolis resins against microorganisms isolated from the proper hives. Fourth: Ascertaining the chemical composition of the plant resins after their manipulation by *Scaptotrigona aff. depilis*. Through ESI(-) fingerprints we indicated that resins collected by *Scaptotrigona sp* are partially originated from *Schinus terebenthifolius* and present terpenes with acid groups. The resins collected by *S. aff. depilis*, come from, partially, a conifer, probably *Pinus sp* and have E/Z communic acids, agathalic acid and agathic acid. *Scaptotrigona sp*'s and *S.aff. depilis*' propolis resins have not showed activity against microorganisms of clinical interest. *S. aff. depilis*' propolis resins inhibited all of the tested microorganisms and *Scaptotrigona sp*'s propolis resins inhibited a filamentous fungus. Besides we tested the activity of honey, larval food and fermented pollen of each *Scaptotrigona* against the microorganisms. *Scaptotrigona sp*'s larval food presented activity against all microorganisms and *S. aff. depilis*' larval food was just ineffective against a filamentous fungus. Through characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) we verified that *Hymenaea courbaril* (jatobá) resins, probably manipulated at propolis by *Scaptotrigona aff. depilis* had triterpenes. We also could verify that the resin of *Hymenaea courbaril* presented diterpenes and a sesquiterpene. Although these propolis resins had showed to be clinically ineffective, investigations with stingless bees' propolis must go on. All of the elements analysed showed some activity against the microorganisms associated to the colony. It was possible to observe that the main elements which contribute to the health of the nest are the larval food, independent of the bee specie, and the *Scaptotrigona aff. depilis* ' propolis which has, probably, *Pinus sp* resins, testifying previous registers of the antimicrobial

activity of this resin. The existence of differences between the resin of *Hymenaea courbaril* and its probable originated propolis must be better investigated.

SUMÁRIO

RESUMO	03
ABSTRACT	05
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS.....	11
1.1.1 Composição química das resinas da própolis das vedações.....	11
1.1.2 Atividade antimicrobiana das resinas das própolis das vedações.....	11
1.1.3 Resinas das vedações e sanidade do ninho.....	12
1.1.4 Manipulação das resinas e sua composição química.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 O GÊNERO <i>Scaptotrigona</i> Moure, 1942, E MELIPONICULTURA.....	13
2.2 RESINAS VEGETAIS.....	16
2.3 PRÓPOLIS.....	26
2.4 INSETOS EUSSOCIAIS E SANIDADE DOS NINHOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 LOCAL.....	30
3.2 METODOLOGIA.....	31
3.2.1 Composição química das resinas da própolis das vedações.....	31
3.2.1.1 Obtenção das amostras de própolis.....	31
3.2.1.2 Avaliação da composição química das resinas das própolis.....	31
3.2.1.3 Informações adicionais: massa das própolis, proporção de resina na própolis, realocação da própolis.....	33
3.2.2 Atividade antimicrobiana das resinas da própolis das vedações.....	34
3.2.2.1 Obtenção da própolis e extração de resinas.....	34
3.2.2.2 Ensaios para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico.....	35
3.2.3 Resinas das vedações e sanidade da colônia.....	41
3.2.3.1 Isolamento de fungos filamentosos.....	41
3.2.3.2 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados.....	42
3.2.3.3 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra fungos isolados.....	47
3.2.3.4 Isolamento de bactérias.....	48
3.2.3.5 Avaliação da atividade das resinas contra bactérias isoladas.....	50
3.2.3.6 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra bactérias isoladas.....	51
3.2.4 Manipulação das resinas e sua composição química.....	54

4 RESULTADOS	56
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES..	56
4.1.1 Composição química das resinas das própolis.....	56
4.1.2 Informações adicionais: massa da própolis, proporção de resina na própolis, realocação da própolis.....	56
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES.....	59
4.2.1 Ensaios para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico.....	59
4.3. RESINAS DAS VEDAÇÕES E SANIDADE DA COLÔNIA.....	60
4.3.1 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados.....	60
4.3.2 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra fungos isolados.....	60
4.3.3 Avaliação da atividade das resinas contra as bactérias isoladas.....	67
4.3.4 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra as bactérias isoladas.....	67
4.4 MANIPULAÇÃO DAS RESINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	72
5 DISCUSSÃO	78
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES.	78
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES.....	80
5.2.1 Ensaios para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico.....	80
5.3 RESINAS DAS VEDAÇÕES E SANIDADE DA COLÔNIA.....	83
5.3.1 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados.....	83
5.3.2 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra os fungos isolados.....	84
5.3.3 Avaliação da atividade das resinas contra as bactérias isoladas.....	85
5.3.4 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra as bactérias isoladas.....	86
5.3.5 Considerações gerais.....	87
5.4 MANIPULAÇÃO E MUDANÇA DO PERFIL QUÍMICO DAS RESINAS.....	89
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICES	108
ANEXOS	110

INTRODUÇÃO

Dentre as abelhas sem ferrão encontra-se o gênero *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae), que é amplamente distribuído pela região Neotropical. Os meliponíneos, bem como outros grupos de abelha utilizam resinas vegetais para a construção de seus ninhos. Os meliponíneos utilizam as resinas misturadas em diferentes quantidades de cera. Comumente denomina-se de própolis as porções de resina encontradas nos ninhos de meliponíneos puras ou misturadas a uma quantidade de cera menor que no cerume. A própolis dos meliponíneos encontra-se nas calafetações do ninho (MICHENER, 1974; ROUBIK, 1989; NOGUEIRA-NETO, 1997). A utilização do termo própolis relacionado a meliponíneos, provavelmente ocorreu por analogia com *Apis mellifera* com a qual o termo própolis é historicamente associado (GARY, 1975) A própolis de *A. mellifera* já possui um considerável número de estudos em relação a várias atividades biológicas bem como de caracterização da composição química (BANKOVA, DE CASTRO, MARCUCCI, 2000; FARRÉ, FRASQUET e SANCHEZ, 2004)). No caso da própolis dos meliponíneos estes tipos de estudos começam a ganhar volume nos últimos anos (BANKOVA e POPOVA, 2007). As resinas vegetais tem a função primária de defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Por isso acredita-se que estes sejam variáveis importantes no processo seletivo, conduzindo as resinas a características químicas que lhes conferem, por exemplo, atividade antimicrobiana (LANGENHEIM, 2003). Esta capacidade antimicrobiana poderia continuar a ocorrer nas própolis encontradas nos ninhos de meliponíneos, auxiliando na manutenção da sua sanidade. Existem indícios que isto ocorra em ninhos de (CHRISTE, *et al.*, 2003). Ainda não existem muitas informações sobre as particularidades que envolvem a manipulação das resinas pelos meliponíneos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Composição química das resinas da própolis das vedações

BANKOVA *et al.* (1998a) encontraram variações sazonais na composição química de amostras de própolis utilizadas por *Apis mellifera*, oriundas da mesma região do Brasil. Isto pode ocorrer porque as resinas estão sujeitas a variações temporais na sua produção (LANGENHEIM, 2003). Assim sendo, a disponibilidade de resinas para as abelhas sem ferrão também pode variar temporalmente (HOWARD, 1985). E ainda BANKOVA, de CASTRO e MARCUCCI (2000) apontam que a origem vegetal de resinas utilizadas por abelhas pode ser inferida através de diferenças apontadas por análises químicas. Portanto, justifica-se aventar o seguinte objetivo de trabalho:

- Averiguar indícios da origem vegetal e composição química das resinas da própolis que compõem as vedações de colméias com *Scaptotrigona sp.* e *Scaptotrigona aff. depilis*, instaladas em duas localidades, a partir de amostras coletadas durante um ano.

1.1.2 Atividade antimicrobiana das resinas das da própolis das vedações

Existem indicações que apontam atividade da própolis produzida por abelhas sem ferrão, contra microorganismos de interesse clínico (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; VELIKOVA *et al.*, 2000; FERNANDES Jr. *et al.*, 2001). Já existem projetos de desenvolvimento comunitário baseados em produtos de abelhas sem ferrão. Logo, a indicação de novas possibilidades de uso dos produtos das abelhas sem ferrão, pode colaborar no desenvolvimento de comunidades tradicionais e rurais como já ocorre em relação ao mel (VILLAS-BÔAS e MALASPINA, 2005; PIRES, DRUMMOND e LACERDA, 2006). Por conseguinte, propõe-se o seguinte objetivo de trabalho:

- Apurar a existência de atividade antimicrobiana da resina da própolis de vedações de colméias de *Scaptotrigona sp.* e *Scaptotrigona aff. depilis*, instaladas em duas localidades do Brasil, contra microorganismos de interesse clínico.

1.1.3. Resinas das vedações e sanidade do ninho

No interior dos ninhos de insetos eussociais, como por exemplo, formigas muitas vezes encontra-se uma grande concentração de indivíduos, além de condições ambientais ótimas para o desenvolvimento de patógenos (WHEELER, 1910; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Porém, entre os insetos eussociais existem estratégias para manter a sanidade dos ninhos. Entre elas observa-se a retirada de mecônios do ninho, comportamento que é visto em abelhas sem ferrão (ROUBIK, 1989; DUNCAN e HART, 2009). Bem como se verificou que formigas retiram ou isolam cadáveres e afastam material em decomposição do ninho (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Há também indícios que existe comunicação sobre a existência de patógenos entre cupins da espécie *Zootermopsis gusticollis* (ROSENGAUS et al., 1998). Segundo CHRISTE et al. (2003) formigas *Formica paralugubris* utilizam resinas vegetais para diminuir a quantidade de microorganismos em seus ninhos. Por isso, se torna plausível estabelecer o seguinte objetivo de trabalho:

- Inquirir se a atividade antimicrobiana, das resinas extraídas da própolis dos ninhos de *Scaptotrigona*, auxilia na manutenção da sanidade dos mesmos, através da verificação da atividade das resinas contra microorganismos isolados de seus próprios ninhos.

1.1.4 Manipulação das resinas e sua composição química

Foi observado que operárias de *Plebeia emerina* que manipulam própolis possuem glândulas salivares e intramandibulares ativas (SANTOS, 2007). A autora propõe que as secreções das glândulas intramandibulares mantenham a viscosidade da própolis facilitando a manipulação destas pelas operárias. A autora também propõe que as glândulas intramandibulares também teriam alguma função associada à manipulação de própolis/resinas. Assim, para averiguar maiores detalhes da manipulação de resinas por *Scaptotrigona aff. depilis* propõe-se:

- Averiguar a composição química de resinas após a manipulação destas por *Scaptotrigona aff. depilis* e comparar com a composição da resina antes da manipulação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Scaptotrigona* Moure, 1942, E MELIPONICULTURA

O grupo de espécies sob o gênero *Scaptotrigona*, pertence ao grupo de abelhas eussociais (MICHENER, 1974) comumente denominado de “abelhas indígenas sem ferrão” (NOGUEIRA-NETO, 1953). MOURE (1942) propôs o estabelecimento de *Scaptotrigona* como sendo este um novo subgênero de *Trigona* (Meliponidae). O autor apresenta os caracteres que justificariam a separação deste do subgênero *Trigona* (*Nannotrigona*) (SCHWARZ, 1938). O autor também descreve a nova espécie *Trigona* (*Scaptotrigona*) *depilis*, a qual se reuniria a *T. postica* e a *T. tubiba* sob o novo subgênero. MOURE (1951) dispôs as abelhas sem ferrão na subfamília Meliponinae (Apidae), diferente de MICHENER (1944) que as propôs como tribo Meliponini (Apidae, Apinae) e SCHWARZ (1948) que as considerou como família (Meliponidae). MOURE (1951) também considerou como havendo doze gêneros na subfamília para região neotropical, alguns dos quais apresentados como subgênero por SCHWARZ (1948). Assim sendo *Nannotrigona* torna-se gênero, sendo *Scaptotrigona* considerado subgênero deste. MOURE (1961) propôs Meliponinae com duas tribos (Meliponini e Trigonini) e *Scaptotrigona* ainda continua como subgênero de *Nannotrigona*. CAMARGO E MOURE (1988) reforçam a posição em favor da elevação de subgêneros de Trigonini da região neotropical para gênero. Em SILVEIRA, MELO e ALMEIDA (2002) o gênero *Scaptotrigona*, e as demais abelhas sem ferrão, foram classificados na tribo Apini e subtribo Meliponina (Apidae, Apinae). Na proposta de rearranjo da classificação das abelhas defendida por MELO e GONÇALVES (2005), todas as abelhas são reunidas em uma única família (Apidae) e as famílias tradicionalmente reconhecidas são rebaixadas a subfamília. Nesta proposta a subtribo Meliponina mantém seu *status*. MICHENER (2007) mantém as abelhas sem ferrão na tribo Meliponini (Apidae, Apinae). O autor também expressa sua hesitação em manter *Scaptotrigona* como gênero. Pois, crê que *Scaptotrigona* deveria ser classificado como subgênero de *Nannotrigona*.

ROUBIK, SEGURA e CAMARGO (1997) utilizando informações morfológicas propõem que *Scaptotrigona* é grupo irmão de *Meliwillea*, um novo gênero descrito pelos autores. Isto é confirmado pela filogenia de abelhas sem ferrão inferida por COSTA *et al.* (2003), a partir de seqüências de DNA mitocondrial. Em ambas as

filogenias *Nannotrigona* não é grupo-irmão de *Scaptotrigona*+*Meliwillea*. Isto pode implicar em revisão das propostas de relação entre *Scaptotrigona* e *Nannotrigona*, apresentadas em SCHWARZ (1938), MOURE (1961) e MICHENER (2007).

Scaptotrigona possui distribuição através da região Neotropical, do centro-sul do México ao norte da Argentina (SCHWARZ, 1948; MOURE, URBAN e MELO, 2007). MOURE, URBAN e MELO (2007) apresentam 21 espécies bem definidas sob o gênero *Scaptotrigona*. MICHENER (2007) indica que o gênero apresentaria por volta de 24 espécies. Segundo MOURE, URBAN e MELO (2007), as espécies que ocorrem no Brasil são: *S. affabra*, *S. bipunctata* (nomes comuns: “canudo”, “tapesuá”, “tubuna”), *S. depilis* (“canudo”, “mandaguari”, “tapezuá”, “tombuna”, “tubiba”), *S. fulvicutis*, *S. polystica* (“bui-kaiaki”, “imerê-ti”, “mijui”, “bijui”), *S. postica*, *S. tubiba* (“tubi”, “tapissuá”, “tubi bravo”, “tuibá”) e *S. xantotricha* (“abelha fedente”, “mandaguari amarelo”, “trompeta”, “tujumirim”, “mandagoari”). SILVEIRA, MELO e ALMEIDA (2002) pontuam que existem em todo o Brasil diversas espécies ainda não descritas muitas delas sendo de complexos de difícil separação.

Scaptotrigona é encontrada nidificando em cavidades pré-existentes, em árvores e em construções humanas (CAMARGO, 1970; WILLIE e MICHENER, 1973; ROUBIK, 1979; ROUBIK, 1983, FREITAS, 2001). A entrada do ninho é constituída por um tubo no qual algumas operárias se posicionam ao longo da borda para defesa do ninho. Na parte interna, os ninhos estão estruturados com favos de cria em posição horizontal, os quais estão envolvidos em um invólucro. Ao redor dessas estruturas estão dispostos os potes de mel e pólen. As estruturas antes descritas são construídas com cerume (cera mais resinas vegetais). Os ninhos ainda possuem revestimentos e vedações associados a resinas vegetais (SCHWARZ, 1948; WILLIE e MICHENER, 1974; ROUBIK, 1979; WILLIE, 1983; NOGUEIRA-NETO, 1997; ROUBIK, 2006). Muitas espécies de *Scaptotrigona* podem ser consideradas agressivas, a se deduzir pelo seu nome comum, “enredapelos”, em países de língua espanhola (MOURE, URBAN e MELO, 2007). Bem como pelas descrições de agressividade apresentadas por CAMARGO (1970), MICHENER (1974); ROUBIK (1979); CAMARGO e POSEY (1990). Os ninhos de *Scaptotrigona* podem atingir dimensões consideráveis e conter grande número de indivíduos. Como, por exemplo, *S. pectoralis* (20 favos e 5201 indivíduos), *S. tubiba* (25 e 1764 indivíduos) e *S. barrocoloradensis* (28 favos e 7827 indivíduos) (ROUBIK, 1979; ROUBIK, 1983).

No México, desde a época pré-hispânica, a meliponicultura é praticada pelos Maias e outras etnias, como os Nautls. Observou-se *S. pectoralis*, *S. mexicana* e *S. helwegeri* entre as espécies criadas, além de *Melipona beccheii* e *Nannotrigona perilampoides* (SCHWARZ, 1948; ACERETO e FREITAS, 2005; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006). No Brasil os povos indígenas, ao que parece, praticavam, comumente, o extrativismo dos elementos produzidos pelos meliponíneos, dada a indicação de MAACK (1968) em relação aos Guarani-Carijós. Segundo KEER, CARVALHO e NASCIMENTO (1996) *M. compressipes*, no Maranhão, e *M. scutellaris* em outros estados da região Nordeste foram criadas por diversas etnias. CAMARGO e POSEY (1990) listaram as espécies de abelhas sem ferrão exploradas, em geral, de forma extrativista, pelos Kayapós, ainda que por vezes fossem criadas. Neste trabalho citam os conhecimentos dos Kayapós a respeito de ecologia, biologia e morfologia e taxonomia destas abelhas bem como aspectos culturais influenciados pelos meliponíneos e outros insetos sociais. Entre as abelhas utilizadas estavam *S. polystica* (imerê-ti) e *S. nigrohirta* (*nomina nuda* segundo MOURE, URBAN e MELO, 2007) (imerê-nhy-kamrek) das quais os Kayapós consomem o mel, pólen, larvas e pupas, além de utilizar o cerume na confecção de utensílios. Tendo em vista a verificação da possibilidade de manejo de *S. aff. depilis* YAMAMOTO (2007) levantou informações a respeito da produção de mel em *S. aff. depilis*. Isto porque CORTOPASSI-LAURINO *et al.* (2006) apontam que *Scaptotrigona* ao lado de *Melipona*, *Cephalotrigona* e *Tetragona* são os gêneros neotropicais que possuem considerável produção de mel. YAMAMOTO (2007) também averiguou as propriedades físico-químicas e parâmetros microbiológicos os quais se mostraram positivos. Adicionalmente, autora levantou indícios de boa aceitação do sabor do mel.

2.2 RESINAS VEGETAIS

LANGENHEIM (2003) define, segundo a própria autora de forma funcional, resinas vegetais como sendo "...uma mistura lipossolúvel de compostos fenólicos ou terpenóides secundários que são (1) usualmente secretados por estruturas especializadas localizadas tanto internamente quanto na superfície da planta e (2) de potencial significado em interações ecológicas". Os terpenóides, os quais compõem também resinas vegetais, constituem-se na categoria mais abundante e diversa de metabólitos secundários das plantas (McGARVEY e CROTEAU, 1995; 1991; DUDAREVA, PICHERSKI e GERSHENZON, 2004). Os terpenóides (ou isoprenóides) são reunidos em um mesmo grupo por possuírem como elemento estrutural o isopreno (C_5H_8), que é unido através de uma via de síntese comum (LANGENHEIM, 2003) A síntese dos terpenóides que compõem as resinas, e os terpenóides em geral, pode ocorrer através de duas vias (fig.1). A primeira é a via do mevalonato (MVA) a partir da acetil-CoA (NEWMAN e CHAPPELL, 1999; DUDAREVA, PICHERSKI e GERSHENZON, 2004). A segunda é a via do metileritritol fosfato (MEP) a partir do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (ROMHER, 1999; DUDAREVA, PICHERSKI e GERSHENZON, 2004). Na via do mevalonato três moléculas de acetil-CoA são ligadas, (piro)fosforiladas, descarboxiladas e desidratadas para produzir isopentenil difosfato (IPP) (LANGENHEIM, 2003). O IPP é a unidade básica C_5 dos terpenóides (OGURA e KOYAMA, 1998). O dimetilalil difosfato (DMAPP), que é isômero do IPP, ao qual as unidades de IPP podem ser adicionadas em passos seqüenciais de alongamento da cadeia (fig.1). Estas reações são mediadas por enzimas chamadas de preniltransferases (OGURA e KOYAMA, 1998). Assim, uma unidade de DMAPP se combina com uma de IPP para formar o geranyl difosfato (GPP) que é o precursor C_{10} de todos os monoterpênos. Caso haja a adição de duas moléculas de IPP ao DMAPP, se obtém o farnesil difosfato (FPP) que se constitui no precursor C_{15} de todas os sesquiterpênos. Similarmente, uma tripla adição de IPP ao DMAPP, resulta no precursor C_{20} dos diterpênos, o geranyl-geranyl difosfato (GGPP). A ligação de duas moléculas (dimerização) de FPP resulta em compostos C_{30} , os triterpênos. Existem ainda os tetraterpênos (C_{40}) e os politerpênos ($C_{n>40}$), sobre os quais não existem indicações que sejam constituintes de resinas (LANGENHEIM, 2003). Ocorre uma

compartimentalização das vias do MVA e MEP, bem como a produção dos diferentes tipos de terpenóides (fig.1). Dentro do retículo endoplasmático e no citoplasma (citósol) ocorre a via do MVA, cujos IPP(s) originarão FPP e a partir deste sesquiterpenos e triterpenos (fig.1). Já no interior dos plastídios se desenvolve a via do MEP, cujos IPP(s) formarão GPP e partir deste monoterpênos e diterpenos (fig.1) (NEWMAN e CHAPPELL, 1999; LANGENHEIM, 2003; DUDAREVA, PICHESKI e GERSHENZON, 2004; CHENG *et al.*, 2007).

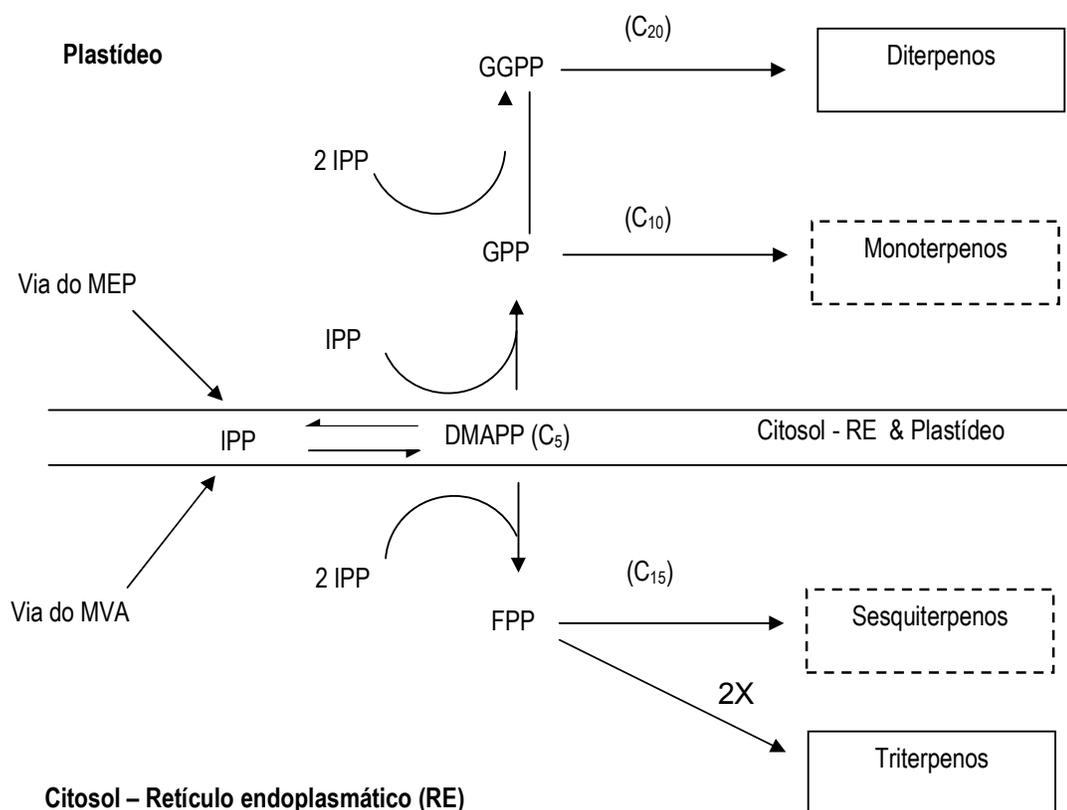


Figura 1 - Biossíntese de terpenóides representada de acordo com a compartimentalização das duas vias. Os terpenos presentes nas resinas estão nas caixas (tracejadas terpenos voláteis; linha sólida não voláteis). **DMAPP** – dimetilalil difosfato; **MAV** – via do ácido mevalônico; **MEP** – via metileritritol fosfato; **FPP** – farnesil difosfato; **GPP** – geranyl difosfato; **GGPP** – geranyl-geranyl difosfato; **IPP** – isopentenil difosfato. Baseado em LANGENHEIM (2003).

Os fenólicos compõem um grupo de compostos que possuem um anel aromático ao qual pode estar ligado grupos substituintes hidroxila, carboxila ou metoxila e muitas vezes outros anéis não aromáticos (SALISBURY e ROSS, 1992). Um esquema das vias de síntese de fenólicos em plantas e que também vão compor as resinas é apresentado na figura 2 (LANGENHEIM, 2003). A via do ácido chiquímico produz aminoácidos com anel aromático, como a fenilalanina (fig. 2). A fenilalanina é convertida em ácido cinâmico, que é composto por um anel aromático no qual se liga um radical de três carbonos (propil). Esta conversão é um processo que leva a formação de vários componentes das resinas fenólicas e é catalizada pela enzima fenilalanina amônia liase. Assim, ocorre a formação de fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico, que também são as unidades básicas para a formação de outros fenólicos, na via dos fenilpropanóides (fig. 2). Os fenilpropanóides podem apresentar formas diméricas. Outra categoria de fenólicos encontrados nas resinas são os flavonóides. Estes são baseados em uma estrutura de dois anéis benzênicos conectados por uma cadeia C_3 . Um dos anéis vem da via do ácido chiquímico e o outro é produzido através de unidades de acetato geradas na via do ácido malônico (fig. 2). Muitas vezes a cadeia C_3 cicla com uma hidroxila adjacente, formando um anel heterocíclico. Uma subclasse de flavonóides que ocorre nas resinas são as flavonas, que se caracterizam pela falta de um açúcar (aglicona) substituinte. Os fenólicos podem apresentar terpenos (prenil) ligados a sua estrutura, desta forma são chamados prenilados fenólicos. Os terpenóides em geral estão ligados diretamente ao anel aromático, mas podem estar ligados ao grupo fenólico (HELDT, 2005). WOLLENWEBER e DIETZ (1981), observaram que flavonóides ocorrem junto a sesquiterpenos e triterpenos. Esta observação pode ser somada à proposição de que enzimas que participam da síntese de fenilpropanóides e flavonóides se agrupariam no retículo endoplasmático (HRAZDINA e JENSEN, 1984; WINKEL-SHIRLEY, 1999). Desta forma é possível propor que flavonóides e terpenóides são sintetizados em locais próximos nas células vegetais. Em relação aos tecidos das plantas, as resinas podem ser armazenadas em estruturas secretoras internas (dutos), isto comumente ocorre em coníferas e angiospermas tropicais. Nestes grupos, as estruturas secretoras estão revestidas por células parenquimáticas chamadas de células epiteliais, nas quais os componentes das resinas são sintetizados (LANGENHEIM *et al.* 1978). Estes dutos ganham a denominação de canais se forem alongados e de bolsas ou cistos se forem arredondados

(DICKINSON, 2000; LANGENHEIM, 2003). As resinas terpênicas produzidas em estruturas secretoras internas podem ser distinguidas em relação a sua produção em constitutivas (pré-formadas e armazenadas) ou induzidas (reação a trauma) (LEVIN, 1976; LEWINSOHN, GIJZEN e CROTEAU, 1990). Na superfície das plantas as estruturas secretoras de resinas são representadas por tricomas glandulares e células epidérmicas (DICKINSON, 2000; LANGENHEIM, 2003). Estas estruturas são encontradas apenas em angiospermas, em geral de hábito arbustivo (LANGENHEIM, 2003).

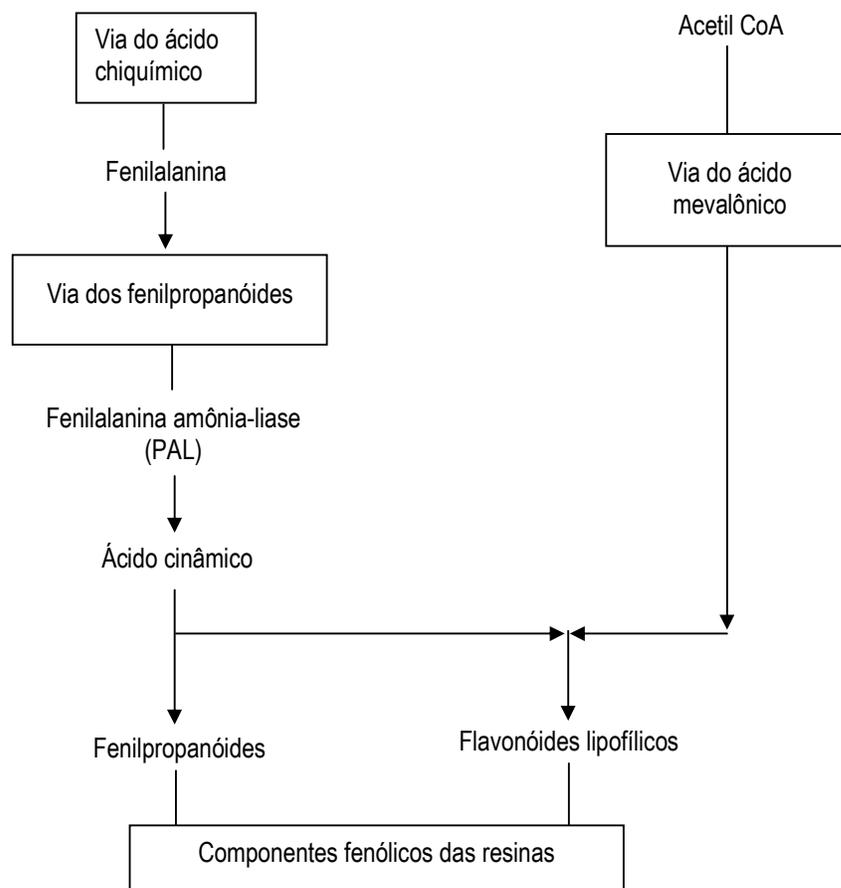


Figura 2 – Esquema geral da biossíntese dos maiores grupos de fenólicos presentes nas resinas. Baseado em LANGENHEIM (2003).

Comumente se propõe que a função primária desempenhada pelas resinas, nas plantas que as produzem, seja de defesa contra herbívoros e patógenos (LANGENHEIM, 1969; LEVIN, 1976; AMBRUSTER *et al.*, 1997). A defesa pode ter natureza mecânica, como ocorre com as resinas constitutivas de coníferas. Estas resinas são as primeiras a serem liberadas, podendo deslocar e sepultar insetos herbívoros e selar injúrias á entrada de microorganismos. Isto ocorre porque logo que liberadas, estas resinas são viscosas e à medida que mono e sesquiterpenos, que são voláteis, evaporam a fração de diterpenos se solidifica (NORIN, 1972; PHILLIPS e CROTEAU, 1999; TRAPP e CROTEAU, 2001; LANGENHEIM, 2003). A defesa pode exibir ação química, como a resina das folhas de *Hymenaea* que é composta por sesquiterpenos, alguns dos quais inibem o consumo das folhas (LANGENHEIM, FOSTER e MCGINLEY, 1980).

Em LANGENHEIM (2003) é possível distinguir três exemplos de sistemas de relações entre planta-herbívoro/patógeno mediadas por resinas. O primeiro exemplo apresenta *Pinus ponderosa* (Pinaceae), uma conífera da América do Norte. Existem evidências da ação de insetos herbívoros no Triássico Superior, há 220 milhões de anos (SCOTT, ANDERSON e ANDERSON, 2004; KEELING e BOHLMANN, 2006). Bem como há evidências que a produção de resina por coníferas remonta ao Cretáceo Inferior, há 120-135 milhões de anos (ALONSO *et al.*, 2000). Dentro deste período de tempo, é plausível o desenvolvimento de diferentes cenários na relação coníferas-herbívoros/patógenos, como os observados em *Pinus ponderosa*. STURGEON (1979) observou no estado da Califórnia (EUA) variações na quantidade de monoterpenos da resina constitutiva em *P. ponderosa*. Os monoterpenos são os principais componentes da fração volátil das resinas de coníferas (TRAPP e CROTEAU, 2001). STURGEON (1979) propôs que estas variações são provocadas pela pressão dos hábitos alimentares do besouro brocador *Dendroctonus brevicomis* (Scolytidae). Os adultos de besouros brocadores, Scolytidae, constroem galerias no tronco de árvores onde se acasalam, a seguir, suas larvas constroem túneis menores nos quais se alimentam, por exemplo, de seiva (HILL, 1997). STURGEON (1979) verificou que populações de pinheiros que passaram por ataques grandes de *D. brevicomis*, apresentam concentrações maiores de limoneno. Este tem baixa concentração em populações nas quais não houve ataque pesado. Isto porque se sabe que limoneno repele *D. brevicomis*. Porém, também se observou que dentro das populações mais atacadas, a

quantidade de α -pineno varia mais que nas populações menos atacadas. Como α -pineno é precursor de feromônio para os besouros STURGEON (1979) propôs que *D. brevicomis* tenderia a se alimentar em árvores com baixas concentrações de limoneno e altas de α -pineno, que é o fenótipo mais comum antes do ataque. Dessa forma, num primeiro momento a seleção seria direcional no sentido de fenótipos com alta concentração limoneno e baixa de α -pineno. Assim, a seguir, indivíduos com alta concentração de limoneno vão se tornando comuns. Isto aumenta as chances de surgirem árvores com fenótipo com concentrações altas de limoneno e α -pineno, caracterizando seleção dependente de frequência. Um estudo similar foi realizado por STURGEON e MITTON (1986) no estado do Colorado. Porém não se constatou diferenças entre a composição de monoterpenos da resina de populações de *P. ponderosa* var. *scopulorum* (LANGENHEIM, 2003) atacadas por *Dendroctonus ponderosae* e a composição de árvores tomadas ao acaso de áreas adjacentes. Os autores também verificaram que a variação na composição das resinas de populações atacadas na Califórnia (STURGEON, 1979) é três vezes maior que a do Colorado. Bem como se observou que *D. ponderosae* pode atacar igualmente *P. contorta* var. *latifolia* (LANGENHEIM, 2003) e *P. flexilis*, o que não ocorria na Califórnia, porque existe apenas *P. ponderosa*. Adicionalmente sabe-se que a capacidade de digestão de terpenos por *D. brevicomis* e *D. ponderosae* é similar. Pelas inferências anteriores STURGEON e MITTON (1986) aventaram que a pressão exercida por *D. ponderosae* resulte numa variação entre as espécies de *Pinus*, mas não dentro da população de uma determinada espécie. Fora o dano direto, os besouros brocadores (Scolytidae) podem ser vetores de fungos patogênicos (Ophiostomataceae), que aumentam os danos às coníferas (PHILLIPS e CROTEAU, 1999). Os terpenos das resinas também podem inibir o crescimento de alguns destes fungos (BRIDGES, 1987). O esquilo *Sciurus aberti* também parece gerar pressões seletivas sobre as resinas defensivas de *P. ponderosa*. *S. aberti* se alimenta de tecidos abaixo da casca de ramos superiores de *P. ponderosa* (SNYDER, 1992). O autor verificou que árvores atacadas por esquilos têm fluxo de resina menor que árvores não atacadas. Igualmente notou-se que as concentrações de dois monoterpenos (β -pineno e β -felandreno) são menores nas árvores atacadas. O autor em experimento com iscas embebidas e não embebidas em β -pineno e β -felandreno, observou que esquilos preferem as não embebidas. Estas evidências somadas ao fato de que árvores atacadas produzem menos estruturas reprodutivas

e sementes, além de crescerem menos (SNYDER, 1993), apontam que *S. aberti* produz seleção direcional que pode aumentar a frequência de fenótipos de árvores com maior fluxo de resina com concentrações maiores de β -pineno e β -felandreno. O segundo exemplo apresentado por LANGENHEIM (2003) trata do gênero *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). O gênero *Hymenaea* inclui as árvores denominadas popularmente de "jatobá". Vestígios de âmbar indicam que o gênero está presente ao menos desde a metade do Terciário (LANGENHEIM, 1969; LANGENHEIM, 2003). O gênero distribui-se por áreas tropicais da região Neotropical e leste da África (LANGENHEIM e LEE, 1974). As resinas de *Hymenaea* são compostas de sesquiterpenos na fração volátil e de diterpenos na não volátil (LANGENHEIM, 2003). LANGENHEIM *et al.* (1978) analisaram indivíduos de diferentes populações do de *Hymenaea courbaril* no Brasil, Costa Rica e México. Observou-se que os jatobás apresentaram resinas constitutivas com diferentes composições ao longo de tecidos e órgãos. Os autores propuseram que isto ocorre devido a pressões de diferentes herbívoros e patógenos sobre as diferentes partes da planta. Assim, previram que as resinas mais viscosas do tronco que são ricas em diterpenos que podem deslocar os herbívoros, como as resinas de coníferas. Bem como os diterpenos labdenos presentes e que se polimerizam rapidamente selariam os ferimentos no tronco (LANGENHEIM, 2003). Esta previsão apóia-se em JANZEN (1975) que verificou uma maior quantidade de resinas nas vagens indeiscentes de *H. courbaril* na Costa Rica do que nas vagens de árvores em Porto Rico. Esta seleção direcional para uma maior quantidade de resinas, seria decorrente do ataque de besouros do gênero *Rhinochenus*, que não existem em Porto Rico. LANGENHEIM *et al.* (1978) ressaltam que as resinas das vagens são predominantemente diterpenos labdenos. Os autores também notaram que no limbo, no pecíolo das folhas e nos tecidos primários do caule de *H. courbaril*, a composição é restrita a sesquiterpenos. Esta observação associada a outras, são argumentos para a previsão de que composições diferentes de resina em diferentes partes da árvore são geradas por pressões de herbívoros e patógenos específicos destas partes. LANGENHEIM, FOSTER e MCGINLEY (1980) indicaram que o sesquiterpeno cariofileno encontrado em folhas de *Hymenaea*, tem ação contra *Spodoptera exigua* (Lepdoptera), que é usado como herbívoro-modelo em experimentos (LANGENHEIM *et al.*, 1982). Além disso, LANGENHEIM, FOSTER e MCGINLEY (1980) constataram que as diferenças nas concentrações do cariofileno, que caracterizam três

populações de *Hymenaea* (Brasil, Costa Rica e Venezuela), têm ações diferentes sobre *S. exigua*. Isto seria evidência de seleção, uma vez que a variação na ação de herbívoros em cada local desencadeia uma pressão seletiva diferenciada. Além de defesa contra insetos herbívoros o óxido de cariofileno (ao invés do cariofileno) é ativo contra o fungo foliar *Pestalotiopsis* que ocorre em *Hymenaea* (ARRHENIUS e LANGENHEIM, 1983; ARRHENIUS e LANGENHEIM, 1986). O terceiro exemplo evidenciado por LANGENHEIM (2003) é o do arbusto do gênero *Larrea* (Zygophyllaceae) que ocorre em áreas desérticas das América do Sul e do Norte (HUNZIKER *et al.*, 1972). As resinas em *Larrea* são produzidas em tricomas de folhas jovens. Em *Larrea tridentata* tricomas se colapsam e liberando a resina através de poros até a superfície das folhas. Aparentemente tricomas de folhas velhas não liberam resinas já que estão todos colapsados (THOMSON, PLATT-ALOIA, KOLLER, 1979). A resina que cobre as folhas de *Larrea* é composta majoritariamente por fenólicos. Em *L. tridentata* e *L. divaricata* são flavonóides, agliconas (flavonas e flavonóis), um dihidroflavonol e duas lignanas (entre elas o ácido nordihidroguaiarético) (SAKAKIBARA *et al.*, 1975). RHOADES (1977) teoriza que as folhas mais jovens são alvo de ataque de herbívoros porque têm presença mais constante ao longo do tempo, ou seja a planta sempre está produzindo folhas jovens. RHOADES (1977) em experimentos verificou que um gafanhoto *Cibolacris parviceps* (Acrididae), que é um herbívoro generalista, passa a se alimentar mais de folhas jovens de *L. tridentata* quando estas tem suas resinas retiradas por éter. Já um herbívoro especialista, a larva da mariposa *Semiothisa colorata* (Geometridae), se alimenta mais em folhas novas nas quais se retira parte da resina, mas não toda. O autor aventava a possibilidade da baixa concentração de resinas servir de pista para alimentação das larvas. RHOADES (1977) também indica que a ação inibidora das resinas de *Larrea* é igual a do tanino (inibição da digestão de proteínas). RHOADES (1977) também demonstrou através de experimentos a resina de *Larrea* pode agir como antidessecante e fotoprotetora contra UV.

Além de funções defensivas resinas existem alguns casos de mutualismo com insetos envolvendo as resinas. Um dos casos ocorre com as plantas do gêneros *Dalechampia* (Euphobiaceae) e *Clusia* (Guttiferae/Clusiaceae) que oferecem resinas como recompensa floral para polinizadores. Em *Dalechampia* as resinas são secretadas por um complexo de brácteas modificadas que ficam abaixo das flores estaminadas. Em *Clusia* as flores estaminadas possuem grupos de estaminóides

que secretam resina, já nas flores pistiladas os estaminóides formam anéis. No caso dos dois gêneros, abelhas que coletam resina são os polinizadores (AMBRUSTER, 1984). Outro caso é de *Roridulas gorgonias* cujos tricomas glandulares das folhas produzem resinas. Estas resinas viscosas prendem insetos que acabam por ser sugados por *Pamerida roridulae* (Hemiptera, Meridae). Durante a sua alimentação *P. roridulae* libera excretas cujo nitrogênio é absorvido por *R. gorgonias* (ELLIS e MIDGLEY, 1996). Observações e medições de VOIGT e GORB (2008) apontam que *P. roridulae* não fica aderido à secreção resinosa de *R. gorgonias* devido a uma camada lipídica espessa sobre a cutícula que produz um mecanismo que impede a adesão.

Insetos podem utilizar resinas com várias finalidades. Observa-se que larvas de *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera, Diprionidae), se alimentam de folhas de pinheiro escocês e acumulam as resinas no intestino anterior. Quando agredidas as larvas de *N. sertifer* regurgitam a resina (EISNER, JOHNESSEE e CARREL, 1974). POINAR Jr (1992) descreve a presença em âmbar de indivíduos de Apiomerinae (Hemiptera, Reduviidae). Estes hemípteros cobrem suas pernas anteriores com resina para auxiliar na fixação de presas. Através do fóssil, o autor indica que esse uso de resina vem ocorrendo há 25 milhões anos.. As abelhas usam resinas, principalmente, para a construção de ninhos ou estruturas destes. Isto foi notado em espécies da família Megachilidae, que pode utilizar resina associada a fragmentos de folhas e solo (GRIGARICK e STANGE, 1968; CANE, 1996; ARMBRUST, 2004). Na família Apidae, observou-se o uso de resinas por *Epicharis* (ROUBIK e MICHENER, 1980) e euglossíneos (ZUCCHI, SAKAGAMI e CAMARGO, 1969). Os fósseis em âmbar contendo centenas de operárias de *Proplebeia* indicam que este gênero extinto de meliponíneo coletava resinas de *Hymenaea* entre 15 a 20 milhões de anos atrás (Mioceno). Acredita-se a resina coletada seja de *Hymenaea* porque o âmbar dominicano no qual se encontram as abelhas fossilizadas é formado por resinas de *Hymenaea* (CAMARGO, GRIMALDI e PEDRO, 2000). Os meliponíneos também empregam resinas para confecção de estruturas de seus ninhos. Nos favos de cria, invólucro e potes de alimento as resinas encontram-se misturadas à cera formando o cerume. Nos batumes, que são elementos de isolamento e vedação, as resinas podem estar misturadas a terra cera ou encontrarem-se puras. Existem ainda, depósitos de resina pura, que podem ser encontradas ao longo da estrutura do ninho, como em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia spp.* A resina pura ou

combinada com cera pode ser denominada própolis e quando mesclada à terra é designada de geoprópolis. Os batumes de geoprópolis são característicos do gênero *Melipona*. Além de material de construção, algumas espécies de meliponíneos podem untar resina em seus agressores, para imobilizá-los, como faz *Friesiomellita varia*. Esta espécie ainda utiliza resinas para cobrir todo o entorno da entrada do ninho (KERR *et al.*, 1967; ROUBIK, 1989; MICHENER, 1974; WILLIE e MICHENER, 1973; NOGUEIRA-NETO, 1997). MICHENER (1974) cita que os meliponíneos manipulam as resinas vegetais basicamente com as mandíbulas. dos SANTOS (2007) apontou que as glândulas salivares cefálicas apresentam-se ativas nas operárias de *Plebeia emerina* de faixa etária (20-30 dias) correspondente a função de manipulação de depósitos de própolis. Assim, as secreções destas glândulas manteriam a viscosidade dos depósitos. A autora também propõe que as glândulas intramandibulares que estão presentes em todas as idades de *P. emerina*, também teriam alguma função associada à manipulação de própolis/resinas. Isto porque nas operárias de 20-30 dias e campeiras o epitélio secretor destas glândulas encontra-se hipertrofiado.

2.3 PRÓPOLIS

Tradicionalmente o termo própolis é ligado a *Apis mellifera*, tanto que GARY (1975) cita que desde os tempos de Aristóteles se sabia de sua existência nas colméias destas abelhas. WITHERELL (1975), VAN TOL FILHO (1952) e BARROS (1962), por exemplo, denominam por própolis os exsudados coletados por *Apis mellifera* nas plantas. Sendo que estes vão servir de material para a vedação de aberturas, na fixação de favos e para mumificar intrusos.

Provavelmente, o termo própolis passou a ser utilizado na meliponicultura, por analogia com *A. mellifera*. Ainda que ROUBIK (1989), entenda que própolis seja um elemento ligado apenas a *A. mellifera*. NOGUEIRA-NETO (1997) define própolis como sendo resinas vegetais de plantas lenhosas que são coletadas pelos meliponíneos e levadas ao ninho. Após a manipulação a resina pode receber adição de um pouco de cera, podendo existir assim, depósitos de própolis puro ou misto.

O uso medicinal da própolis de *A. mellifera* é tradicional e KRELL (1996) reporta sua utilização com essa finalidade desde o tempo clássico de romanos e gregos. Assim sendo, já existem extensas revisões, como por exemplo, FARRÉ, FRASQUET e SANCHEZ (2004), a respeito do potencial da própolis de *A. mellifera*. No Brasil, a ênfase em seu uso popular e produção (BREYER, 1980) bem como estudos sobre sua atividade (SZEWCZAK, GODOY e CHOCIAI, 1986) ocorrem a partir dos anos 80. Posteriormente, inicia-se a caracterização de compostos, por exemplo com RIBEIRO (1994).

Durante os anos 90 iniciam-se os trabalhos com própolis de abelhas sem ferrão de forma análoga aos de própolis de *A. mellifera*. Tanto assim que TOMÁS-BARBERÁN *et al.* (1993) analisaram através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as própolis de *Melipona favosa*, *M. compressipes*, *Scaptotrigona depilis* e *Frieseomelitta varia*, na Venezuela. Os autores indicaram que estas própolis continham fenólicos (benzofenonas polipreniladas) e que *Clusia*, que fora analisada conjuntamente, era a fonte da resina. KUJUMGIEV *et al.* (1998) realizaram análises de atividade antimicrobiana de própolis de *M. compressipes* e *M. quadrifasciata anthidioides* em conjunto com amostras de *A. mellifera*. Nesta análise através de métodos de difusão e cultura em células os autores verificaram das própolis de *Melipona* atividade considerável contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e um vírus de gripe aviária (H7N7). Por outro lado, BANKOVA *et al.* (1999) testaram,

através de método de difusão, a própolis de *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. compressipes* e *Tetragona clavipes*. Notou-se uma atividade discreta contra *S. aureus* e ausência de atividade contra *E. coli*. Neste trabalho através de cromatografia cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi indicada a presença de ácidos, ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, monoterpênos, sesquiterpênos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos nas amostras. FERNANDES Jr. *et al.* (2001) averiguaram a concentração mínima inibitória da atividade antibacteriana de própolis de oito espécies de meliponíneos. A atividade foi significativa para as própolis de *Melipona sp.* *M. scutellaris* e *Partamona sp* contra *S. aureus*. Os autores não verificaram atividade significativa por parte de nenhuma amostra contra *E. coli*. VELIKOVA *et al.* (2000) através de método de difusão, mostraram uma atividade moderada contra *S. aureus* e *E. coli* do ácido caurenóico, o qual isolaram da própolis de *M. quadrifasciata anthidioides*. Em relação à identificação de compostos na própolis de meliponíneos, PATRICIO *et al.* (2002) retiraram amostras de própolis das tíbias de *Frieseomelitta varia*, *F. languida* e *F. silvestrii* e analisaram em CG-EM e encontraram monoterpênos, sesquiterpênos e diterpênos. PERREIRA, BICALHO e AQUINO NETO (2003), utilizaram cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) e cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada a espectrometria de massas (CGAR-AT-EM) e caracterizaram triterpênos em uma amostra de própolis de *Tetragonisca angustula*. Neste trabalho através de bioautografia verificou-se indícios de atividade contra *S. aureus*. SAWAYA *et al.* (2006) utilizando espectrometria de massas por ionização eletrospray no modo negativo, ESI-MS (-), indicaram através da comparação de íons característicos que a fonte de resina para *Tetragonisca angustula*, no Brasil, é *Schinus terebenthifolius* (aroeira mansa). Isto apesar das amostras serem de regiões diferentes. Os autores também apontam que alguns dos compostos destas amostras são triterpênos com grupos ácidos. SAWAYA *et al.* (2009), analisaram a variação da atividade antioxidante de amostras mensais de própolis recolhidas durante um ano de colméias de três espécies de *Scaptotrigona*. A atividade das amostras apresentaram atividade menor que a registrada para própolis de *A. mellifera*.

2.4 INSETOS EUSSOCAIS E SANIDADE DOS NINHOS

No interior dos ninhos de insetos sociais muitas vezes encontra-se uma grande agregação de indivíduos, bem como uma concentração de reservas de alimentos e condições de temperatura e umidade ótimas para o desenvolvimento de microorganismos (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Por isso, já WHEELER (1910), baseado em observações com formigas já supunha teoricamente que este cenário aumentaria a probabilidade de proliferação de microorganismos e logo de doenças nos ninhos. CREMER, ARMITAGE e SCHIMD-HEMPEL (2007), em sua revisão, denominam de imunidade social os mecanismos, observados em insetos sociais, que dependem da cooperação de membros do grupo, e que resultam em prevenção, controle e eliminação de infecções parasitárias (2007). Os autores fazem uma categorização desses mecanismos de acordo com o local onde eles ocorrem ou direção de transmissão dos agentes patogênicos (horizontal ou vertical). Uma dessas categorias engloba os mecanismos para reduzir a probabilidade de estabelecimento dos agentes patogênicos no interior do ninho. Entre os mecanismos encontram-se aqueles que são desencadeados pelo patógeno ou são medidas profiláticas. Entre os mecanismos profiláticos no ninho interior do ninho é possível citar que formigas retiram ou isolam cadáveres bem como afastam material em decomposição do ninho (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Meliponíneos transportam detritos (exúvias de pupas e fezes) para fora dos ninhos (ROUBIK, 1989). Há indícios que cupins *Zootermopsis gusticollis* produzem sinais vibratórios quando na presença de esporos de fungos patogênicos, fazendo com que os indivíduos da colônia se afastem da área contaminada (ROSENGAUS et al., 1999). As fezes (mecônio) também são retiradas do ninho por espécies de vespas adultas da tribo Ropalidiini as quais algumas auxiliam a larva a ejetar o mecônio. Em outras espécies as larvas ejetam o mecônio sozinhas para que os adultos os retirem (KOJIMA, 1996). A coleta de materiais e sua deposição no ninho também é um mecanismo profilático que controla o crescimento microbiano, como é o caso de *Formica paralugubris* que coleta resina vegetal e deposita em seu ninho (CHRISTE et al., 2003). A própolis de *Apis mellifera* pode ter uma ação semelhante, já que possuem resinas em sua composição, e testes *in vitro* apontaram que a própolis inibe o crescimento de *Paenebacillus larvae*, uma bactéria patogênica para *A. mellifera* (BASTOS et al., 2008). Um outro aspecto das condições sanitárias do ninho

é a conservação das reservas de alimento. Os experimentos de CURRIE *et al.* (1999) demonstraram que o actinomiceto *Streptomyces* simbiote é capaz de inibir o fungo parasita *Escovopsis* que é nocivo ao fungo do qual as formigas cortadeiras cultivam se alimentam. BIJLSMA *et al.* (2006), pontuam a respeito da concentração de água no mel de meliponíneos, que é mais alta que no mel de *A. mellifera*, o que poderia desencadear sua deterioração mais rápida, sendo que em geral não se observa isto. Os autores citam que o mel de *Trigona nigra* e *Melipona favosa* pode manter-se por um ano sem aparentemente alterar suas características. Os autores aventam a possibilidade das abelhas sem ferrão adicionarem enzimas outras substâncias que conferem capacidade antibiótica ao mel.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL

As amostras de própolis das vedações utilizadas nos procedimentos dos subitens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 foram recolhidas em duas localidades distintas. As amostras de *Scaptotrigona sp.*, localmente conhecida por “tubi”, procederam de um meliponário instalado no município de Barra do Corda, Maranhão. O centro geográfico do município está situado a 5° 5' S e 42° 25' W (IBGE, 2006a). O clima é quente, semi-úmido com quatro ou cinco meses secos. A maior parte do município abrange áreas de cerrado (IBGE, 2006b). Já as amostras de própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* foram obtidas de um meliponário instalado na Estação Experimental de Luiz Antônio (EELA), no município de Luiz Antônio, São Paulo. O meliponário localiza-se a 21° 35' 16,7” S e 47° 44' 31,0” W. A Estação Experimental encontra-se em uma área que se caracteriza por dois períodos climáticos distintos, sendo um com precipitação e temperaturas altas (novembro a abril) e outro com precipitação e temperaturas baixas (maio a outubro), (UFSCAR, 2000). A maior parte da área que circunda as colméias está ocupada por plantações de *Pinus sp.* e *Eucaliptus sp.* (UFSCAR, 2000). As colônias de *Scaptotrigona sp.* do meliponário de Barra do Corda são nativas da região. As colônias de *S. aff. depilis* dos meliponários da Estação Experimental, foram obtidas a partir de transferências de ninhos procedentes do campus USP RP. Os ninhos se encontravam em árvores caídas ou cortadas pela Divisão de Parques e Jardins do campus.

Os procedimentos do subitem 4.2.4 utilizaram *S. aff. depilis*. Estas colônias estavam instaladas no meliponário do Departamento de Genética FMRP, campus USP Ribeirão Preto. As colônias deste meliponário procedem também de transferências de ninhos naturais do campus. O campus situa-se a 21° 15' S e 47° 55' W. O local tem altitude máxima de 653 m e está sob domínio de clima subtropical úmido temperado (FREITAS, 2001).

3.2 METODOLOGIA

Foi considerado como própolis o material que compunha as vedações das colméias de *Scaptotrigona*.

Foram consideradas como sendo resinas vegetais as frações separadas da própolis, segundo os procedimentos descritos a seguir. Ou então, os exsudatos vegetais retirados de espécies vegetais reconhecidas em LANGENHEIM (2003) como produtoras de resina.

3.2.1 Composição química das resinas da própolis das vedações

3.2.1.1 Obtenção das amostras de própolis

As amostras de própolis procedentes de Barra do Corda foram coletadas mensalmente durante o período de maio de 2006 a abril de 2007. As amostras foram retiradas de dez colônias de *Scaptotrigona sp.* As colônias estavam acondicionadas em colméias racionais modelo Portugal-Araújo, modificada por Kerr e Venturieri (VENTURIERI, 2003) (fig.3). Utilizando-se espátula, as amostras de própolis foram retiradas das vedações construídas entre a tampa e módulo e entre os módulos das colméias. Em seguida, as amostras foram enviadas até a Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, pelo correio via SEDEX. As amostras oriundas da EELA foram coletadas mensalmente no intervalo entre setembro de 2006 a outubro de 2007. As amostras foram recolhidas de cinco colônias de *S. aff. depilis*. Estas colônias estavam abrigadas em colméias racionais modelo Walmir Pedro Züge (fig. 3). As amostras foram coletadas das colméias da mesma forma que em Barra do Corda. Posteriormente, tão rápido quanto possível, as amostras de própolis das duas localidades foram armazenadas a aproximadamente -16 °C.

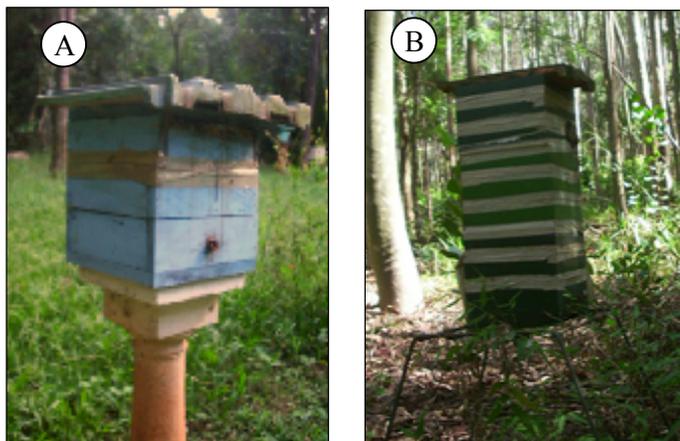


Figura 3 – **A** - Colméia racional modelo Portugal-Araújo modificada por Kerr e Venturieri. **B** - Colméia racional modelo Walmir Pedro Züge.

3.2.1.2 Avaliação da composição química das resinas das própolis

As análises de avaliação da composição química foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP.

As amostras foram analisadas pela técnica de espectrometria de massas por ionização eletrospray no modo negativo, ESI-MS (-). Esta análise também fez parte dos procedimentos que originaram o trabalho de SAWAYA *et al.* (2009). Portanto, a metodologia e os resultados apresentados aqui constam também neste trabalho.

As resinas contidas nas própolis foram extraídas através da adição de 10 mL de etanol (Merck) para cada 3,0 g de amostra de própolis individualmente. As amostras permanecem sete dias junto ao solvente sob agitação a 100 rpm. A seguir, filtrou-se a parte insolúvel e o filtrado foi posto a -16 °C “overnight” para congelamento da cera e novamente sofreu filtração a -16 °C (SAWAYA *et al.*, 2006). Isto foi realizado para diminuir a quantidade de ceras junto á resina. O filtrado obtido teve o etanol evaporado a 50°C para obtenção dos extratos secos de resina. Este extrato seco foi dissolvido em uma solução de 70% de metanol (v/v) grau cromatográfico (Tedia), 30% água deionizada (v/v), 0,5% hidróxido de amônio. Em seguida, injetou-se diretamente as soluções de resina a um fluxo de 10µL . m⁻¹ na fonte de ESI, através de um injetor (Harvard Apparatus). Os espectros de massa (fingerprint) ESI(-)-MS foram obtidos em um espectômetro de massa Q-TOF de

micromassa híbrido sob as seguintes condições: capilar -3000 V; cone - 40 V; temperatura de dessolvatação 100 °C. Os “fingerprint” foram obtidos na faixa de m/z 100 a 1000. Posteriormente, para caracterizar as amostras foi efetuada uma análise de componentes principais (PCA) através do programa Pirouette 2.60 (Infometrix). Os espectros de massa foram expressos como as intensidades de íons individuais $[M - H]^+$. Os íons com intensidades acima de 30% no “fingerprint” foram utilizados como variáveis na PCA. Também foram incluídas nas análises as concentrações nas quais as amostras reduziam a absorvância em 50% em teste de atividade antioxidante (ED_{50}) (SAWAYA *et al.*, 2009). Os valores foram pré-processados através de auto-escala antes da realização da análise de componentes principais.

3.2.1.3 Informações adicionais: massa da própolis, proporção de resina na própolis, realocação da própolis

Para aumentar os subsídios para a discussão a respeito dos resultados obtidos pelo procedimento anterior foram realizados mais três procedimentos.

O primeiro foi o de medir a massa de cada amostra mensal, em balança mecânica (amostras de *Scaptotrigona sp* Barra do Corda) e em balança digital (amostras de *S. aff. depilis* EELA). Os valores obtidos para as amostras de *Scaptotrigona sp* dos seis primeiros meses de extração de própolis foram comparados com os valores dos seis últimos. Já para dos valores de *S. aff. depilis*, descontou-se um dos seis primeiros e um dos seis últimos, pois nestes meses o coletor não foi o mesmo das demais coletas, o que fez com que os valores se mostrassem enviesados. As massas de *S. aff. depilis* foram comparadas através do teste U de Mann-Whitney. Já as massas de *Scaptotrigona sp* foram comparadas com teste t para duas amostras independentes.

No segundo procedimento, extraíram-se as resinas das amostras mensais de própolis das duas abelhas de acordo com o subitem 3.2.2.1. A seguir obteve-se a proporção de resina através da divisão da massa desta pela massa da amostra de própolis correspondente. Os valores de proporção de resina dos seis primeiros meses de coleta com os valores dos seis últimos foram comparados através do teste U de Mann-Whitney. As análises estatísticas destes experimentos e de todos os outros deste trabalho foram realizadas no programa Statistica 6.0.

No terceiro procedimento, tomou-se uma colméia racional do meliponário do Depto. de Genética, USP-RP, contendo *S. aff. depilis* e procurou-se retirar toda a própolis que vedava a tampa e a melgueira junto a esta. Nas melgueiras inferiores e na região dos favos espalhou-se purpurina prateada nas áreas onde havia própolis depositada. Após três dias foi verificado se houve realocação da própolis de outros locais do ninho na melgueira para as áreas que tiveram a própolis retirada.

3.2.2 Atividade antimicrobiana das resinas da própolis das vedações

3.2.2.1 Obtenção da própolis e extração de resinas

As amostras mensais de própolis de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda) e de *S. aff. depilis* (EELA), são as mesmas obtidas nas condições apresentadas no subitem 3.2.1.1. A extração de resina das amostras foi realizada através de maceração. Para tanto, colocava-se a proporção de 4 mL de etanol (Merck) junto a 1 g de própolis (ADELMANN, 2005). A extração ocorreu sob agitação de 60 rpm a 30 °C por 14 dias (Bastos, 2006, comunicação verbal)¹. Após esse período o extrato foi mantido por no mínimo 12 horas a -16 °C, em seguida realizou-se a filtração da porção insolúvel também a -16 °C (modificação de SAWAYA *et al.*, 2006). Após a filtração, o etanol foi evaporado em estufa a 35 °C. Decidiu-se fazer uma mescla (“pool”) para o grupo de resinas provenientes de cada localidade. Isto porque as amostras mensais de Barra do Corda mostraram certa identidade umas com as outras, bem como as amostras da EELA entre si (subitens 4.1.1 e 5.1). Os “pools” também foram feitos para se obter um material que refletisse as tendências de coleta durante o ano. Para se obter a mescla de cada localidade, tomaram-se as amostras mensais de resinas já extraídas e procedeu-se uma nova suspensão de cada uma delas. Estas suspensões foram produzidas diluindo-se as resinas extraídas na proporção 1g de resina para 3mL de etanol (Merck). Então, foram misturados 2mL de cada suspensão formando os “pool”, que em seguida tiveram o etanol evaporado em estufa a 35°C. Em todos os procedimentos anteriores procurou-se manter as amostras abrigadas da luz.

¹ Informação fornecida por Bastos, Ribeirão Preto, julho de 2006.

3.2.2.2 Ensaio para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico

Avaliações prévias de atividade antimicrobiana dos “pools” de resinas das duas abelhas foram realizadas na Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Belo Horizonte, MG).

As avaliações foram realizadas através de ensaios de métodos de difusão em placa para atividade antibacteriana e atividade antifúngica, cujos protocolos foram estabelecidos para própolis de *A. mellifera* em FUNED (2008a) e FUNED (2008b). Os procedimentos utilizados encontram-se no APÊNDICE 1.

Nos testes prévios de difusão em placa para atividade antibacteriana (fig. 4) ambos os “pools” de resina não apresentaram atividade contra *Escherichia coli*. (diâmetro halo de inibição = 0). O disco de gentamicina que serviu de controle de atividade apresentou halo com 28mm de diâmetro. O controle para toxicidade do etanol não apresentou halo. Já contra *Staphylococcus aureus* o “pool” de *Scaptotrigona sp.* não apresentou atividade (halo = 0), enquanto que o “pool” de *Scaptotrigona. aff. depilis* mostrou uma atividade razoável. Os dos halos tinham 12mm, 12mm e 13mm de diâmetro (média de 12,33mm). O disco de vancomicina produziu um halo de 21mm e o etanol não produziu halo. Considera-se como ideal, na metodologia utilizada, o halos de inibição ≥ 13 mm.

No ensaio de atividade antifúngica contra *Candida albicans* (fig. 4) as placas com o “pool” da EELA apresentaram respectivamente 136; 352; 208 colônias, (média=232 colônias). Nas placas com “pool” de Barra do Corda surgiram 1116; 744; 840 colônias (média= 898 colônias). Já nas placas de controle da toxicidade do DMSO apresentaram 717; 708; 735 colônias (média= 720 colônias). A placa de controle de viabilidade de *C. albicans* com apenas PDA apresentou 1120 colônias. A comparação desta última placa com as demais indicou como que nenhum “pool” foi efetivo contra *C. albicans*.

Como considerou-se apenas representativa a atividade do “pool” de *Scaptotrigona. aff. depilis* contra *Staphylococcus aureus*. Foi realizado ensaio de microdiluição em placa de 96 poços para caracterizar melhor a atividade do “pool” contra *S. aureus*. Os procedimentos foram realizados no laboratório de Farmacognosia do departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP. Procurou-se observar os protocolos do NCCLS (2003). Inicialmente, tubos de

ensaios com 5mL de caldo de soja tríptica (TSB - Himedia) foram inoculados com *S. aureus* (ATCC 25923) e incubados de 18h a 24h, a 37°C. A seguir, as bactérias do caldo foram inoculadas em tubo com ágar de soja tríptica (TSA – Himedia), que foi incubado por 18h a 24h, a 37°C. A partir desta cultura as bactérias foram transferidas para tubos com 6000µL de salina 0,85% até que a suspensão atingisse turbidez igual à de uma solução padrão de Mc Farland de 0,5 de BaSO₄ (10⁸ UFC/mL). Em seguida, 1000µL da suspensão foram diluídos em 9000µL de caldo Mueller-Hinton, resultando no inóculo com 10⁷ UFC/mL. Do inóculo foram transferidos 10µL para cada poço que necessitava (fig.5a), resultando em 5 x 10⁴ UFC/poço, já que cada poço continha o volume final de 200µL. A seguir, preparouse uma solução de resina da EELA em dimetilsulfóxido (DMSO - Merck) com concentração 400mg/mL. A partir desta solução foram feitas seis diluições sucessivas 1:2 em caldo Mueller-Hinton (Difco), produzindo ao final uma solução de trabalho com concentração final de 6250µg/mL, com 1,6% (v/v) de DMSO. O esquema de aplicação da solução de trabalho e as concentrações finais de resina nos poços encontram-se nas figuras 5a e 5b. Também para verificar se a própolis (resina+cera) mostraria diferença na atividade, foi preparado um “pool” das amostras destas como se fizera para as resinas (subitem 3.2.2.1). Assim, também se preparou uma solução de trabalho do “pool” de própolis como descrito anteriormente para o “pool” de resina. A aplicação da solução de trabalho do “pool” de própolis e as concentrações na placa também foram similares ao do “pool” de resina (fig.5a e 5b). A penicilina G (Sigma) foi utilizada como controle de atividade antibacteriana. A preparação do antibiótico foi iniciada com a diluição da penicilina G em tampão fosfato de potássio a 1% (pH 6,0), produzindo uma solução de 1000µg/mL. Então, se diluiu 1mL desta solução em 9mL de caldo Mueller-Hinton. Da solução anterior tomou-se 1mL que foi diluído em 5mL de caldo Mueller-Hinton resultando em uma solução de penicilina G a 20µg/mL. A partir desta solução foram feitas diluições 1:2 seqüenciais na placa conforme figura 5a. As concentrações de penicilina nos poços estão na figura 5b. Para obter o controle da toxicidade do DMSO preparou-se uma solução diluindo-se 32µL de DMSO em 1968µL de caldo Mueller-Hinton, obtendo-se uma solução com 1,6% (v/v) de DMSO. A aplicação deste controle é demonstrada na figura 5a. Também foram feitos controles de esterilidade do caldo Mueller-Hinton, da resina e da própolis, bem como controle da viabilidade de *S. aureus* (fig.5a). Ao final da aplicação das soluções o volume nos

poços era de 200µL e os ensaios e controles se apresentam em triplicata (fig.5a). Após a finalização da aplicação das soluções a placa foi selada com filme plástico e incubada por 16h-20h a 37°C. Após a incubação foi adicionado em todos os poços 20µL de uma solução reveladora de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (CTT) (Vetech). Este sal é incolor, mas em contato com bactérias este é reduzido a trifênil formazan tornando-se vermelho (SIMONS e WILLIAMS, 1967). A placa, então, foi incubada novamente por 30 min, 37°C, após esse período a placa foi levada até um “scanner” digital para captura da imagem do fundo da placa. A imagem dos poços foi analisada através do programa Flicker - V0.87.1-beta que foi criado para analisar a densitometria de imagem (LEMKIN, THORNWALL e EVANS, 2005). Os valores de densitometria do programa são interpretações da densidade de cor dos “pixels” da imagem digitalizada. O método de análise do crescimento bacteriano em placas de 96 poços, através de imagens digitalizadas via “scanner” foi proposto por GABRIELSON *et al.* (2002). Os valores de densitometria dos poços com 781,25µg/mL e 200µg/mL de ambos “pools” foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente teste de Tukey.

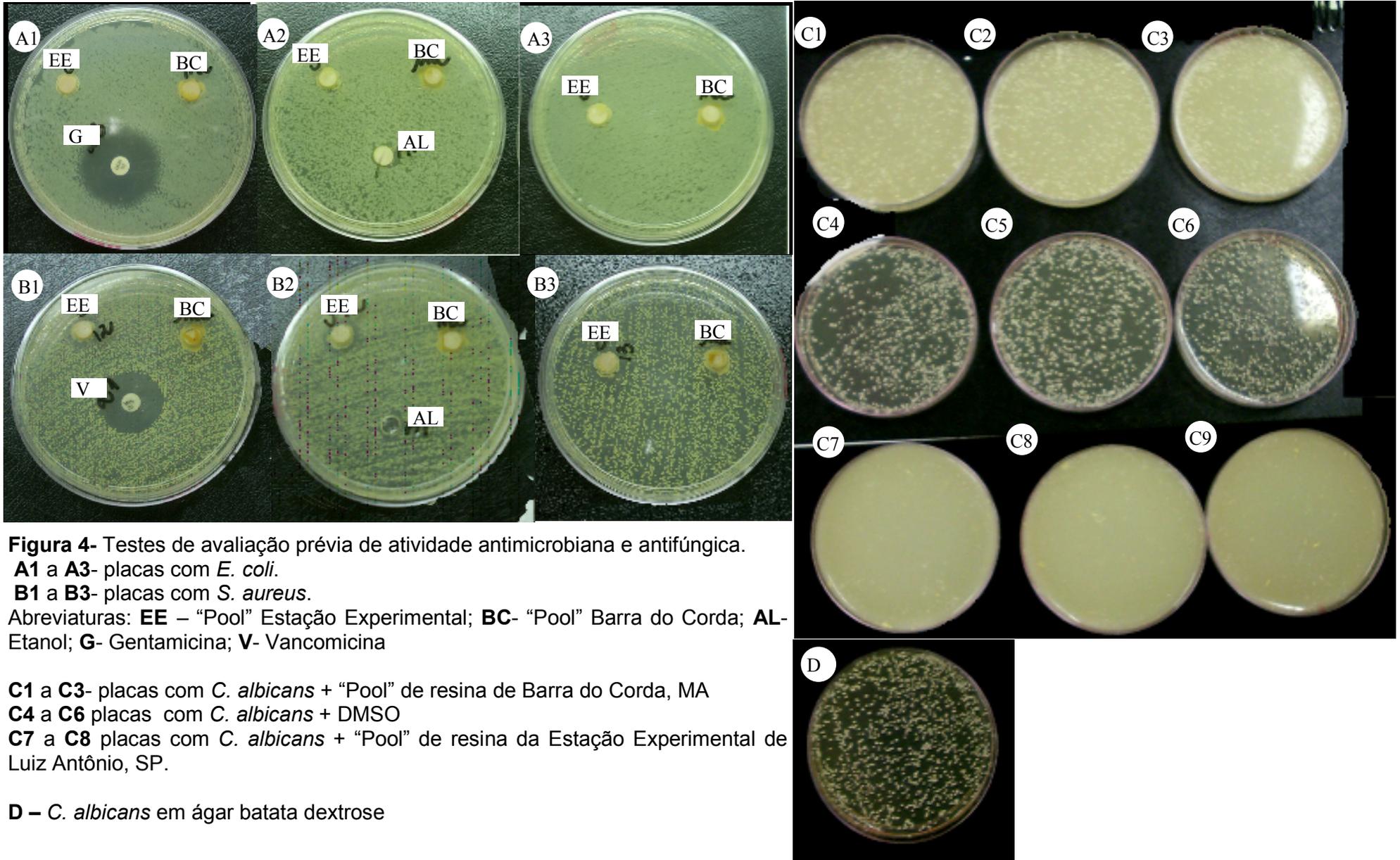


Figura 4- Testes de avaliação prévia de atividade antimicrobiana e antifúngica.

A1 a A3- placas com *E. coli*.

B1 a B3- placas com *S. aureus*.

Abreviaturas: **EE** – “Pool” Estação Experimental; **BC-** “Pool” Barra do Corda; **AL-** Etanol; **G-** Gentamicina; **V-** Vancomicina

C1 a C3- placas com *C. albicans* + “Pool” de resina de Barra do Corda, MA

C4 a C6 placas com *C. albicans* + DMSO

C7 a C8 placas com *C. albicans* + “Pool” de resina da Estação Experimental de Luiz Antônio, SP.

D – *C. albicans* em ágar batata dextrose

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	C 90 μ L ST R 100 μ L IN 10 μ L	C 140 μ L ST R 50 μ L IN 10 μ L	C 165 μ L ST R 25 μ L IN 10 μ L	C 184 μ L ST R 6 μ L IN 10 μ L	ENSAIO RESINA		C 200 μ L	C 200 μ L	C 200 μ L	Controle de esterilidade Caldo Mueller-Hinton
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			ST R 100 μ L C 100 μ L	ST R 100 μ L C 100 μ L	ST R 100 μ L C 100 μ L	Controle de esterilidade Solução trabalho resina
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			ST P 100 μ L C 100 μ L	ST P 100 μ L C 100 μ L	ST P 100 μ L C 100 μ L	Controle de esterilidade Solução trabalho própolis
D							DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	Controle de toxicidade DMSO
E	C 90 μ L ST R 100 μ L IN 10 μ L	C 140 μ L ST R 50 μ L IN 10 μ L	C 165 μ L ST R 25 μ L IN 10 μ L	C 184 μ L ST R 6 μ L IN 10 μ L	ENSAIO PRÓPOLIS		C 190 μ L IN 10 μ L	C 190 μ L IN 10 μ L	C 190 μ L IN 10 μ L	Controle de viabilidade Inóculo
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			P 200 μ L	C 100 μ L P 7 μ L	C 100 μ L P 8 100 μ L	P 9 100 μ L Descarte
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			C 90 μ L IN 10 μ L	C 90 μ L IN 10 μ L	C 90 IN 10	
H							IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR

Figura 5a - Diagrama de aplicação de soluções utilizadas em ensaio da atividade de “pool” de resinas e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* (EELA) contra *Staphylococcus aureus* – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A ordem de cima para baixo das abreviaturas representa a ordem de aplicação das soluções. Os valores a frente das abreviaturas indicam os volumes aplicados. Abreviaturas: **C** – Caldo Mueller-Hinton; **ST R** – Soluções de trabalho de “pool” resina; **ST P** – Solução de trabalho de “pool” de própolis; **IN** – Inóculo de *S. aureus*; **DMSO** – Solução de dimetilsulfóxido; **P** – Solução de Peniciliana G; **P7**; **P8**; **P9** – Solução de Penicilina G vinda do poço 8,9,9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 1562,5 µg/mL	POOL RESINA 781,25 µg/mL	POOL RESINA 200 µg/mL			-	-	-			
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO RESINA		POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 3125 µg/mL	Controle de esterilidade Solução trabalho resina		
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	Controle de esterilidade Solução trabalho propólis		
D							DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)	Controle de toxicidade DMSO		
E	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 1562,5 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 781,25 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 200 µg/mL			-	-	-			
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO PRÓPOLIS		PENICILINA G 10 µg/mL	PENICILINA G 5 µg/mL	PENICILINA G 2,5 µg/mL	Controle de atividade Antibiótico		
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			
H							IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			

Figura 5b Diagrama de concentrações de substâncias utilizadas em ensaio da atividade de “pool” de resinas e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* (EELA) contra *Staphylococcus aureus* – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A concentração de *S. aureus* nos poços onde se aplicou o inóculo foi de 5×10^4 UFC/poço.

3.2.3 Resinas das vedações e sanidade da colônia

3.2.3.1 Isolamento de fungos filamentosos

Os procedimentos para isolamento de fungos foram feitos no laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do departamento de Biologia da FFCLRP USP.

Durante o isolamento de fungos filamentosos das colônias de *S. aff. depilis* do meliponário da EELA foram testados três métodos de coleta, que foram executados nas cinco colônias. No primeiro, foram retiradas com espátulas estéreis amostras de própolis das vedações do módulo da colméia correspondente à área dos favos de cria. Estas amostras foram postas em frascos estéreis. No segundo, colocou-se uma placa de Petri pequena estéril dentro de cada colônia, no módulo de melgueira mais próximo à área de cria. As placas permaneceram por dez dias nas colméias, até serem fechadas e recolhidas. No terceiro, uma placa de Petri aberta contendo meio de aveia (ágar 2g : farinha de aveia 4g : água 100mL) estéril, foi posta em cada colméia no módulo de melgueira mais próximo da área de cria. As placas foram deixadas por cerca de 20 minutos nas colméias. Em seguida, as placas foram lacradas e recolhidas. O material coletado pelo primeiro método (própolis) em cada colônia foi transferido para placas de Petri individualizadas com meio de aveia. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C. As placas de Petri utilizadas no segundo método foram colocadas abertas em placas de Petri maiores contendo meio de aveia. Após isto, as placas foram postas em estufa a 30 °C. As placas de Petri com meio de aveia, usadas no terceiro método, logo após a chegada ao laboratório, também foram incubadas a 30°C. O primeiro método apresentou o crescimento de um número maior de morfotipos diferentes de fungos (cinco). Assim, a partir destas placas iniciou-se o isolamento dos morfotipos. Fungos cinza e marrom não foram isolados para evitar possível contaminação ao laboratório. O isolamento foi realizado através de raspagem com alça de platina flambada dos fungos selecionados. Em seguida, foi feita a inoculação dos fungos em novas placas com meio de aveia acrescido de composto antibacteriano Pentabiótico® Fort Dodge a 50µg/mL. Estas placas foram levadas à estufa a 30 °C. O processo de isolamento foi repetido até que nas placas houvesse apenas o crescimento de um morfotipo por placa. Obtiveram-se três morfotipos que foram enviados para identificação na Micoteca URM (University Recife Mycologia), Departamento de Micologia UFPE. Os

fungos foram identificados como *Aspergillus niger*, Van Tieghem (agregado com outro *Aspergillus*), *Paecilomyces variotii* Bainier e *Aspergillus flavus*, Link. O isolamento de fungos das colônias de *Scaptotrigona* sp. de Barra do Corda foi iniciado com o recolhimento de fragmentos de própolis de cinco colméias. A coleta foi feita com o mesmo procedimento do primeiro método utilizado na EELA. Este procedimento foi escolhido porque através dele se obteve um número maior de morfotipos vindos da EELA. As amostras foram mantidas resfriadas até serem colocadas em placas de Petri com meio de aveia, as quais foram incubadas à 30°C. Após o crescimento dos fungos foi realizado o isolamento destes através dos mesmos procedimentos utilizados para as amostras da EELA. Os nove morfotipos isolados foram enviados para identificação na Micoteca URM, Departamento de Micologia UFPE. Foi possível identificar *Aspergillus niger*, Van Tieghem, *Curvularia lunata* var. *aeria* (Bat., J.A. Lima & C.T. Vasconc.) M.B. Ellis e *Aspergillus japonicus* (agregado a *Aspergillus niger*). Isto porque o alto nível agregação nos demais morfotipos não permitiu o isolamento para identificação.

3.2.3.2 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados

Os procedimentos para avaliação da atividade das resinas contra os fungos coletados foram realizados no laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do departamento de Biologia da FFCLRP USP.

Nos ensaios foram testados os “pools” de resinas (subitem 3.2.2.1) de uma localidade contra os fungos isolados das colméias daquela localidade. Também foram usados “pools” de própolis das duas localidades como no subitem 3.2.2.1. Nos ensaios foram utilizados *Aspergillus niger* + *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces variotii*, (EELA) e *A. niger* e *A. japonicus* + *A. niger* (Barra do Corda). *A. niger* e *A. japonicus* foram escolhidos porque podem produzir, respectivamente, ocratoxina A (ROMERO *et al.*, 2005) e esterigmatocistina (BEGUN e SAMAJPATI, 2000). Estas substâncias têm potencial entomopatogénico (PATERSON, SIMMONDS e BLANEY, 1987; OBANA *et al.*, 1994). Para *Paecilomyces variotii* não foi encontrada referência a respeito de ação entomopatogênica. Porém há indicações a respeito de enfermidades em humanos provocadas por este fungo (GUTIÉRREZ, 2005 *et al.*). Assim, para aproveitamento do material isolado decidiu-se pela sua utilização. A.

flavus apesar de ser bem caracterizado como entomopatogênico, inclusive com relatos para abelhas solitárias (BATRA e BOHART, 1969) teve sua utilização descartada. Isto se deveu ao seu também conhecido potencial patogênico para humanos (HADAYATI *et al.*, 2007). O método utilizado foi o de microdiluição em placa de 96 poços, procurando-se observar os princípios do NCCLS (2002). Primeiramente, preparou-se soluções de trabalho dos “pools” de resina e própolis a 100mg/mL em DMSO (Merck). A seguir, em um tubo de ensaio, dilui-se 90µL destas soluções em 4410µL de caldo RPMI 1640 (GIBCO® Invitrogen) finalizando assim, as soluções de trabalho com 2000µg/mL de resina. Os esquemas de aplicação das soluções de trabalho bem como as concentrações resultantes por poço estão nas figuras 6a e 6b, respectivamente. Para a preparação dos inóculos, os fungos foram cultivados de 5 a 7 dias, 30°C, em garrafas de boca larga (400mL) providas de 50mL de BDA (ágar dextrose batata - Biobras). Com auxílio de pipeta de vidro adicionou-se junto aos fungos cultivados 10mL de salina 0,85% e utilizando-se a mesma pipeta, fez-se uma raspagem dos fungos em meio. Em seguida, filtraram-se em funil com gaze as soluções iniciais de esporos que foram recolhidas em Erlenmeyer. Em seguida, as concentrações de esporos nas soluções iniciais foram determinadas através de câmara de Neubauer. As soluções continham aproximadamente de 10^9 esporos/mL a 10^{11} esporos/mL. A partir destas soluções iniciais, foram feitas diluições na razão de 1:10 (1mL de solução de esporos em 9mL de salina 0,85%), até que atingissem 10^7 esporos/mL. Desta solução transferia-se 500µL para um tubo tipo Eppendorf com 500µL de salina que resultava em soluções com 5×10^6 esporos/mL. Foram tomados 72µL de cada uma destas soluções que foram diluídos em 3528µL de caldo RPMI, resultando para cada um dos fungos soluções de inóculo com 10^5 esporos/mL. Foram aplicados 100µL das soluções de inóculo em cada um dos poços nos quais eram necessários, desta forma a concentração nestes poços foi de cerca de 5×10^4 esporos/mL (fig. 6a). Os ensaios incluíram ainda controles de esterilidade do caldo RPMI, controles de esterilidade das soluções de trabalho de resina e própolis, e controle de toxicidade do DMSO. A aplicação das soluções para preparação destes controles, bem como as concentrações dos poços de controle de atividade antifúngica (anfotericina B) estão nas figuras 6a e 6b. Para a preparação do controle de atividade antifúngica preparou-se uma solução de 5000µg/mL de anfotericina B (Fungizon® Bristol-Myers-Squibb) em água destilada. Então, tomou-se 13,6µL desta solução e adicionou-se a 3386,4µL de caldo RPMI, que produziu uma

solução de antibiótico a 20µg/mL. A partir desta solução foram feitas diluições 1:2 seqüenciais na placa conforme figura 6a. As concentrações de anfotericina B nos poços estão na figura 6b. Foram feitos controles com anfotericina para se avaliar a resistência dos fungos. Todos os ensaios e controles foram feitos em triplicata. As placas foram incubadas a 30°C por 48h ou até haver crescimento. Os poços utilizados foram fotografados individualmente através de sistema de captura de imagem ligado a estereomicroscópio. A leitura do resultado foi feita através de comparação do crescimento no poço de controle de viabilidade com os demais poços. A exceção da categoria “>25%”, que foi estipulada para caracterizar melhor a atividade, as demais seguiram a categorização de crescimento de NCCLS (2002), as quais são: Crescimento (igual) ao controle de viabilidade = 4

75% do crescimento do controle de controle de viabilidade = 3

50% do crescimento do controle de controle de viabilidade = 2

25% do crescimento do controle de controle de viabilidade = 1

> 25% do crescimento do controle de controle de viabilidade = 0-1

Nenhum crescimento= 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ST R 100 μ L IN 100 μ L	RPMI 50 μ L ST R 50 μ L IN 100 μ L	RPMI 80 μ L ST R 20 μ L IN 100 μ L	ENSAIO RESINA		RPMI 200 μ L	RPMI 200 μ L	RPMI 200 μ L	Controle de esterilidade Caldo RPMI				
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			ST R100 μ L RPMI 100 μ L	ST R100 μ L RPMI 100 μ L	ST R100 μ L RPMI 100 μ L	Controle de esterilidade Solução de trabalho resina				
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			ST P100 μ L RPMI 100 μ L	ST P100 μ L RPMI 100 μ L	ST P100 μ L RPMI 100 μ L	Controle de esterilidade Solução de trabalho própolis				
D						RPMI 98 μ L DMSO 2 μ L IN 100 μ L	RPMI 98 μ L DMSO 2 μ L IN 100 μ L	RPMI 98 μ L DMSO 2 μ L IN 100 μ L	Controle de toxicidade DMSO				
E	ST P 100 μ L IN 100 μ L	RPMI 50 μ L ST P 50 μ L IN 100 μ L	RPMI 80 μ L ST P 20 μ L IN 100 μ L	ENSAIO PRÓPOLIS		RPMI 100 μ L IN 100 μ L	RPMI 100 μ L IN 100	RPMI 100 μ L IN 100	Controle de viabilidade Inóculo				
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			A 200 μ L IN 100 μ L	RPMI 100 μ L A6 100 μ L IN 100 μ L	RPMI 100 μ L A7 100 μ L IN 100 μ L	A8 100 μ L descarte				
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR				IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	Controle de atividade Antibiótico		
H						IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR				

Figura 6a Diagrama de aplicação de soluções utilizadas em ensaio da atividade de “pool” de resinas e própolis de *Scaptotrigona* (Estação Experimental de Luiz Antônio, SP e Barra do Corda, MA) contra fungos filamentosos isolados nas colméias – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A ordem de cima para baixo das abreviaturas representa a ordem de aplicação das soluções. Os valores a frente das abreviaturas indicam os volumes aplicados. Abreviaturas: **ST R** – Soluções de trabalho de resina; **ST P** - Soluções de trabalho de própolis; IN – Inóculo de fungo; **RPMI** – Caldo RPMI 1640; **DMSO** – Dimetilsulfóxido; **A6**; **A7**; **A8** – Solução de anfotericina B vinda do poço 6,7,8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POOL RESINA 1000 µg/mL	POOL RESINA 500 µg/mL	POOL RESINA 200 µg/mL	ENSAIO RESINA		-	-	-	Controle de esterilidade Solução trabalho resina			
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			POOL RESINA 1000 µg/mL	POOL RESINA 1000 µg/mL	POOL RESINA 1000 µg/mL				
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO PRÓPOLIS		POOL PRÓPOLIS 1000 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 1000 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 1000 µg/mL	Controle de esterilidade Solução trabalho própolis			
D						DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)				
E	POOL PRÓPOLIS 1000 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 500 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 200 µg/mL	ENSAIO PRÓPOLIS		-	-	-	Controle de atividade Antibiótico			
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			Anfotericina B 10 µg/mL	Anfotericina B 5 µg/mL	Anfotericina B 2,5 µg/mL				
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO PRÓPOLIS		IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	"			
H						IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR				

Figura 6b - Diagrama de concentração de substâncias utilizadas em ensaio da atividade de "pool" de resinas e própolis de *Scaptotrigona* (Estação Experimental de Luiz Antônio, SP e Barra do Corda, MA) contra fungos filamentosos isolados nas colméias – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A concentração dos inóculos nos poços nos quais foram aplicados foi de 5×10^4 esporos/mL.

3.2.3.3 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra fungos isolados

Para aumentar os subsídios para a discussão a respeito dos resultados obtidos pelo procedimento anterior foi averiguada a atividade de mel alimento, larval e pólen de *Scaptotrigona* contra os fungos antes escolhidos. A atividade foi verificada através de método de difusão em placa adaptado de FUNED (2008a). O mel dos ninhos de *Scaptotrigona* nas duas localidades foi recolhido com seringas descartáveis estéreis. Já os favos de cria e potes de pólen fermentado do ninho foram destacados do ninho. Em fluxo laminar estes tiveram seus conteúdos recolhidos em tubos tipo Falcon. Procurou-se retirar somente alimento larval das células mais externas do favo através do uso de pipetador automático, já o pólen foi recolhido com espátula estéril. No início dos ensaios incubou-se os fungos *A. niger* + *Aspergillus sp.*, *Paecilomyces variotti*, (EELA) e *A. niger*, *A. japonicus* + *A. niger* (Barra do Corda) em BDA por 5 a 7 dias, 30°C, em garrafas de boca larga. Com os mesmos procedimentos do subitem 3.2.3.2 produziu-se soluções de esporos em salina. Igualmente ao subitem 3.2.3.2, verificou-se a concentração de esporos nas soluções e realizou-se diluições seqüenciais até se obter soluções 10⁶ esporos/mL. Desta última solução foram transferidos 100µL para placa de Petri (15cm) preparada com 20mL de ágar Mueller-Hinton enriquecido com glicose, método baseado em ESPINEL-INGROFF *et al.*(2007). O ágar Muller-Hinton foi preparado diluindo-se 2,1g caldo Mueller-Hinton (Himedia); 2g ágar (Synth); 1,5g de dextrose (Merck) para cada 100mL de água destilada. As soluções de esporos foram espalhadas pelo ágar com alça de Drigalski, até que o ágar não apresentasse excesso de umidade. A seguir, procedeu-se a feitura de três orifícios no ágar com o uso de ponteira de 200µL e em seguida colocou-se discos de papel filtro (6mm x 3mm) nestes orifícios (APÊNDICE 1). Em seguida foi colocado em um primeiro orifício 40µL de mel, em um segundo 40µL de alimento larval e no terceiro com espátula procurou-se preencher o orifício com o pólen. Como controles foram utilizados discos de papel (3mm) com 12µg de anfotericina B. Estes foram preparados embebendo-se discos estéreis com 12µL de solução de anfotericina B a 1000µg/mL e secando-os em fluxo laminar. Finalizada a

montagem dos ensaios, em triplicata para cada fungo, dos ensaios, as placas foram incubadas a 30°C e foram observadas após 24h. Os halos presentes foram medidos com régua. Os diâmetros dos halos de inibição dos elementos testados foram comparados com os halos de anfotericina B através de teste U de Mann-Whitney.

3.2.3.4 Isolamento de bactérias

Os procedimentos para isolamento de bactérias foram realizados no laboratório de Farmacognosia do departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, Ribeirão Preto.

A partir de cinco colônias de *Scaptotrigona* das duas localidades retirou-se, com agulhas estéreis, amostras de cerume do invólucro da área de cria que foram colocadas em tubos estéreis. Escolheu-se o invólucro como fonte de amostra, porque este é manipulado pelas abelhas, além de possuir resina. As amostras de Barra do Corda foram mantidas moderadamente refrigeradas até o fim do transporte ao laboratório. Logo em seguida, amostras de invólucro foram transferidas para tubos de ensaio nos quais foram acrescentados peptona 0,1% (pH 7) na proporção de 5mL para cada 1mg de amostra. Os tubos foram incubados por 24h, e a partir do caldo de peptona incubado procedeu-se quatro diluições seqüenciais na razão 1:10 em peptona (1mL caldo com bactérias: 9mL de peptona). Então, baseado no crescimento das bactérias (turbidez) da solução de peptona escolheu-se dois tubos com diferentes concentrações para cada amostra vinda de cada colônia. De cada tubo retirou-se 100µL que foram transferidos para placas de Petri de 15cm com ágar de soja tríptica (TSA, Himedia) acrescidas de cicloheximida (Sigma-Aldrich) a 50µg/mL. O inóculo foi espalhado nas placas com alça de Drigalski, até o esgotamento do excesso de umidade. As placas foram repetidas em duplicatas e incubadas a 30°C por 48h. A seguir, procedeu-se a contagem dos morfotipos de colônias, para se definir os morfotipos mais comuns e isola-los. Padronizou-se o período de incubação em 48h devido ao crescimento lento de algumas bactérias, bem como para permitir que um crescimento maior para que certas colônias definissem

melhor o seu morfotipo em relação a outros. Logo em seguida, com de alça de platina recolheu-se o material das bactérias escolhidas. Foi tomado material de colônias totalmente individualizadas de cada morfotipo escolhido por placa. Cada material foi inoculado em duplicata em tubos de ensaio de TSA. Os tubos foram incubados a 30°C até que as bactérias cobrissem a maior área possível do meio, depois os tubos foram conservados em geladeira. A identificação das bactérias foi realizada na Embrapa Meio-Ambiente, Jaguariúna, SP. A identificação foi realizada através de cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de ácidos graxos das paredes das células bacterianas e análise do resultado através de comparação com o banco de dados através do programa Sherlock MIS 4.0 (MIDI - Microbial Identification Inc.). Foram considerados identificados apenas os isolados que atingiram índices de similaridade acima de 0,5 em escala de 0 a 1 (MIDI, 2008). Porém as identificações ainda assim não foram consideradas boas porque, na maioria dos casos, a diferença entre os índices da primeira espécie sugerida com o da segunda espécie, não foi $\geq 0,1$ (MIDI, 2008). Para uso nos ensaios, foram escolhidas as 3 espécies com maiores índices de similaridades e com maior número de unidades formadoras de colônia na fase de isolamento. Assim, das bactérias isoladas nas colônias de *S. aff. depilis* (EELA) utilizou-se: *Tetragenococcus halophilus*, *Salmonella bongori* e *Kluyvera cryocrescens*. Das originadas de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda) foram usadas: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* GC subgrupo A e *Salmonella-choleraesuis-choleraesuis*-GC subgrupo B. As bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Enterobacter* e *Kluyvera* pertencem a família de bactérias gram-negativas Enterobacteriaceae (SMITH, 1984; NHUNG *et al.*, 2007). Esta família caracteriza-se por abrigar bactérias causadoras de patologias humanas e por causar fermentação ácida de glicose. Sendo assim, isto pode deteriorar o mel e inviabilizar seu consumo por *Scaptotrigona*. Assim como a bactéria gram-positiva *T. halophilus* também se relaciona a degradação de açúcares com a produção de ácido láctico (JUSTÉ *et al.*, 2008).

3.2.3.5 Avaliação da atividade das resinas contra as bactérias isoladas

Os procedimentos para avaliação de atividade contra as bactérias foram realizados no laboratório de Farmacognosia do departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, Ribeirão Preto.

Foram utilizados os mesmos procedimentos do método de microdiluição em placa de 96 poços dos ensaios sobre a atividade dos “pools” de resina e própolis contra *Staphylococcus aureus* (subitem 3.2.2.2). Assim, foram preparados “pools” de resina e própolis das duas abelhas, para serem usados nos ensaios contra as bactérias isoladas de seus respectivos ninhos. Bem como as soluções, inclusive dos controles, também foram preparadas da mesma maneira que no ensaio de *S. aureus*. As aplicações das soluções também foram similares, produzindo as mesmas concentrações descritas no subitem 3.2.2.2 (figuras 5a , 5b e 7a, 7b). Porém, para as enterobacteriáceas, que são gram-negativas, foi utilizada estreptomicina (Sigma) como controle de atividade. Assim, preparou-se uma solução de estreptomicina a 1000µg/mL em tampão fosfato de potássio a 1% (pH 6,0). A seguir, se diluiu 1mL desta solução em 9mL de caldo Mueller-Hinton. Da solução anterior tomou-se 1mL que foi diluído em 5mL de caldo Mueller-Hinton resultando em uma solução final de estreptomicina a 20µg/mL. Foram feitos controles com antibióticos para se avaliar a resistência das bactérias. A imagem dos poços foi analisada através do programa Flicker - V0.87.1-beta (LEMKIN, THORNWALL e EVANS, 2005). Os valores densitométricos dos poços dos “pools” de resinas e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* foram comparados com os poços do controle de viabilidade de *Kluyvera cryocrescens* através de ANOVA e teste de Tukey. Os valores densitométricos dos poços de controle de viabilidade das bactérias de Barra do Corda foram comparados com os valores dos poços com “pools” de resinas de *Scaptotrigona sp.* nas concentrações de 200µg/mL até 1562,5 µg/mL através teste de Kruskal-Wallis.

3.2.3.6 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra bactérias isoladas

Para aumentar os subsídios para a discussão a respeito dos resultados obtidos pelo procedimento anterior foi averiguada a atividade de mel alimento, larval e pólen de *Scaptotrigona* contra as bactérias antes escolhidas. A verificação foi feita através de método de difusão em placa adaptado de FUNED (2008a).

Da mesma forma como no subitem 3.2.3.2 coletou-se alimento larval, pólen fermentado e mel das duas localidades. E da mesma forma os procedimentos de avaliação foram adaptados de FUNED (2008a). As bactérias (subitem 4.2.3.4) foram inoculadas em tubos de ensaio com TSA e cultivadas a 30°C por 24h. Após esse período, adicionaram-se as bactérias em tubos com 6000µL de salina 0,85% até se obter uma suspensão similar à escala Mc Farland de 0,5 (10^8 UFC/mL). Em seguida, diluiu-se duas vezes, 1:10 as suspensões, adicionando 500µL destas em 4500µL de salina, até se obter inóculos com 10^6 UFC/mL. E seguida, foi adicionado 150µL do inóculo, de cada espécie de bactéria em placas de Petri de 15cm com 20mL de ágar Mueller-Hinton (Difco). O inóculo foi espalhado no meio com suabe em três direções, até a redução de umidade no meio. Então, procedeu-se da mesma forma como no subitem 3.2.3.2, ou seja, em cada placa foram feitos orifícios, que receberam discos de papel filtro e 40µL de cada elemento testado no ensaio. Diferentemente, do subitem 3.2.3.2, o pólen foi solubilizado em água na proporção de 1g para 1,3mL, isto porque no ensaio com fungos, a colocação do pólen seco mostrou-se problemática. Como controle de atividade antibacteriana, a cada placa foi adicionado um disco de gentamicina (10µg Sensifar, Cefar, Diagnóstica). O ensaio contra cada bactéria foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 30°C por 24h, e após esse período, os halos de inibição presentes foram medidos com régua. Os diâmetros de halo de inibição da gentamicina foram comparados como os halos dos elementos testados através de teste de t para duas amostras independentes ou pelo teste U de Mann-Whitney.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	C 90 μ L SM R 100 μ L IN 10 μ L	C 140 μ L SM R 50 μ L IN 10 μ L	C 165 μ L SM R 25 μ L IN 10 μ L	C 184 μ L SM R 6 μ L IN 10 μ L			C 200 μ L	C 200 μ L	C 200 μ L	Controle esterilidade Caldo Mueller-Hinton			
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO RESINA		SM R 100 μ L C 100 μ L	SM R 100 μ L C 100 μ L	SM R 100 μ L C 100 μ L	Controle esterilidade Solução trabalho resina			
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			SM P 100 μ L C 100 μ L	SM P 100 μ L C 100 μ L	SM P 100 μ L C 100 μ L	Controle esterilidade Solução trabalho própolis			
D							DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	DMSO 100 μ L C 190 μ L IN 10 μ L	Controle toxicidade DMSO			
E	C 90 μ L SM R 100 μ L IN 10 μ L	C 140 μ L SM R 50 μ L IN 10 μ L	C 165 μ L SM R 25 μ L IN 10 μ L	C 184 μ L SM R 6 μ L IN 10 μ L			C 190 μ L IN 10 μ L	C 190 μ L IN 10 μ L	C 190 μ L IN 10 μ L	Controle viabilidade Inóculo			
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO PRÓPOLIS		A 200 μ L C 90 μ L IN 10 μ L	C 100 μ L A 7 μ L C 90 μ L IN 10 μ L	C 100 μ L A8 100 μ L C90 IN 10	A9 100 μ L Descarte			Controle atividade Antibiótico
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			
H							IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			

Figura 7a - Diagrama de aplicação de substâncias utilizadas em ensaio da atividade de “pool” de resinas e própolis de *Scaptotrigona* (EELA, SP e Barra do Corda, MA) contra bactérias isoladas nas colméias – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A ordem de cima para baixo das abreviaturas representa a ordem de aplicação das soluções. Os valores a frente das abreviaturas indicam os volumes aplicados. Abreviaturas: **C** – Caldo Mueller-Hinton; **ST R** – Soluções de trabalho de “pool” resina; **SR P** – Solução de trabalho de “pool” de própolis; **IN** – Inóculo de bactéria; **DMSO** – Solução de dimetilsulfóxido; **A** – Solução de antibiótico (g+ - penicilina G, g- - estreptomicina); **A7; A8; A9** – Solução de antibiótico vinda do poço 8,9,9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 1562,5 µg/mL	POOL RESINA 781,25 µg/mL	POOL RESINA 200 µg/mL			-	-	-			
B	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO RESINA			POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 3125 µg/mL	POOL RESINA 3125 µg/mL	Controle esterilidade Solução trabalho resina	
C	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	Controle esterilidade Solução trabalho propólis		
D							DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)	DMSO 1% (v/v)	Controle toxicidade DMSO		
E	POOL PRÓPOLIS 3125 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 1562,5 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 781,25 µg/mL	POOL PRÓPOLIS 200 µg/mL			-	-	-			
F	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	ENSAIO PRÓPOLIS			PENICILINA G 10 µg/mL	PENICILINA G 5 µg/mL	PENICILINA G 2,5 µg/mL	Controle viabilidade Inóculo	
G	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			
H							IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR	IDEM ANTERIOR			

Figura 7b Diagrama de concentrações de substâncias utilizadas em ensaio da atividade de “pool” de resinas e própolis de *Scaptotrigona* (EELA, SP e Barra do Corda, MA) contra bactérias isoladas nas colméias – Método de microdiluição em placa de 96 poços. A concentração de bactérias nos poços onde se aplicou o inóculo foi de 5×10^4 UFC/poço.

3.2.4 Manipulação das resinas e sua composição química

Uma colônia de *S. aff. depilis* do meliponário do Departamento de Genética, FMRP-USP foi transferida de sua colméia para uma nova colméia. Esta nova colméia não estava pintada e foram transferidos apenas os favos de cria com invólucro e as abelhas. O mel foi colocado em copos plásticos pequenos e o pólen em potes de cera de *Apis mellifera* vedados. Procurou-se manter a colônia sempre abastecida de alimento (xarope de açúcar e água 50% v/v). Também foram colocados pedaços de cera de *A. mellifera*, para que as abelhas utilizassem como material para organização do ninho. Logo após a transferência a colméia foi transportada para uma casa de vegetação (estufa vedada) no campus USP-RP. A colônia foi mantida por sete dias na casa de vegetação. Diariamente foi oferecida pela manhã resina de jatobá (*Hymenaea courbaril*) (fig. 8). Esta resina foi escolhida porque LANGERHEIM (2003) cita que os meliponíneos coletam-na e também porque previamente havia sido observado que *S. aff. depilis* coleta esta resina, quando ela é oferecida às abelhas. Como a resina de jatobá encontrava-se solidificada esta era amolecida com um pouco de álcool PA (Merck), sendo o excesso de álcool evaporado em estufa, só então, oferecia-se a resina. Após o sétimo dia retirou-se amostras das própolis depositadas para vedar a colméia.. A seguir ambas as amostras foram analisadas no laboratório de Química Orgânica, FCFRP. As amostras de resina de jatobá foram solubilizadas em hexano. As amostras de própolis foram solubilizadas em clorofórmio. Isto porque estas se mostraram de difícil solubilização. As análises das amostras foram realizadas por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Utilizou-se um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu – QP 2010 equipado com injetor automático AOC – 20Si operando no modo “split” (1:50), acoplado com um detector seletivo de massas. A aquisição dos resultados foi realizada com o auxílio do sistema de dados Shimadzu e biblioteca de espectro de massas Wiley 7.0. Para estas análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hidrogênio foi usado como gás de arraste e os espectros de massas foram obtidos no modo impacto eletrônico a 70 eV, com escala de massas variando entre 40-500 *m/z*. A temperatura do injetor foi de 250°C e a programação de temperatura, que foi utilizada para o forno, foi determinada da seguinte forma: iniciou-se com escala de 120-260°C elevando-se a temperatura com proporção de

20°C/min até atingir a temperatura de 260°C, que foi mantida por 5 min. Na seqüência foi estabelecida uma rampa de 260-280°C elevando-se 2°C/min, mantendo-se 280°C por 9 minutos. Em seguida, esta foi de 280-290°C com 2°C/min, assegurando-se 290°C por 20 minutos e finalizando-se a análise com o tempo de 45 minutos. As caracterizações químicas das amostras de própolis e resina de jatobá foram realizadas pelo estudo comparativo dos espectros de massas obtidos para cada amostra em relação àqueles disponíveis na biblioteca Wiley do sistema Shimadzu. O 5- α -colestano, com tempo de retenção em 14,2 min, foi adicionado na amostra de própolis para servir como padrão interno, o qual possibilita o cálculo da retenção relativa dos compostos de interesse o que aumenta a confiabilidade da metodologia de caracterização.



Figura 8 – Oferta de resina de jatobá (*Hymenea courbaril*) para *Scaptotrigona aff. depilis*.

4 RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES

4.1.1 Composição química das resinas das própolis

A análise de componentes principais dos “fingerprint” caracterizou as amostras de resinas de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda) e *S. aff. depilis* (EELA), dividindo-as em grupos distintos (fig 7). As amostras de Barra do Corda foram agrupadas pelos íons de m/z 153, 157, 209, 215, 217, 225, 371, 373, 401 e 471 que se mostraram mais intensos. Já as amostras da EELA foram agrupadas pelos íons de m/z 299, 301, 313, 315, 317, 331,333, 335, 349 e 351. Os “fingerprints” de cada grupo ao longo dos meses encontram-se no ANEXO 1.

4.1.2 Informações adicionais: massa da própolis, proporção de resina na própolis, realocação da própolis

No primeiro procedimento a média da massa de própolis recolhida na EELA nos cinco primeiros foi de 132g e a média dos cinco últimos meses foi de 103g. Foi indicado que os dois grupos não diferem entre si ($\alpha = 0,34$ - U de Mann-Whitney.). A média da massa de própolis obtida nos seis primeiros meses de coleta em Barra do Corda foi de 608,33g e para os seis últimos foi de 855,83g. Também não houve indicação de diferença entre os dois grupos ($\alpha = 0,061$ – teste t duas amostras).

No segundo experimento, verificou-se uma média de 49,22% de resina nas amostras de própolis obtidas na EELA nos seis primeiros meses de coleta. Para os seis últimos anotou-se 46,29% de média de resinas. Foi apontado que as médias amostras não apresentam diferenças ($\alpha = 0,43$ - U de Mann-Whitney.). Para as amostras de própolis de Barra do Corda a média de resina nos seis primeiros meses foi de 34,83% e para os seis últimos foi 37,39%. Estas amostras também foram consideradas semelhantes ($\alpha = 0,34$ - Mann-Whitney.).

No terceiro experimento, notou-se após o terceiro dia o surgimento de purpurina na melgueira da qual se retirou a própolis (fig. 8).

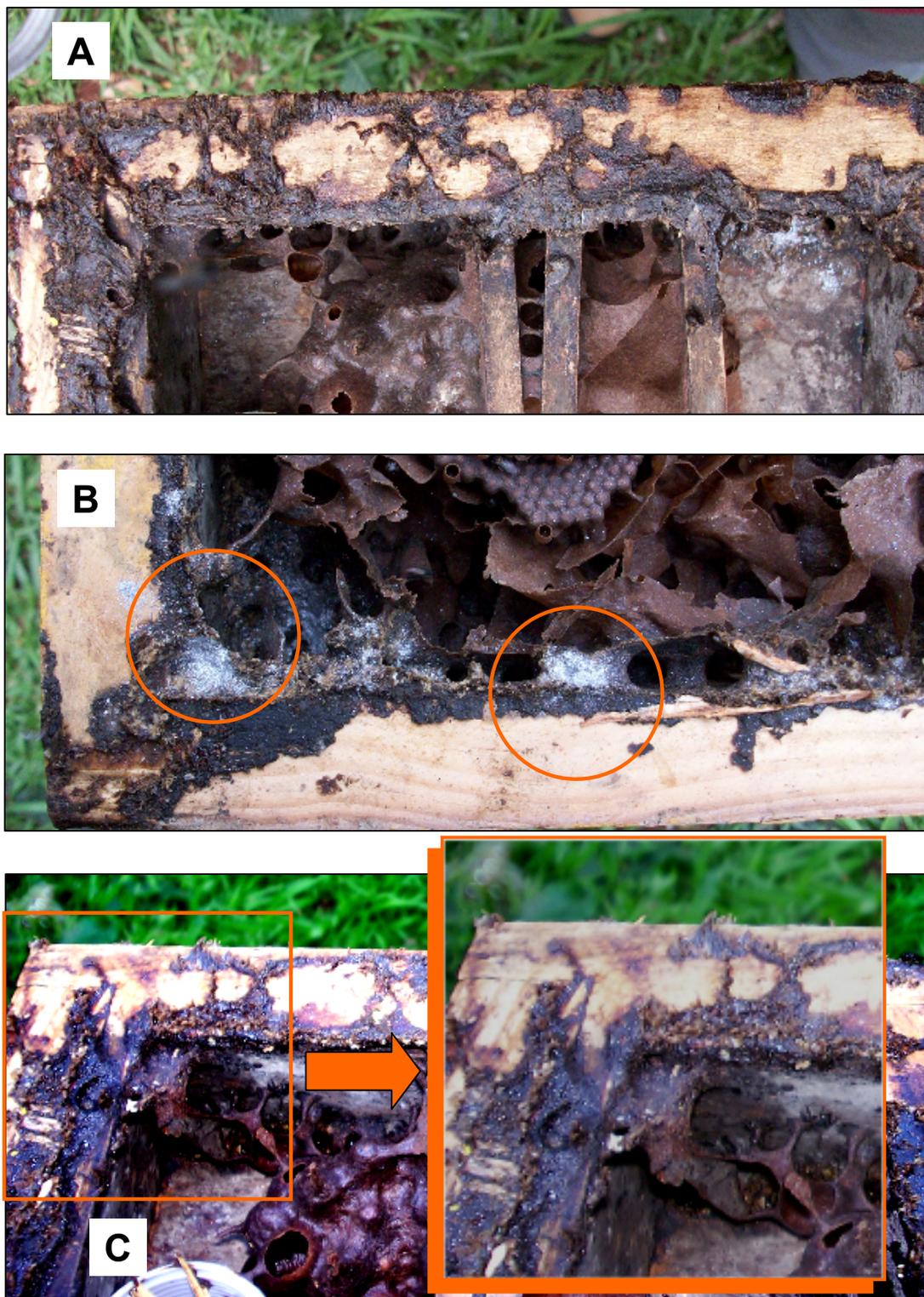


Figura 8 – Realocação de própolis. A- 1º dia retirada da própolis da vedação de melgueira superior. B – 1º dia purpurina prateada depositada em depósito de própolis (círculos laranja) na área de cria abaixo da melgueira. C – 3º dia melgueira superior com purpurina na própolis (pontos brilhantes no detalhe aumentado à direita).

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES

4.2.1 Ensaio para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico

Observou-se, para os “pools” de resina e própolis, a inibição de *S. aureus* nas concentrações de 3125µg/mL e 1562,5µg/mL (fig. 5b; fig.9). Isto é inferido através da cor vermelha do CTT. Este sal cora a atividade biológica, sendo que quanto maior o crescimento bacteriano maior é a intensidade da cor. Os controles indicam esterilidade das soluções utilizadas, bem como toxicidade desprezível do DMSO e viabilidade satisfatória do inóculo. Houve crescimento de *S. aureus* no poço F7 (10µg/mL), provocado, possivelmente, por algum erro nos procedimentos. Considerou-se que a estreptomicina inibiu *S. aureus* em todas as concentrações (fig. 5b). Isto porque, o crescimento no poço F7 foi pequeno e nas outras repetições deste poço bem como nas demais concentrações isto não ocorreu.

Segundo a ANOVA e o teste de Tukey, dos valores densitométricos para os poços com concentrações 781,25µg/mL dos “pools” de resina *Scaptotrigona aff. depilis* são maiores que os do “pool” ($\alpha < 0,001$). O mesmo ocorrendo com os valores desses os “pools” a 200µg/mL ($\alpha < 0,001$).

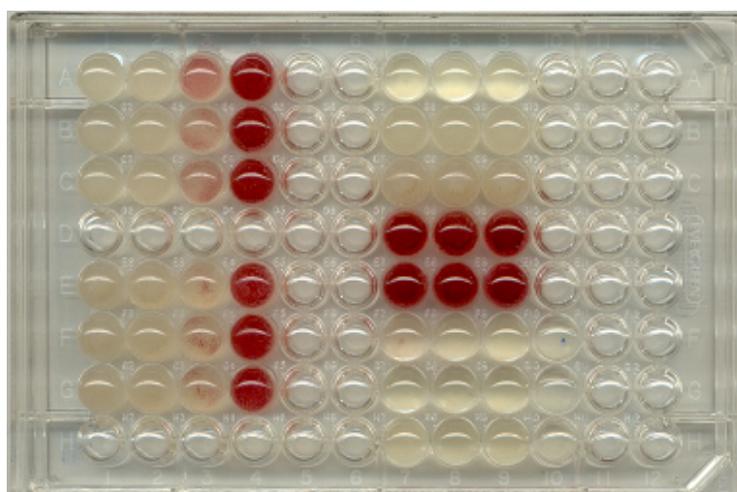


Figura 9 - Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* (EELA) contra *Staphylococcus aureus*.

4.3 RESINAS DAS VEDAÇÕES E SANIDADE DA COLÔNIA

4.3.1 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados

Os resultados dos ensaios de microdiluição do “pool” de *S. aff. depilis* (EELA) contra *A. niger* + *Aspergillus* e *Paecilomyces variotti* encontram-se na figura 10a e 10b respectivamente. Já os resultados do ensaio do “pool” de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda) contra *A. niger* e *A. japonicus* + *A. niger* estão nas figuras 11a e 11b. No ensaio do “pool” de resina verificou-se atividade. Houve redução no crescimento de *A. niger*+*Aspergillus sp* e *Paecilomyces variotti* (EELA) em todas as concentrações de “pools” de resina e própolis. O mesmo se verifica para *A. niger* (Barra do Corda) nos poços com “pool” de resina de *Scaptotrigona sp.* (11a). Como o controle de esterilidade da própolis apresentou-se contaminado, talvez por bactéria, o ensaio do “pool” de própolis contra *A. niger* foi descartado, pois é possível que o contaminante afete os resultados. A placa com *A. japonicus*+*A. niger*, foi integralmente desconsiderada. Como o controle de viabilidade do inóculo apresentou falhas no crescimento, em um poço que aparentasse atividade, existia a possibilidade que isso se desse por problemas no inóculo e não pela ação de qualquer substância. Bem como, houve sinais de contaminação no controle de esterilidade do “pool” própolis.

4.3.2 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra fungos isolados

Os diâmetros dos halos de inibição verificados nas placas com alimento larval, mel e pólen de *Scaptotrigona sp* e *S. aff. depilis* contra os fungos estão encontrados na TABELA 1.

Nas placas com *Aspergillus niger* + *Aspergillus sp.* nenhum elemento apresentou halo.

Para as placas com *Paecilomyces variotti* a média de diâmetro médio de halo de inibição para o alimento larval foi 13,33mm e a média de halo para os discos de anfotericina B foi, 9,67mm. Estas médias foram consideradas iguais ($\alpha=0,126$ – teste U Mann-Whitney).

Nas placas com *Aspergillus niger* a média de halo para alimento larval foi 9mm e a média de halo para anfotericina B foi 19,33mm ($\alpha=0,049$). Já nas placas com *A. japonicus* + *A. niger* a média de halo para alimento larval foi 8,67mm e a média de anfotericina B foi 15,67mm. Nestes dois últimos casos os diâmetros médios de alimento larval foram considerados menores que os diâmetros médios dos discos de anfotericina ($\alpha \leq 0,05$ – teste U Mann-Whitney).

Pólen e mel em nenhum dos casos apresentaram halos de inibição.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1/0	1/0	1/0	ENSAIO RESINA		0	0	0	Controle esterilidade do RPMI				
B	1/0	1/0	1			0	0	0		Controle da esterilidade Solução trabalho resina			
C	1/0	1/0	1			0	0	0		Controle da esterilidade Solução trabalho própolis			
D						3	3	3	Controle da toxicidade do DMSO				
E	1/0	1/0	1			4	4	4	Controle da viabilidade do inóculo				
F	1/0	1/0	1	ENSAIO PRÓPOLIS		0	4	3	Controle Atividade antifúngica				
G	1/0	1/0	1			1/0	3	3					
H							0	3		3			

Figura 10a Esquema dos resultados apresentados pela placa do ensaio de microdiluição dos “pools”, resinas e própolis, de *Scaptotrigona aff. depilis*, EELA, contra *Aspergillus niger* + *Aspergillus sp.*. Os valores indicam o crescimento do fungo nos poços e baseiam-se na comparação entre o crescimento ocorrido nos poços com o do controle de viabilidade do inóculo (subitem 4.2.3.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1/0	1/0	1/0	ENSAIO RESINA		0	0	0	Controle esterilidade do RPMI				
B	1/0	1/0	1			0	0	0		Controle da esterilidade Solução trabalho resina			
C	1/0	1/0	1			0	0	0			Controle da esterilidade Solução trabalho própolis		
D						4	4	3	Controle da toxicidade do DMSO				
E	1/0	2	1	ENSAIO PRÓPOLIS		4	4	3		Controle da viabilidade do inóculo			
F	1/0	1/0	1			3	3	3			Controle Atividade antifúngica		
G	1/0	1/0	1/0			3	3	3					
H						2	2	3					

Figura 10b Esquema dos resultados apresentados pela placa do ensaio de microdiluição dos “pools”, resinas e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis*, EELA, contra *Paecilomyces variotti*. Os valores indicam o crescimento do fungo nos poços e baseiam-se na comparação entre o crescimento ocorrido nos poços com o do controle de viabilidade do inóculo (subitem 4.2.3.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	1/0	1/0	ENSAIO RESINA		0	0	0	Controle esterilidade do RPMI			
	1/0	1/0	1/0			0	0	0		Controle da esterilidade Solução trabalho resina		
C	1/0	1/0	1/0			CONT	CONT	CONT	Controle da toxicidade do DMSO	Controle da esterilidade Solução trabalho própolis		
D						3	3	3				
E	CONT	0	2			4	4	4	Controle da viabilidade do inóculo			
F	MÉDIO	CONT	MÉDIO	ENSAIO PRÓPOLIS		0	0	0		Controle Atividade antifúngica		
G	MÉDIO	MÉDIO	MÉDIO			0	0	0				
H						0	0	0				

Figura 11a Esquema dos resultados apresentados pela placa do ensaio de microdiluição dos “pools”, resinas e própolis, de *Scaptotrigona sp.*, Barra do Corda contra *Aspergillus niger*. Os valores indicam o crescimento do fungo nos poços e baseiam-se na comparação entre o crescimento ocorrido nos poços com o do controle de viabilidade do inóculo (subitem 4.2.3.2). **CONT** – Contaminado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/0	1/0	0	ENSAIO RESINA		0	0	0	Controle esterilidade do RPMI			
B	1/0	1/0	0	ENSAIO RESINA		0	0	0	Controle da esterilidade Solução trabalho resina			
C	0	0	1/0			0	0	CONT	Controle da esterilidade Solução trabalho própolis			
D						0	4	4	Controle da toxicidade do DMSO			
E	0	3	CONT			4	1/0	0	Controle da viabilidade do inóculo			
F	1	3	2	ENSAIO PRÓPOLIS		0	0	0	Controle Atividade antifúngica			
G	0	CONT	0	ENSAIO PRÓPOLIS		0	0	0				
H						0	0	0				

Figura 11b Esquema dos resultados apresentados pela placa do ensaio de microdiluição dos “pools”, resinas e própolis, de *Scaptotrigona sp.*, Barra do Corda contra *Aspergillus japonicus* + *A.niger*. Os valores indicam o crescimento do fungo nos poços e baseiam-se na comparação entre o crescimento ocorrido nos poços com o do controle de viabilidade do inóculo (subitem 4.2.3.2). **CONT** – Contaminado.

TABELA 1 – Ensaio de difusão em placa para atividade de alimento larval, pólen fermentado e mel de colônias de *Scaptotrigona* contra fungos isolados destas colônias

EELA (<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>)				
	Alimento larval	Pólen	Mel	Anfotericina B
Fungo	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)
<i>Aspegillus niger</i>	-	-	-	13
(agregado	-	-	-	14
<i>Aspergillus sp.</i>)	-	-	-	12
<i>Paecilomyces</i>	13	-	-	10
<i>variotti</i>	13	-	-	12
	11	-	-	7
Barra do Corda (<i>Scaptotrigona sp</i>)				
	Alimento larval	Pólen	Mel	Anfotericina B
Fungo	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)	halo diâmetro (mm)
	9	-	-	19
<i>Aspegillus niger</i>	9	-	-	20
	9	-	-	19
<i>Aspegillus japonicus</i>	9	-	-	18
(agregado a <i>A. niger</i>)	9	-	-	15
	8	-	-	14

4.3.3 Avaliação da atividade das resinas contra as bactérias isoladas

O “pool” de resinas de *S. aff. depilis* (EELA), inibiu *Tetragenococcus halophilus* nas concentrações de 3125µg/mL e 1562,5µg/mL. Já pool de “própolis” não inibiu apenas em 200µg/mL. (fig. 12a). O “pool” de resina de *S. aff. depilis* inibiu *Salmonella bongori* em todas concentrações exceto em 200µg/mL. Já seu “pool” de própolis inibiu a bactéria em todas as concentrações. (fig. 12b). Os dois “pools” de *S. aff. depilis* não evitaram o crescimento de *Kluyvera cryocrescens* em nenhuma concentração (fig. 12c). Através de ANOVA e teste de Tukey, os valores densitométricos do ensaio do “pool” de resina foram comparados aos do controle de viabilidade. Indicou-se que o crescimento bacteriano foi menor em todas as concentrações ($\alpha < 0,001$) menos em 200µg/mL ($\alpha = 0,076$). Já o ensaio de “pool” de própolis apresentou valores menores em todas as concentrações em relação ao controle de viabilidade ($\alpha < 0,001$).

Todos os controles de esterilidade apontam para contaminação do “pool” de própolis de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda) em todas as placas (fig.13a, fig.13b, fig.13c).. Assim como no subitem 4.3.1, excluiu-se das análises esse “pool”. Como os “pools” de resinas não se apresentaram contaminados estes foram submetidos à análise. O “pool” de resina de *Scaptotrigona sp.* (Barra do Corda), não inibiu nenhuma das três bactérias em nenhuma concentração (fig.13a, fig.13b, fig.13c). Nas comparações dos poços com “pool” de resina a 200µg/mL, 781,25 µg/mL e 1562,5 µg/mL com os poços do controle de viabilidade, através do teste de Kruskal-Wallis, em todos os casos foram considerados semelhantes ($\alpha > 0,05$). Na placa com *Enterobacter aerogenes* considera-se que o poço F8 (controle estreptomicina) indica inibição, apesar de avermelhado. Isto porque o poço F8 foi atingido por vazamento de solução de um poço vizinho durante o transporte até o scanner.

4.3.4 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra as bactérias isoladas

Os diâmetros dos halos de inibição verificados nas placas com alimento larval, mel e pólen de *Scaptotrigona sp* e *S. aff. depilis* encontram-se na TABELA 2.

Para as placas com *Tetragenococcus halophilus*, a média de diâmetro de halo de inibição de alimento larval foi 13mm, a média de halo de pólen foi 7,67mm e média de halo para os discos de gentamicina foi 16,67mm. Já para as placas com *Salmonella bongori* a média de halo para o alimento larval foi 29,67mm, a média para halo de pólen foi 20,33mm e a média para halo de gentamicina foi 35mm. Para as placas com *Kluyvera cryocrescens* a média de halo para o alimento larval foi 11mm, a média de halo para o pólen foi 9mm e a média de halo de gentamicina foi 20,67mm. Em todas as placas o mel não apresentou halo. Em todos os casos comparando-se os halos dos alimentos (pólen e alimento larval) com os da gentamicina das mesmas placas, os halos dos alimentos foram considerados menores ($\alpha \leq 0,05$ – U Mann-Whitney).

Para as placas com *Enterobacter cloacae* a média de halo de alimento larval foi 13mm, a média de halo de mel foi 8,67mm e a média para gentamicina foi 19,67mm. Já para as placas com *Enterobacter aerogenes* a média de halo de alimento larval foi 13,33mm, a média de halo de mel foi 9,33mm e a média de halo de gentamicina foi 21,33mm. Para as placas com *Salmonella choleraesuis choleraesuis* a média de halo de alimento larval foi 11mm, a média de halo de mel foi 9mm e a média de halo de gentamicina foi 20,67mm. Em todos os casos os pólen não apresentou halo. Em todos os casos comparando-se os halos dos alimentos (mel e alimento larval) com os da gentamicina das mesmas placas, os halos dos alimentos foram considerados menores ($\alpha \leq 0,05$ – U Mann-Whitney).

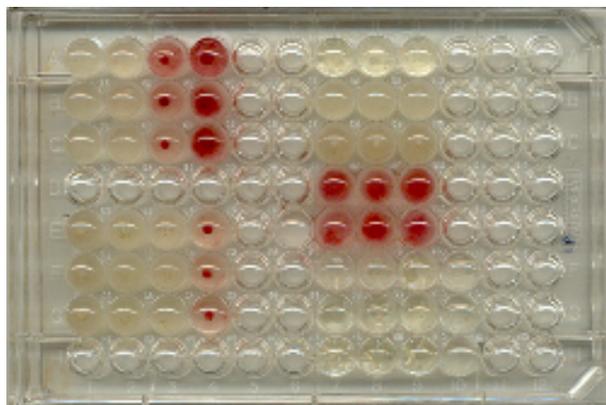


Figura 12a- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis*, EELA, contra *Tetragenococcus halophilus*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

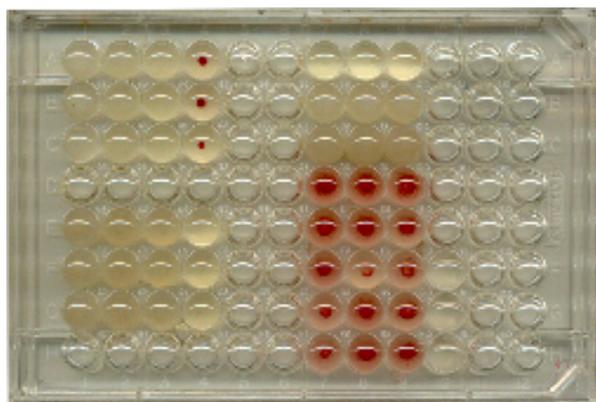


Figura 12b- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis*, EELA, contra *Salmonella bongori*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

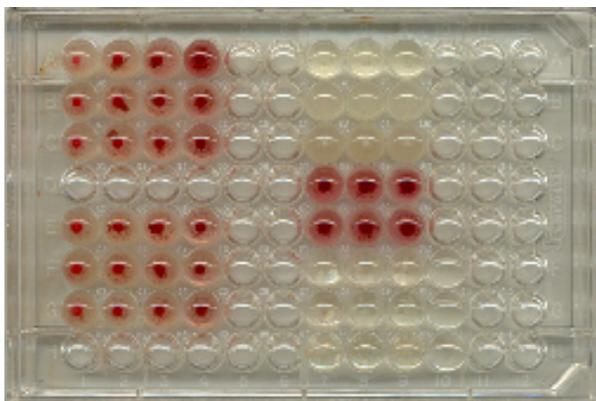


Figura 12c- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona aff. depilis*, EELA, contra *Kluyvera cryocrescens*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

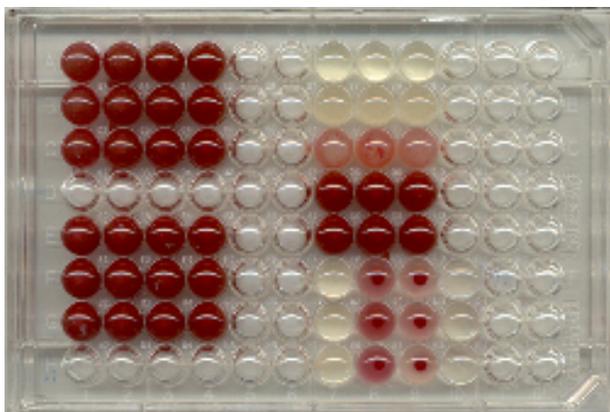


Figura 13a- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona sp.*, Barra do Corda, contra *Enterobacter cloacae*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

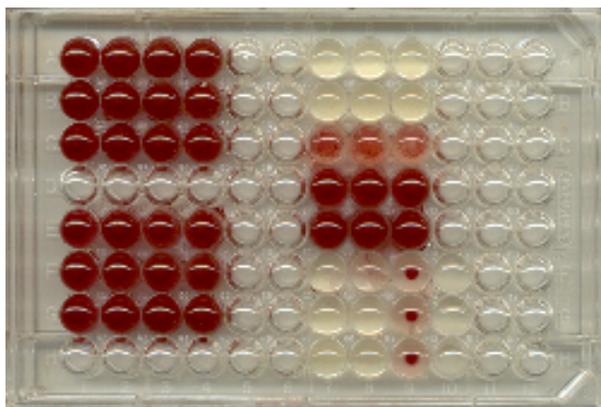


Figura 13b- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona sp.*, Barra do Corda, contra *Enterobacter aerogenes*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

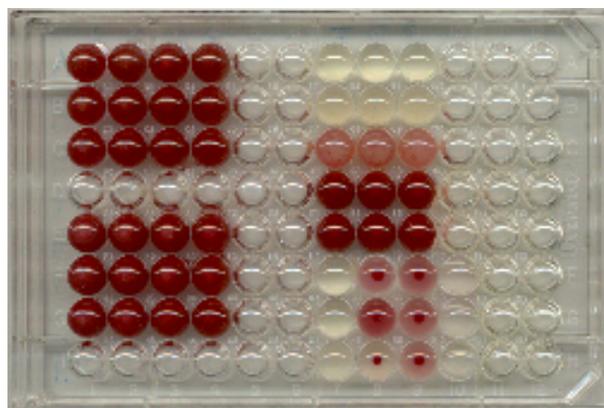


Figura 13c- Ensaio de microdiluição em placa de 96 poços dos “pools” de resina e própolis de *Scaptotrigona sp.*, Barra do Corda, contra *Salmonella choleraesuis choleraesuis*. Tons vermelhos indicam crescimento bacteriano.

TABELA 2 – Atividade antibacteriana de alimento larval, pólen fermentado e mel de ninhos de *Scaptotrigona* contra bactérias isoladas a partir destes ninhos.

EELA (<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>)				
Bactéria	Alimento	Pólen	Mel	Gentamicina
	larval			
	halo diâmetro	halo diâmetro	halo diâmetro	halo diâmetro
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	13	8	-	16
	13	8	-	18
	13	7	-	16
<i>Salmonella bongori</i>	28	19	-	35
	33	23	-	35
	28	19	-	35
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	20	12	-	26
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	18	11	-	28
	16	13	-	26
Barra do Corda (<i>Scaptotrigona sp</i>)				
Bactéria	Alimento	Pólen	Mel	Gentamicina
	larval			
	halo diâmetro	halo diâmetro	halo diâmetro	halo diâmetro
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Enterobacter cloacae</i>	13	-	6	19
	13	-	10	20
	13	-	10	20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13	-	9	21
	12	-	10	21
	15	-	9	22
<i>Salmonella choleraesuis</i>	12	-	9	20
<i>Salmonella choleraesuis</i>	11	-	9	21
<i>Salmonella choleraesuis</i>	10	-	9	21

4.4 MANIPULAÇÃO DAS RESINAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Com relação à amostra de resina de jatobá, a comparação entre os espectros de massas envolvendo os picos de interesse, detectou a presença de sesquiterpeno e diterpenos, pois tais espectros apresentaram índices de similaridade superiores a 90%. A figura 14 mostra o perfil cromatográfico desta amostra e as figuras 15, 16, 17 e 18 apresentam os dados que permitiram identificar os seguintes compostos: óxido de cariofileno, caureno, caurenol e ácido caruenóico, respectivamente. Na figura 19 são apresentadas as estruturas químicas destes sesquiterpeno e diterpenos.

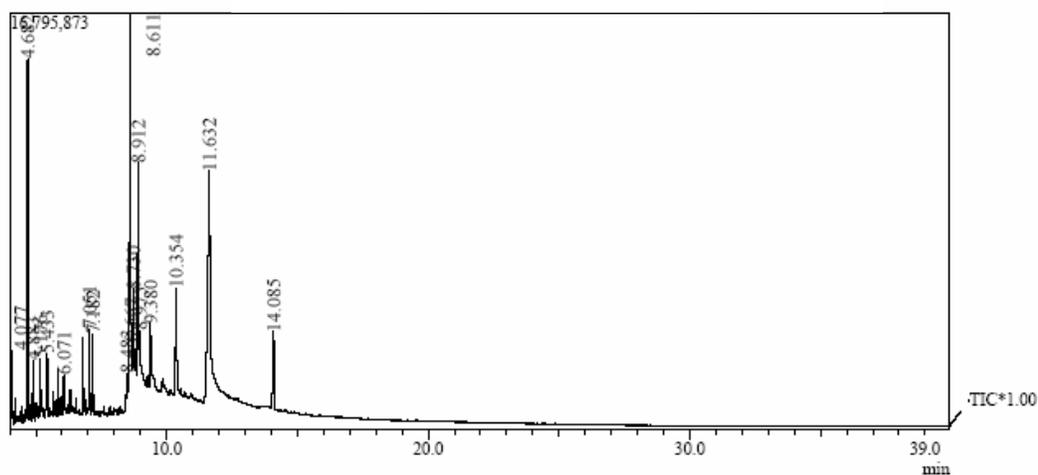


Figura 14 - Perfil cromatográfico por CG/EM de amostra de resina de jatobá (*Hymenaea courbaril*).

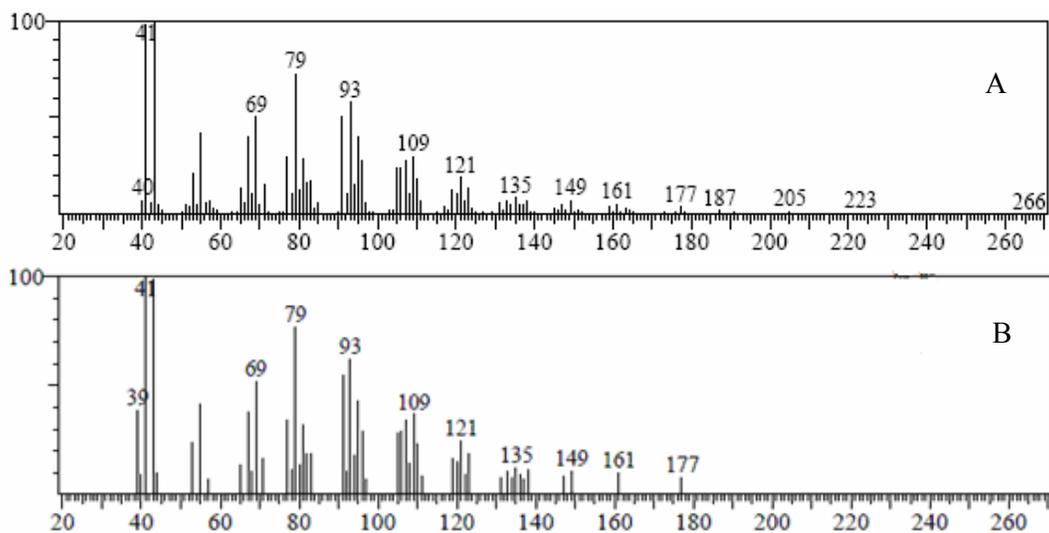


Figura 15 - Espectros de massas do óxido de cariofileno apresentando tempo de retenção em 4,6 min. **A** - Óxido de cariofileno detectado na amostra. **B** - Espectro deste sesquiterpeno disponível na biblioteca Wiley.

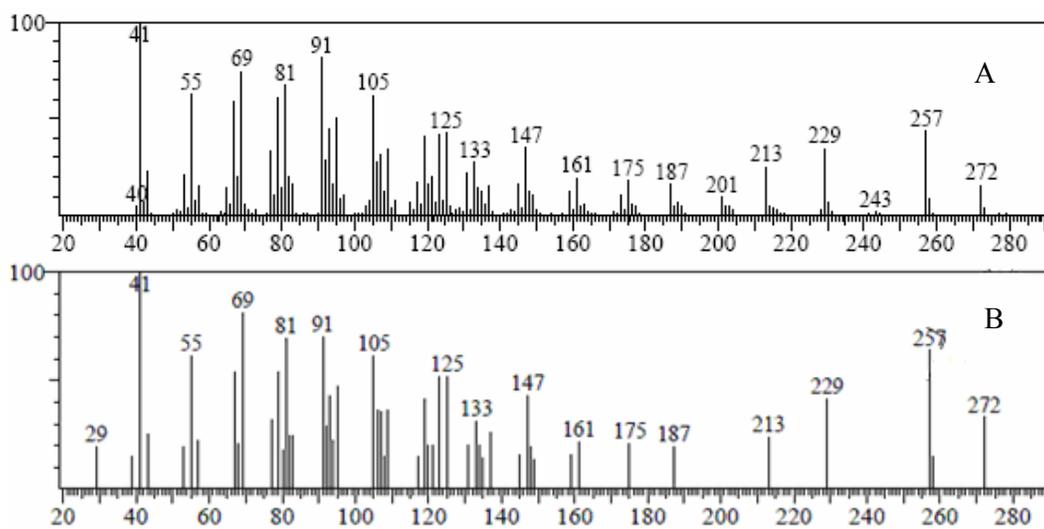


Figura 16 - Espectros de massas do careno apresentando tempo de retenção em 7,2 min. **A** - Careno detectado na amostra. **B** - Espectro deste diterpeno disponível na biblioteca Wiley.

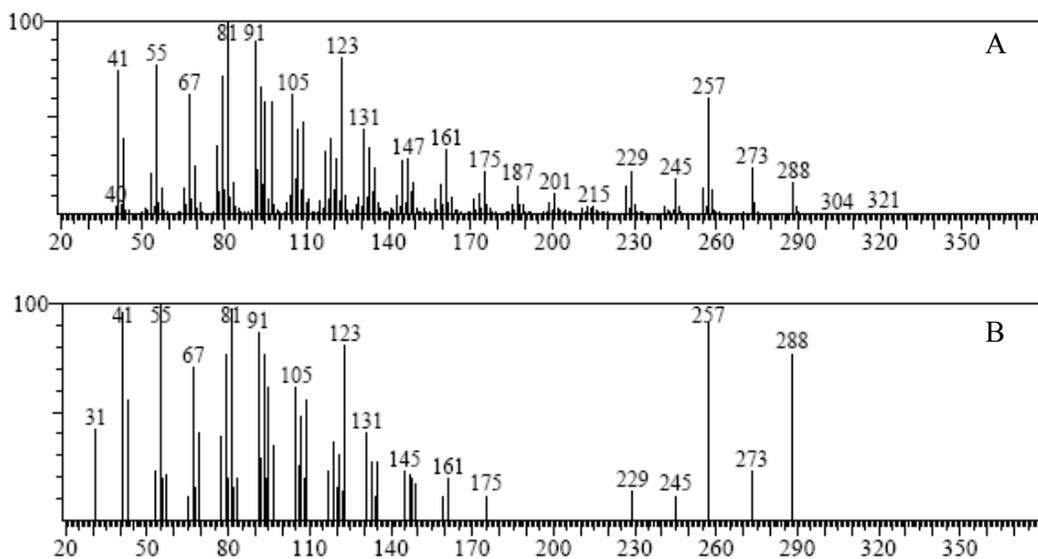


Figura 17 - Espectros de massas do caurenol apresentando tempo de retenção em 10,3 min. **A** - Caurenol detectado na amostra. **B** - Espectro deste diterpeno disponível na biblioteca Wiley.

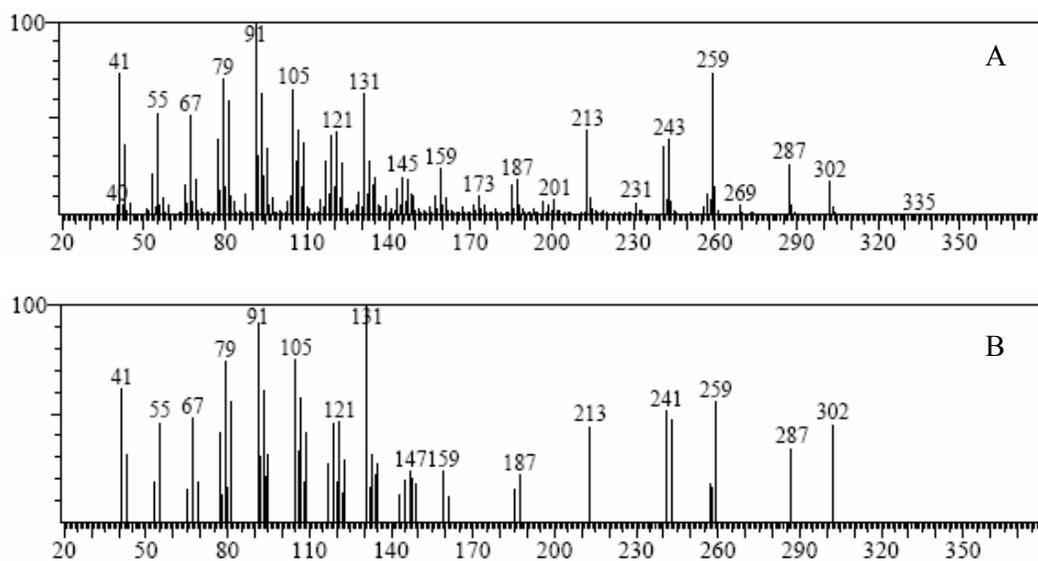


Figura 18 - Espectros de massas do ácido caurenóico apresentando tempo de retenção em 11,6 min. **A** - Ácido caurenóico detectado na amostra. **B** - Espectro deste diterpeno disponível na biblioteca Wiley.

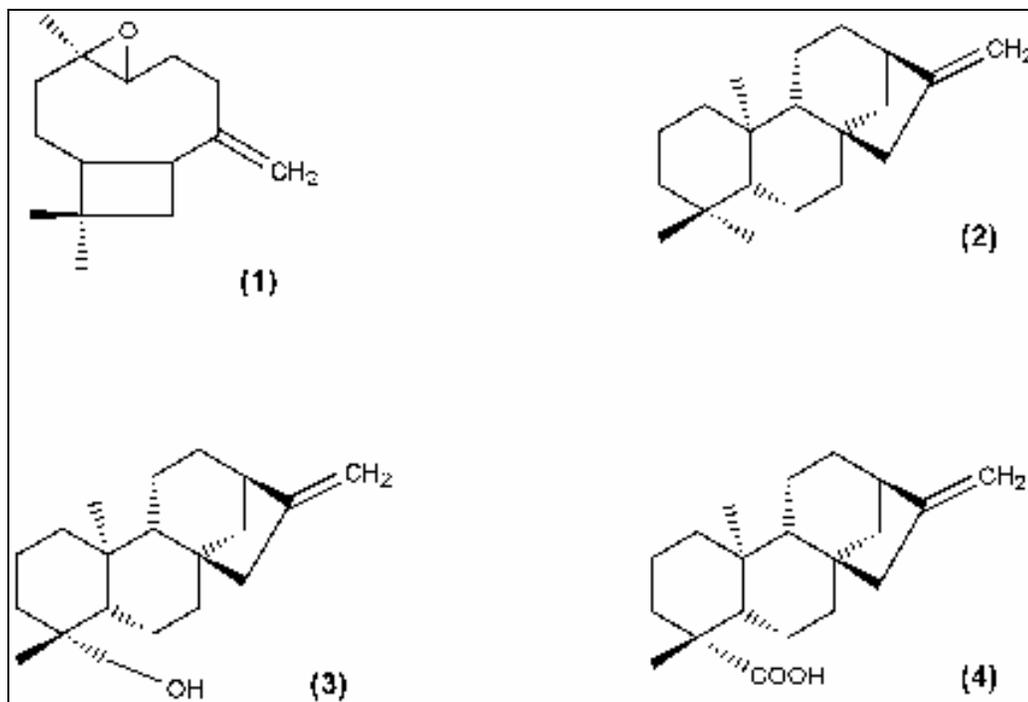


Figura 19 – Estrutura química dos terpenos caracterizados na amostra de resina de jatobá. (1) Óxido de cariofileno, (2) Careno, (3) Carenol e (4) Ácido carenóico.

Considerando a amostra de própolis de *S. aff. depilis* os espectros de massas apresentaram índice de similaridade em torno de 85%. Por isso, com o uso de padrão interno (5- α -colestano) e adição de padrões autênticos de α -amirina e lupeol, foi possível calcular a retenção relativa dos compostos de interesse. Este procedimento envolvendo a adição de padrões foi realizado para aumentar a confiabilidade da caracterização química desta amostra. Neste caso, α -amirina e lupeol, os quais foram detectados na amostra apresentaram retenção relativa de 2,37 e 2,39, respectivamente. Já os padrões autênticos destes triterpenos apresentaram retenção relativa de 2,36 e 2,38, respectivamente. Portanto, com base no estudo comparativo envolvendo espectros e retenção relativa, a qual apresentou dados bastante similares, os compostos detectados na amostra de própolis de *S. aff. depilis* são os triterpenos α -amirina e lupeol. A figura 20 apresenta o perfil

cromatográfico da amostra de própolis. As figuras 21 e 22 apresentam os espectros da α -amirina e lupeol, repectivamente. Na figura 23 são apresentadas as estruturas químicas destes triterpenos.

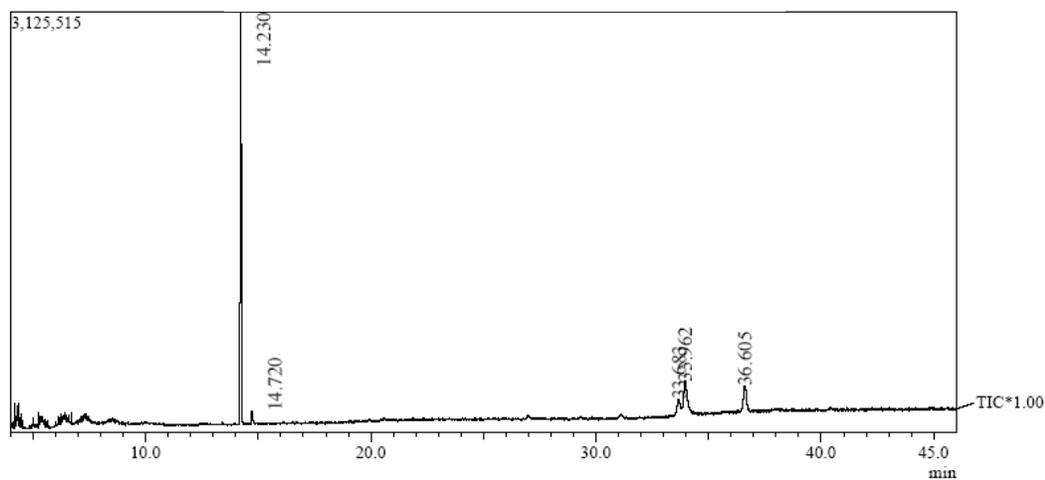


Figura 20 – Perfil cromatográfico por CG/EM de amostra de própolis de colméia de *Scaptotrigona aff. depilis*.

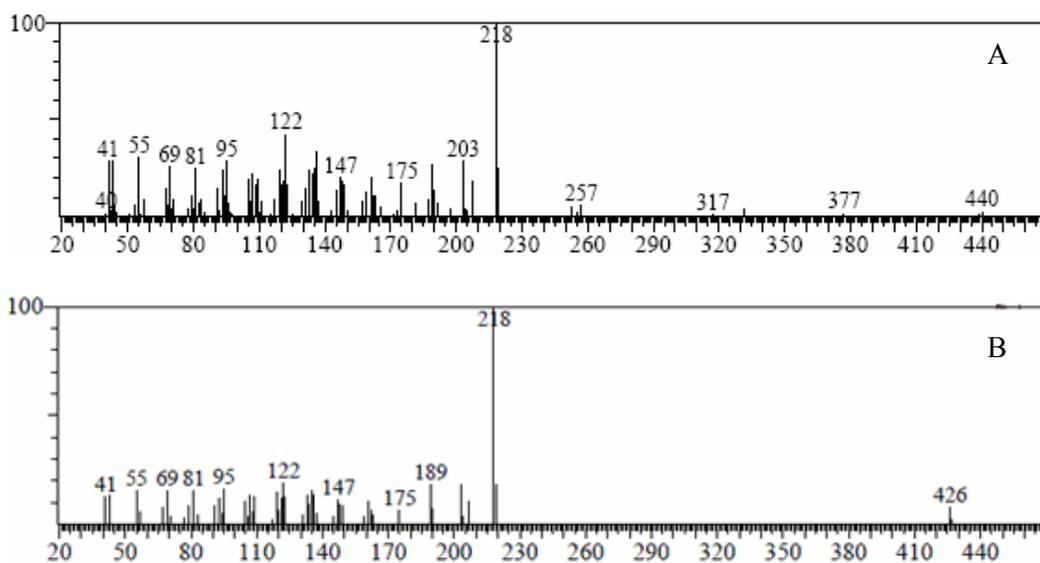


Figura 21 - Espectros de massas da α -amirina apresentando tempo de retenção em 33,6 min. **A** - α -amirina detectada na amostra. **B** - Espectro da α -amirina disponível na biblioteca Wiley.

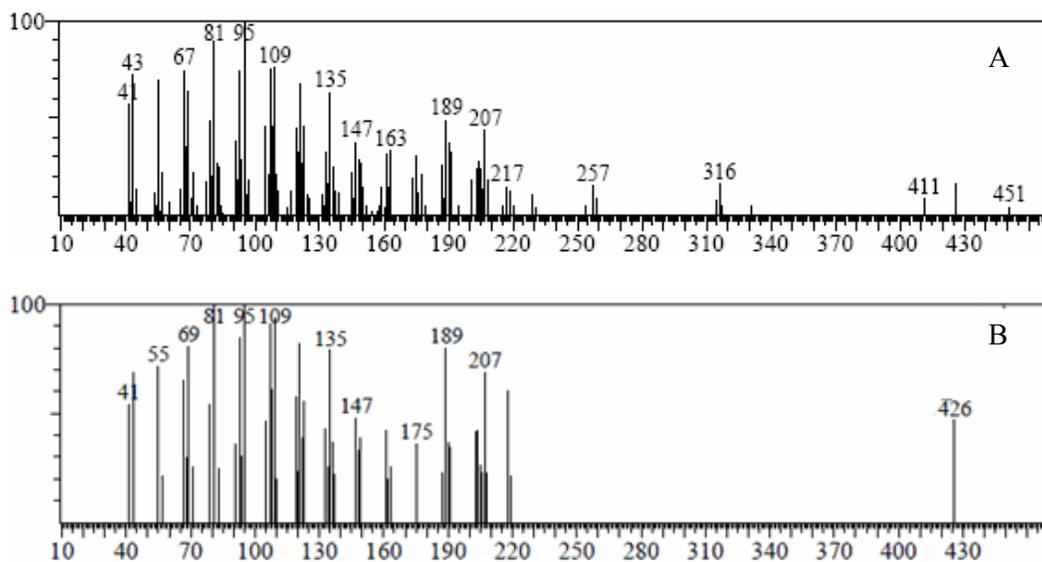


Figura 22 - Espectros de massas do lupeol apresentando tempo de retenção em 33,9 min. **A** - Lupeol detectado na amostra. **B** - Espectro do lupeol disponível na biblioteca Wiley.

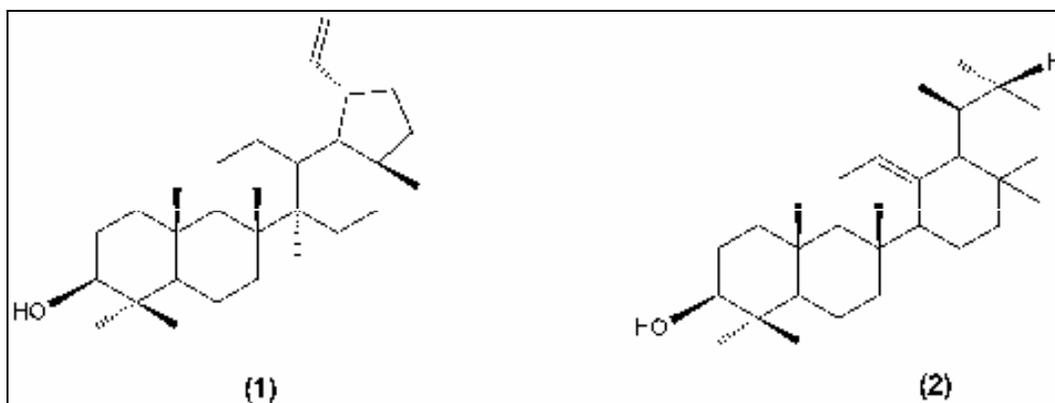


Figura 23 – Estrutura química dos triterpenos caracterizados na amostra de própolis de *S. aff. depilis*. (1) α -amerina; (2) Lupeol.

5 DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES

Ocorreram variações ao longo do período de coleta das amostras (ANEXO 1). Porém, observa-se pela da figura 7 que as amostras mensais de Barra do Corda (*Scaptotrigona sp.*) e da EELA (*S. aff. depilis*) podem ser divididas em dois grupos principais.

As amostras de Barra do Corda (*Scaptotrigona sp.*) foram caracterizadas pelos íons m/z 371, 373, 401 e 471 (ANEXO 1). SAWAYA *et al.* (2006) indicou que estes íons também encontrados em própolis de *Tetragonisca angustula*, ocorrem em *Schinus terebenthifolius*, popularmente conhecida como aroeira mansa. SAWAYA *et al.* (2009), *apud.* SAWAYA, *et al.* (2006) propuseram que o ESI(-)MS/MS destes íons indica que estes podem ser relacionados com terpenos ligados a grupos ácidos.

As amostras da EELA (*S. aff. depilis*) apresentaram tipicamente os íons m/z 301, 315, 317 e 333 (ANEXO 1) que foram descritos como marcadores de resinas de coníferas. Estes íons estão relacionados segundo SAWAYA (2006) ao ácido E/Z comúnicico (m/z 301), ao ácido agatálico (m/z 317) e ao ácido agático (m/z 333).

As indicações de origem vegetal não são contraditórias com o ambiente no qual se encontram instaladas as colméias. As colméias com *Scaptotrigona sp.* estão instaladas em uma área urbana e sabe-se que *S. terebenthifolius*, que além de ser amplamente distribuída é recomendada para a arborização urbana (CARMELLO-GUERREIRO e PAOLI, 1999; GUZZO e CARNEIRO, 2008). O local onde se encontram o meliponário com *S. aff. depilis* é cercado por plantações de *Pinus sp.* (UFSCAR, 2000). Estas árvores são frequentemente cortadas provocando liberação de resina (NORIN, 1972; PHILLIPS e CROTEAU, 1999; TRAPP e CROTEAU, 2001). Foram observados ainda em alguns talhões árvores que possuíam sinais de manejo para extração de resina. Assim pode-se propor que, apesar da diferença latitudinal das localidades, ao menos algumas fontes de resina tem indícios que foram determinadas por ação humana e não pela vegetação nativa.

A constância de oferta ao longo do ano das fontes de resina é deduzida pela não diferenciação entre as massas de própolis obtidas no início e no fim do período de coletas. A proposição sobre a constância das fontes, também é apoiada pela verificação de que a proporção de resinas nas amostras do início da coleta e do fim

não apresentou diferenças. Portanto, pode-se inferir que as abelhas não adicionaram mais cera para compensar a falta de resina. Ressalva-se apenas que como o experimento de realocação de própolis indicou transporte desta entre partes do ninho, é possível que este comportamento possa enviesar conclusões, através de análise de composição química, sobre a constância de oferta de resina por parte de uma fonte, ao longo do tempo.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RESINAS DA PRÓPOLIS DAS VEDAÇÕES

5.2.1 Ensaio para avaliação da atividade das resinas contra microorganismos de interesse clínico

As avaliações iniciais de atividade antimicrobiana dos “pools” de resinas foram realizadas através de princípio de difusão em placa. A falta de atividade de ambos os “pools” contra *E. coli* (fig.4), bem como a ausência de atividade do “pool” de *Scaptotrigona sp* (Barra do Corda) contra *S. aureus* (fig.4) poderiam ser distorções. Isto ocorreria devido à dificuldade dos “pools” de se difundirem pelo meio (RÍOS e RECIO (2005)). Acredita-se que este não seja o caso para o “pool” de *Scaptotrigona aff. depilis*, pois esse apresentou atividade nas placas com *S. aureus*. No caso do “pool” *Scaptotrigona sp*. ensaios anteriores de microdiluição em placa de 96 poços já apontavam a ausência de atividade destas resinas contra *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (fig.24). Isto torna verossímil os resultados dos ensaios de difusão. Já nos ensaios contra *C.albicans* dificuldades com difusão foram em parte contornados porque os “pools” foram incorporados ao meio.

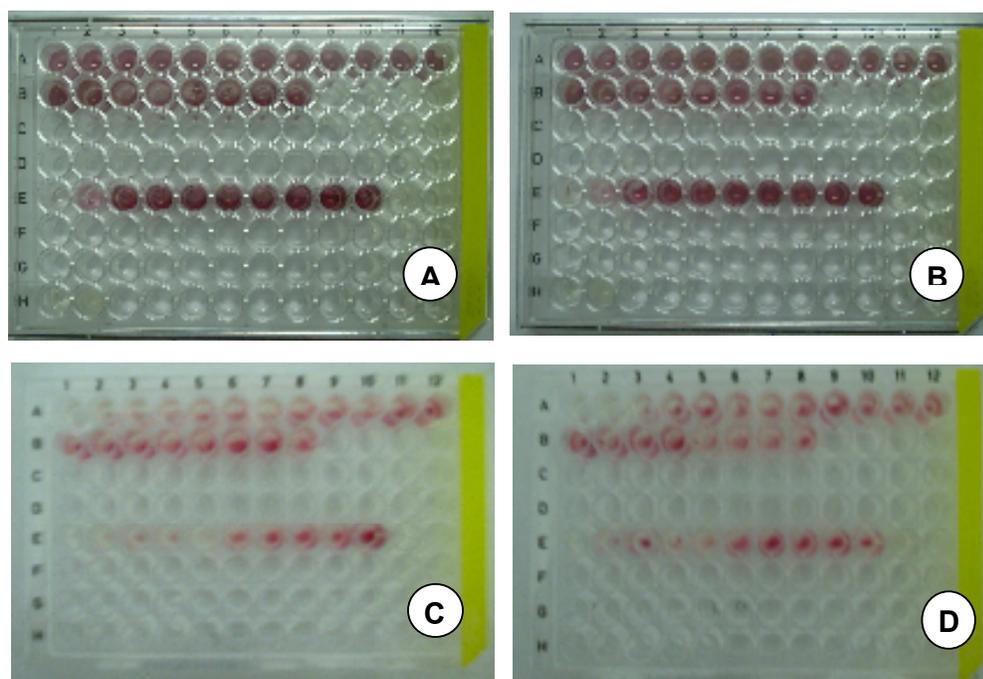


Figura 24 – Ensaio prévios de microdiluição em placa de 96 poços de “pool” de resina de *Scaptotrigona sp*. (Barra do Corda) poços 1A até B8. **A-B** - Duplicata de ensaio contra *Staphylococcus aureus*. **C-D** - Duplicata de ensaio contra *Escherichia coli*.

Em relação aos ensaios prévios do “pool” de *Scaptotrigona sp.* seria plausível esperar alguma atividade contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Isto porque como existe a indicação que pelo menos parte desta própolis vem de *Schinus terebenthifolius* (subitem 5.1) e que MARTINEZ et al. (1996) relataram atividade de *Schinus terebenthifolius* contra estas bactérias e também a falta de atividade para *C. albicans*. Porém, a ausência de atividade de *Schinus terebenthifolius* contra *E. coli* foi reportada por DEGÁSPARI; WASZCZYNSKJ e PRADO (2005), bem como também reportaram uma atividade baixa contra *S. aureus* e nenhuma atividade contra *C. albicans*. Um adendo que pode ser feito em relação aos dois trabalhos anteriormente citados. O primeiro foi realizado com plantas de Cuba e o segundo com uma planta do Paraná. Isto pode estar refletindo diferenças dadas por processos regionais. Já em relação aos ensaios prévios com o “pool” de *Scaptotrigona aff. depilis* de forma semelhante poderia se prever atividades relevantes contra *E. coli*, e *C. albicans*. Isto baseando-se na indicação de que ao menos parte da fonte de resina é *Pinus sp.* (subitem 5.1) e nos relatos de KIZIL et al. (2002) sobre a ação de resinas de *Pinus brutia* sobre estes microorganismos. A falta de atividade de ambos os “pools” contra *E. coli* poderia indicar um paralelo com a própolis de *A. mellifera* que não é eficaz contra bactérias gram-negativas SEIDEL et al. (2008). Poderia se aventar que a falta de atividade, contra os microorganismos, também pode ter sido gerada por uma baixa concentração de compostos com atividade antimicrobiana nos dois “pools”. Embora existam, relatos de atividade das plantas (*Schinus terebenthifolius* e *Pinus sp.*) que contribuíram para a formação da própolis, o método que indicou os íons característicos destas plantas não é quantitativo.

Através do ensaio de microdiluição considerou-se que a atividade dos “pool” (resina e própolis) de *Scaptotrigona aff. depilis* contra *Staphylococcus aureus* foi baixa em termos clínicos, pois, a atividade ocorreu a partir de 1562,5µg/mL e RÍOS e RECIO (2005) recomendam que atividades de extratos vegetais acima de 1000µg/mL sejam desconsideradas. SALOMÃO et al. (2007) verificaram que a própolis produzida por *A. mellifera*, a partir da resina de outra conífera (*Araucaria*) inibiu *S. aureus* a 0,4µg/mL. É interessante continuar a investigar aspectos que aumentem as opções de produtos oriundos da meliponicultura (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006) já que isto pode servir como auxílio à manutenção de projetos sociais ligados a ela (PIRES, DRUMMOND e LACERDA, 2006). As própolis dos

meliponíneos devem ser investigadas, pois a região Neotropical abriga a maior riqueza de meliponíneos. (CAMARGO e PEDRO, 1992) os quais podem estar associados a vários tipos de plantas produtoras de resina. Por exemplo, meliponíneos foram observados coletando em uma espécie de *Clusia* (GONÇALVES-ALVIM, 2001). E *Clusia* é um gênero que apresenta uma resina com atividade antimicrobiana inclusive contra *E. coli* (SUFFREDINI *et al.*, 2006). Bem como a atenção às interações inseto-planta podem gerar inferências a respeito das resinas coletadas pelos meliponíneos. Como é o caso das interações do jatobá cuja resina já foi vista sendo coletada por abelhas sem ferrão (JANZEN, 1975; LANGENHEIM, 2003).

Merece atenção também o fato de que os valores densitométricos nos poços com concentrações 781,25µg/mL do “pool” de resinas são maiores que os do “pool” de própolis ($\alpha < 0,001$). O mesmo ocorrendo com os valores desses “pools” a 200µg/mL ($\alpha < 0,001$). Esperava-se que a atividade dos “pools” de resina fosse maior que a da própolis em concentrações iguais. Já que a própolis conteria cerca de 48% de cera (subitem 4.1.2). Isto indicaria, talvez, que compostos com atividade nesta própolis tivessem afinidade por cera e após a maceração e filtração ficaram retidos nela.

5.3 RESINAS DAS VEDAÇÕES E SANIDADE DA COLÔNIA

5.3.1 Avaliação da atividade das resinas contra os fungos isolados

Estima-se que as colméias com *Scaptotrigona aff. depilis* (EELA) apresentaram uma concentração média de 3248,65µg/mL de própolis por volume de colméia/mês. Obteve-se esse valor baseando-se na média mensal de própolis obtida (117g) pelo volume dos módulos (6cm x 24,5cm x 24,5cm x 2 módulos x 5 colméias). Esta concentração na colméia está provavelmente subestimada. Pois, como as colônias também estavam sendo utilizadas para a produção de mel. Assim, não se retirava a própolis integralmente para não sobrecarregar a colônia. Como houve redução de crescimento de *Aspergillus niger* + *Aspergillus sp.* e *Paecilomyces variotti* em todas concentrações dos “pools” de própolis e resinas, que eram abaixo do valor suposto de concentração de própolis para as colméias. Assim é possível indicar que a resina coletada por *S. aff. depilis* e contida na própolis contribui para controlar o crescimento de fungos no ninho. Aqui se nota efeito similar ao subitem 5.2.1, pois, em concentrações iguais resina e própolis tiveram atividades semelhantes. Quanto se esperaria um efeito maior do “pool” de resina, já este teria menos cera que a própolis.

O “pool” de resina de *Scaptotrigona sp.* apresentou atividade contra *A. niger* (Barra do Corda) em todas as concentrações. Assim, infere-se que as resinas contidas na própolis auxiliam na redução do crescimento de fungos, ao menos *A. niger*, nas colônias de *Scaptotrigona sp.* Deduz-se isso porque a concentração média estimada de própolis para as colméias desta abelha é de 3755,41µg/mL, dada a média de própolis coletada (732,08g) e o volume das colméias (8cm x 28,5cm x 28,5cm x 3 módulos x 10 colméias). Considerando que a própolis contenha 50% de resina e 50% cera (suposição de valor maior que o aferido, subitem 4.1.2) haveria em média nas colméias uma concentração de 1877,5 µg/mL de resina por colônia/mês. Assim considerando o poço mais concentrado do ensaio de resina (1000µg/mL), verifica-se que as concentrações mensais deduzidas de resinas (1877,5 µg/mL), são compatíveis com uma média de 1000µg/mL ($\alpha=0,49$, teste-t para uma média).

Pode-se também inferir que a atividade das resinas é fungistática já que os fungos testados foram obtidos de própolis. E a própolis foi o material que originou a

maior quantidade de morfotipos de fungos (cinco) no caso, das colméias de *Scaptotrigona aff. depilis*. Das amostras de própolis de *Scaptotrigona sp.* foram obtidos nove morfotipos. No caso das própolis de *S. aff. depilis* dada a indicação que parte das resinas vem de conífera (subitem 5.1), poder-se-ia associar os resultados verificados com BRIDGES (1977). Este observou que uma redução no crescimento do fungo *Ceratocystis minor*, provocado por β -pineno um monoterpene, presente na resina de coníferas. Porém, CHRISTE *et al.* (2003), testaram resinas que as formigas *Formica paralugubris* coletaram de uma conífera (*Picea abies*) contra fungos isolados dos ninhos das próprias formigas e não encontraram atividade. Bem como NERG *et al.* (2004) não encontraram relação entre a resistência de grupos de *Pinus sylvestris* ao fungo *Conyophora puteana* com a quantidade de monoterpene das plantas. PRASHANTH KUMAR *et al.* (2006) não relatam atividade de extratos de várias partes de *Pinus gerardiana* contra *A. niger*. Em relação à própolis de *Scaptotrigona sp.* parte das resinas que a compõe vem de *Schinus terebenthifolius* (subitem 5.1). Assim poderia se relacionar à redução de crescimento de *A. niger* com esta planta. Contudo DEGÁSPARI; WASZCZYNSKJ e PRADO (2005) não observaram atividade do extrato de *Schinus terebenthifolius* contra este fungo.

5.3.2 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra os fungos isolados

Outro aspecto relevante da sanidade de uma colônia de insetos eussociais seria a preservação das reservas de alimentos, pois é razoável pensar que a deterioração de alimento é negativo para a colônia. Assim seria plausível verificar se os próprios alimentos puderiam demonstrar resistência aos microorganismos. Percebe-se que o alimento larval apresenta halo de inibição contra *Paecilomyces variotti* igual a anfotericina B. Em duas placas com valores que podem ser considerados como clinicamente como ativos (TABELA 2) (ESPINEL-INGROFF, 2007). Os demais halos do alimento larval em *Aspergillus niger*, *A. japonicus* + *A. niger* foram considerados menores que aos da anfotericina B. Porém, dado que estes não são testes clínicos pode-se inferir que em todos os halos são indicativos de atividade do alimento larval contra os fungos. A atividade do alimento larval possivelmente seja devido ao baixo pH do alimento larval.

5.3.3 Avaliação da atividade das resinas contra as bactérias isoladas

Pode-se indicar que a resina coletada, e contida na própolis, por *S. aff. depilis* na EELA contribui para a manutenção das condições sanitárias em seus ninhos. Isto porque nota-se atividade tanto do “pool” de própolis quanto do “pool” de resina contra *Tetragenococcus halophilus*. Houve inibição do “pool” de própolis a partir de 781,25µg/mL que é um valor abaixo da estimativa de concentração de própolis por volume de colméia, 3248,65µg/mL (subitem 6.3.1). Apesar de verificar inibição no ensaio do “pool” de resina a partir de 1562,5µg/mL, os poços de concentração 781,25µg/mL, mostraram que possuem valores densitométricos menores que os dos poços de controle de viabilidade (U de Mann-Whitney, $\alpha=0,049$). Isto indica redução de crescimento de *T. halophilus*. Também nota-se que o “pool” de própolis inibiu *Salmonella bongori* em todas as concentrações e o “pool” de resina inibiu até 781,25µg/mL. Verifica-se também que os valores densitométricos dos poços a 200µg/mL, do ensaio do “pool” de resina são menores que os valores do controle de viabilidade (teste t uma média, $\alpha<0,0001$) indicando redução no crescimento. Percebe-se que o antibiótico não inibiu *S. bongori* nem na concentração mais alta. Não se vê inibição em nenhuma concentração nos ensaios contra *Kluyvera cryocrescens*. Apesar disso, a ANOVA e teste de Tukey, indicaram que os valores densitométricos dos poços de todas as concentrações do ensaio de própolis são menores que aos valores do controle de viabilidade ($\alpha<0,001$). Também comparando-se, por ANOVA e Tukey os poços do ensaio de resina como os do controle verifica-se que apenas o poço a 200µg/mL é similar ao controle ($\alpha=0,076$). Um fato que de novo se destaca é que nos três ensaios o “pool” de própolis de *Scaptotrigona aff. depilis* teve atividade maior que o “pool” de resinas, como ocorreu contra *Staphylococcus aureus* (subitem 5.2.1). Principalmente, para os casos de *T. halophilus* (gram-positiva) e *S. bongori* (gram-negativa) a atividade concorda com KIZIL *et al.* (2002). Isto porque os autores encontraram atividade da resina de *Pinus brutia* contra bactérias gram-negativas e positivas. Há, ainda, a indicação que a resina utilizada por *S. aff. depilis* tenha como uma das fontes *Pinus sp.*. O fato das bactérias terem sido isoladas de cerume poderia indicar que a atividade da resina é bacteriostática.

Observa-se que houve crescimento bacteriano em todas as concentrações do ensaio do “pool” de resina de *Scaptotrigona sp.* Então, os valores densitométricos

dos poços a 200µg/mL, 781,25µg/mL e 1562,5 µg/mL em todas as placas foram comparados com os valores dos poços de seus respectivos controles de viabilidade, através do teste de Kruskal-Wallis. Nesta comparação considerou-se estas concentrações, pois estas representariam presumivelmente as quantidades de resina abaixo ou similares das própolis de *Scaptotrigona sp* (teste t uma média para concentração 1562,5 µg/mL, $\alpha=0,095$) - subitem 5.3.1. Em todos os casos foi indicado que os poços de todas as placas foram semelhantes aos poços do controle de viabilidade ($\alpha>0,05$). Isto é indicativo de que a resina coletada por *Scaptotrigona sp*. não contribui na manutenção da sanidade do ninho. A resina pode não ser ativa por se expressar semelhante às própolis de *A. mellifera* que tendem a não serem ativas contra bactérias gram-negativas SEIDEL *et al.* (2008), já que todas as bactérias testadas eram enterobacteriáceas. É possível, ainda aventar que como as bactérias foram isoladas de cerume (que possui resinas) estas bactérias já seriam resistentes as resinas coletadas por *Scaptotrigona sp*. em Barra do Corda. A indicação que parte da resina coletada vem de *Schinus terebenthifolius*, não esclarece a previsão de atividade contra gram-negativas, já que existem relatos de atividade desta planta contra *E.coli* (gram-negativa) (MARTINEZ *et al.* ,1996). Bem como existe relato de falta de atividade (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKJ e PRADO, 2005).

5.3.4 Obtenção de informações adicionais: avaliação da atividade do alimento larval, mel e pólen contra as bactérias isoladas

As médias dos halos de inibição de alimento larval e pólen de *Scaptotrigona aff. depilis* foram menores que as médias dos halos de gentamicina. Apesar disto é possível considerar que houve atividade relevante para a sanidade da colônia, haja vista que CRISTHE *et al.* (2003) consideram como relevantes halos de 3,2mm a 5,6mm obtidos de fragmentos de resina em ninhos de *Formica paralugubris*. Um adendo a ser feito é que em relação aos halos de gentamicina em *Salmonella* e *Shigella* devem ser desconsiderados, pois apesar da aparência elas são resistentes a gentamicina e a outros amiloglicosídeos (CLSI/NCCLS, 2005). A inibição demonstrada pelo alimento larval possivelmente é dada pela sua acidez. Já o pólen produziria os halos devido à ação de metabólitos de bactérias que acabam por

dominar a microbiota do pólen ao final do processo de fermentação, como ocorre com o pólen de *Melipona quadrifascita* (MACHADO, 1973),

Os halos de inibição de alimento larval e mel de *Scaptotrigona sp.* também foram considerados menores que de gentamicina. Porém, novamente seriam relevantes na dinâmica da salubridade dos ninhos sendo maiores que os valores obtidos por CRISTHE *et al.* (2003). Mais um adendo a se fazer é que o antibiótico apenas é um parâmetro para avaliar o nível resistência das bactérias isoladas e servir de referência para a capacidade antibacteriana dos elementos estudados. GRAJALES-CONESA *et al.* (2003) relatam a atividade antibacteriana de mel de *Scaptotrigona mexicana* contra *Staphylococcus aureus*. Devido aos procedimentos utilizados no trabalho, os autores indicam que a atividade não ocorre devido ao pH baixo ou osmolaridade, aventando que a atividade seja dada pela origem floral.

5.3.5 Considerações gerais

Crê-se que a constância da atividade antimicrobiana de um elemento seria um fator a se considerar quando da indicação do nível de participação deste elemento na manutenção das condições sanitárias de um ninho de insetos eussociais. Enquanto as resinas coletadas por *S. aff. depilis* reduziram o crescimento de todos os microorganismos, as resinas coletadas por *Scaptotrigona sp.* reduziram apenas o crescimento de fungo. A contaminação do controle de esterilidade da própolis, tanto nos ensaios contra fungos quanto no ensaio contra bactérias poderia indicar uma tendência de baixa atividade antimicrobiana por parte da própolis de *Scaptotrigona sp.*. Sendo que as condições de coleta e armazenamento foram iguais para as amostras de *Scaptotrigona aff. depilis* e *Scaptotrigona sp.*. Isto ocorreria plausivelmente por causa da origem vegetal variável das resinas (SAWAYA *et al.*, 2009). Ou talvez por variações populacionais na composição das resinas como ocorre com *Hymenaea* (LANGENHEIM, FOSTER e MCGINLEY, 1980). E isto poderia ser responsável por sua atividade antimicrobiana variável como registrado para *Schinus terebenthifolius* (MARTINEZ *et al.*, 1996; DEGASPARI; WASZCZYNSKJ e PRADO, 2005). Destaca-se a atividade das resinas de coletadas por *Scaptotrigona aff. depilis* que são efetivas até contra bactérias gram-negativas e que podem causar fermentação do mel, o que inviabilizaria o

consumo do mel pelas próprias abelhas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Esta atividade na colônia de *Scaptotrigona aff. depilis*, pode ser mais ou menos constante. Haja vista que, *Pinus sp* que parece ser uma das fontes de coleta e disponibiliza freqüentemente resina. Sendo que esta pode ter potencial antibacteriano (KIZIL *et al.* (2002). O mel que apresentou também alguma atividade. Mas como as resinas, o mel pode apresentar variações na atividade de acordo com sua origem geográfica (diferentes fitofisionomias), como observado para o mel de *Tetragonisca angustula* na Costa Rica (DEMERA e ANGERT, 2004). Se espera que o pólen fermentado apresentasse mais atividade devido ao seu pH, em torno de 5,0 como visto para *Melipona quadrifasciata* (MACHADO, 1973). Dentre os elementos analisados todos possivelmente podem contribuir na sanidade na manutenção da sanidade controlando o crescimento de microorganismos. Mas sua apenas o alimento larval apresentou constância na atividade a despeito do tipo de abelha e diferenças geográficas. Isto indicaria que o alimento larval tem capacidade de resistir a ação de microorganismos, o que garantiria suas condições de consumo para as larvas. Em abelhas solitárias o alimento deteriorado por microorganismos pode levar as larvas à morte (BATRA; BATRA e BOHART, 1973).

5.4 MANIPULAÇÃO E MUDANÇA DO PERFIL QUÍMICO DAS RESINAS

Os perfis cromatográficos de resina de jatobá (*Hymenaea courbaril*) (fig.14) e da própolis de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (fig.20), mostraram-se diferentes. Os espectros da resina indicaram três diterpenos e um sesquiterpenos (fig.15, fig.16, fig.17 e fig.18). Como a resina utilizada vinha do tronco/raiz os resultados concordam com as indicações que as resinas do tronco bem como das vagens são ricas em diterpenos (LANGENHEIM *et al.* 1978, LANGENHEIM, 2003). LANGENHEIM e LEE (1974) já haviam demonstrado que as resinas de jatobá possuem cariofileno, cujo óxido foi o sesquiterpeno caracterizado nos resultados. Já os espectros indicam da própolis de *S. aff. depilis* apontam apenas para triterpenos (fig.21, fig.22)). Porém as resinas de jatobá e outras árvores do gênero *Hymenaea* são conhecidas por serem ricas em diterpenos (CUNNINGHAM, MARTIN e LANGENHEIM, 1973; LANGENHEIM, 2003). Pressupõe-se que a única fonte de resina disponível para as abelhas foram as resinas de jatobá. Sendo que inclusive observou-se operárias manipulando a resina no tubo de entrada onde esta era oferecida. Uma vez que operárias de *Plebeia emerina* estão com, principalmente, as salivares glândulas ativadas no período quando desenvolvem tarefa de manipulação dos depósitos de resina que se mantém viscosos (SANTOS, 2007). A aqui se faz a proposição de manter as averiguações para verificar se os resultados dos espectros são artefatos. Ou se ocorreu uma mudança na composição química. Esta última hipótese parece ser a menos parcimoniosa, pois, acredita-se que é mais simples as abelhas coletarem a resina, misturem à cera e a depositarem simplesmente. Nota-se, porém que CRUZ LANDIM (1967) indica que as glândulas salivares de meliponíneos produzem uma substância que amolece cera. Ela hipotetiza, que isto é similar ao que ocorre com *A. mellifera*, que produz secreções para manipular a cera. Porém, entende-se que possa ter havido problemas durante a solubilização das amostras. Pois a amostra de resina de jatobá solubilizou bem em hexano, o que não ocorreu com a própolis. Por isso optou-se pelo clorofórmio, mesmo assim continuaram as dificuldades. Acabou por se injetar apenas um lavado da própolis. O que pode não ter levado todos os constituintes nela contidos. Bem como não se pode ter certeza que as abelhas também se utilizaram do cerume que estava no invólucro que teve que ser mantido. Bem como os se os fragmentos de cera,

colocados para vedar o pólen fermentado introduzido na colméia, de *A. mellifera* contribuíram com algum artefato (triterpeno)..

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos conclui-se que:

- Alguma conífera é uma das fontes de resina para para *Scaptotrigona* aff. *depilis* instalada na Estação Experimental de Luiz Antônio, SP. Possivelmente a fonte é *Pinus* sp. uma vez que as colméias são cercadas por plantações desta árvore. Prováveis componentes das resinas coletadas por *S. aff. depilis* são os ácidos E/Z comúnicos, agatálico e agático. Já para *Scaptotrigona* sp. instalada em Barra do Corda, MA, uma das fontes foi *Schinus terebenthifolius*. Sendo que dentre os componentes provavelmente haja terpenos com grupos ácidos.

- As resinas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *Scaptotrigona* sp. não apresentaram atividade relevante contra microorganismos de interesse clínico. Apesar disso é interessante que existam mais investigações a respeito da própolis dos meliponíneos, pois existem muitas espécies dessas abelhas na região Neotropical que podem estar coletando em diversas espécies de plantas produtoras de resina.

- As resinas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* indicou ser mais efetiva para manutenção da sanidade do ninho, reduzindo o crescimento todos os microorganismos isolados dos ninhos destas abelhas. *Scaptotrigona* sp. reduziu o crescimento apenas de fungos encontrados em seus ninhos. Ressalta-se também a atividade do alimento larval que independente de espécie de abelha e local quase sempre apresentou atividade. Isto pode indicar sua capacidade de manter-se em condições de consumo para as larvas, contribuindo com a sanidade do ninho.

- Constataram-se diferenças na composição química da resina oferecida à *Scaptotrigona* aff. *depilis* e na composição da própolis, a qual se presume foi elaborada com a mesma resina oferecida. Haja vista várias lacunas são necessárias maiores averiguações antes de se apontar que *S. aff. depilis* modifique a composição química das resinas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETO, J.G.; FREITAS, C.D.A. **Manual de meliponicultura mexicana**. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán. 2005. 46p

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Curitiba 2005. 186f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

AGRAWAI, A.A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in Ecology and Evolution**. v.22 n.2. p.103-109. 2007.

ALONSO, J.; ARILLO, A.; BARRÓN, E.; CORRAL, J. C.; GRIMALT, J.; LÓPEZ, J.F.; LÓPEZ, R.; MARTÍNEZ-DELCLÒS, X.; ORTUÑO, V.; PEÑALVER, E.; TRINCÃO, P. R. A new fossil resin with biological inclusions in lower cretaceous deposits from Álava (Northern Spain, Basque-Cantabrian Basin). **Journal of Paleontology**. v. 74, n.1, p. 158-178. 2000.

ARMBRUST, E. A. Resource use and nesting behavior of *Megachile prosopidis* and *M. chilopsidis* with notes on *M. discorhina* (Hymenoptera: Megachilidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 77, n.2, p. 89-98. 2004.

ARMBRUSTER, W. S. The role of Resin in angiosperm pollination: Ecological and Chemical Considerations. **American Journal of Botany**. v. 71, n. 8, p. 1149-1160. 1984.

ARRHENIUS, S.P.; LANGENHEIM, J.H. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus *Pestalotia subcuticularis*. **Biological Systematics and Ecology**. v.11, n.4, p.361-366. 1983.

ARRHENIUS, S.P.; LANGENHEIM, J.H. The association of *Pestalotia* species with members of the leguminous tree genera *Hymenaea* and *Copaifera* in the Neotropics. **Mycologia**. v.78, n.4, p.673-676. 1986.

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

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S., MARCUCCI, M.C., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**. v.70, n.2, p.190-193. 1999.

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.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Própolis: advances in

chemistry and plant origin. **Apidologie**. v.31, p.3-15. 2000.

BANKOVA, V.S.; de CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. v. 31, p .3–15. 2000.

BARROS, M.B. **Apicultura**. Série monografias, n.3. Brasil: Instituto de Zootecnia. 1962. 257p.

BATRA, S.W.T; BOHART, G.E. Alkali bees: Response of adults to pathogenic fungi in brood cells. **Science**. v. 165, n.3893, p. 607-608. 1969.

BEGUN, F.; SAMAJPATI, N. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. **Naturwissenschaften**.v.87, p.275-277. 2000.

BIJLSMA, L; BRUJIN, L.L.M.; MARTENS, E.P.; SOMMEIJER, M.J. Water content of stingless bee honeys (Apidae, Meliponini): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**. v.37, v.4, p.480-486. 2006.

BREYER, E.U. Própolis – propole – propolina. In: Congresso Brasileiro de Apiculatura, 5, e Congresso Latino-Ibero-Americano de Apicultura, 3, 1980. **Anais...Viçosa: Confederação Brasileira de Apicultura**. p. 158-166.

BRIDGES, J.R. Effects of terpenoid compounds on growth of symbiotic fungi associated with the southern pine beetle. **Phytopathology**. v. 77, p. 83-85.1987.

CAMARGO, J.M.F. Ninhos e biologia de algumas espécies de meliponídeos (Hymenoptera: Apidae) da região de Porto Velho. Território de Rondônia, Brasil. **Revista de Biologia Tropical**. v.16, n.2, p. 207-239, 1970.

CAMARGO, J.M.F.; POSEY, D. A. O Conhecimento dos Kayapó sobre as sabelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera). **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia**. v.6, n.1, p.17-42. 1990.

CAMARGO, J.M.F; GRIMALDI, D.A.; PEDRO, S.R.M. The extinct fauna of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Dominican Amber: Two new species and redescription of the male of *Proplebeia*. **American Museum Novitates**. n. 3293, 24p. 2000.

CAMARGO, J.M.F; MOURE, J.S. Notas sobre os Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) colecionados por Felippo Silvestri na Bacia do Rio Prata. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.32, n.2, p.293. 1988.

CAMARGO, JMF; GRIMALDI, PEDRO, The extinct fauna of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Dominican amber: two new species and descriptions of the male *Proplebeia dominicana* (Willie and Chandler). **American Museum Novitates**. v. 3293: 1-24.

CANE, J. H. Nesting resins obtained from pollen host by an oligolectic bee,

Trachusa larreae (Cockerell) (Hymenoptera: Megachilidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 69, p. 99-102. 1996.

CARDOSO, A.S.; PONTES, F.C.; de SOUZA, G.G.B. Um espectrômetro de massas de tempo-de-vôo para o estudo da ionização de amostras gasosas por elétrons rápidos (0,5 – 1,0 KEV). **Química Nova**. v.24, n.3, p.315-319. 2001

CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; PAOLI, A.A.S. Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica**. v.22, n.1. 1999.

CHENG, A.X.; LOU, Y.G.; MAO, Y.B.; LU, S.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Planta terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**. v.49, n.2, p. 179-186. 2007.

CHRISTE, P.; OPPLIGER, A.; BANCALÀ, F.; CASTELLA, G.; CHAPUISAT, M. Evidence for collective medication in ants. **Ecology Letters**. v. 6, p. 19-33 2003.

CLSI/NCCLS **Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement**. Document M100-S15 Wayne Pennsylvania, 2005.

COLEY, P.D; BARONE, J.A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27,305-335.1996.

CONOLLY, J.D.; HILL, R.A. **Dictionary of terpenoides**. London : Chapman and Hall. 1991. 2156p.

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

COSTA, M.A.; DEL LAMA, M.A.; MELO, G.A.R.; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16s rDNA sequences. **Apidologie**. v.34, p.73-84. 2003.

CREMER, S.; ARMITAGE, S.; SCHIMID-HEMPEL, P. Social Immunity. **Current Biology**. v. 17, p. 693-702. 2007.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**. 15: 177-290. 1967.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Resin Acids from two Amazonian Species of *Hymenaea*. **Phytochemistry**. v. 12, p. 633-635. 1973.

CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites.

Nature. v. 398, p.701-704. 1999.

DE SOUZA, J.P.B.; BUENO, P.CP; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; FURTADO, N.A.J.C., DE SOUZA, M.; BASTOS, J.K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **J. Sep. Sci.** v.30, 2656-2665. 2007.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi . **Ciênc. Agrotec.** v. 29, n3, p.617-622. 2005.

DEMERA, J.H.; ANGERT, E.A. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. **Apidologie**. v.36, p.411-417. 2004.

DICKINSON, W.C. **Integrative Plant Anatomy**, San Diego : Harcourt/Academic. 2000. 533 p.

DUDAREVA, N.; PICHERSKI, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**. v.135, v.4, p.1893-1902. 2004.

DUNCAN, E.J.; HART, A.G. Does sanitation facilitate sociality? **Animal Behaviour**. v.77, e1-e5. 2009

DUSSOURD, D.E.; DENNO, R.F. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behaviour and secretory canal architecture. **Ecology**. v.72, n.4, p.1383-1396.1991.

EISNER, T.; JOHNESSEE, J.S.; CARREL, J. Defensive use by an insect of a plant resin. **Science**. v. 184, p. 996-999. 1974.

ELLIS, A.G.; MIDGLEY, J.J. A new plant-animal mutualism involving a plant with sticky leaves and a resident hemipteran insect. **Oecologia**. v.106, n. 4. 478-481. 1996.

ELLIS, A.G.; MIDGLEY, J.J. A plant-animal mutualism involving a plant with stick leaves and a resident hemipteran insect. **Oecologia**. v.106, n.4, p.478-482. 1995.

ESPINEL-INGROFF, A; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N./ ELLIS, D. PFALLER, M.A.; MESSER, S.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; GIBBS, D.L.; WANG, A. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.6, n.6, p. 1811-1820. 2007.

FANG, J.M; LANG, C.I.; CHEN, W.L.; CHENG, Y.S. Diterpenoid acids from

the leaves of armand pine. **Phytochemistry**. v. 30, n.8, p. 2793-2795. 1991.

FARRÉ, R.; FRASQUET, I; SANCHEZ, A. El própolis y la salud. **Ars Pharmaceutica**. v.45, n.1, p.21-43. 2004.

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

FRANICH, R.A.; GADGIL, P.D. Fungistatic effects of *Pinus radiate* needle epicuticular fatty nd resin acids on *Dothistroma pini*. **Physiological Plant Pathology**. V. 23, p. 183-193. 1983.

FREITAS, G. S. **Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera: Apidae) em área urbana, Campus da USP, Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias. **Atividade antibacteriana de extrato de própolis**. POP-MET Número DPD-DCF-215-001. 2008a.

FUNED – Fundação Ezequiel Dias. **Atividade antimicótica de extrato de própolis**. POP-MET Número DPD-DCF-215-001. 2008b.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, KÜHN, I.; McKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. v. 50, n. 1, p. 63-73. 2002.

GARY, N.E. Actividades y comportamiento de la abeja melifera. In: DADANT E HIJOS (org.). **La colmena y la abeja melifera**. Montevideo: Hemisferio Sur. 1975. pp. 248-345.

GONÇALVES-ALVIM, S. de J. Resin-collecting bees (Apidae) on *Clusia palmicida* (Clusiaceae) in a riparian forest in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**. v. 17, p. 149-153. 2001.

GRAJALES-CONESA, J.; RINCÓN-RABANALES, M.; GUZMÁN-DIAZ, M.; VANDAME, R. Propiedades físicas, químicas y antibacterianas de mieles de *Scaptotrigona mexicana* de la región Soconusco, Chiapas, México. In: Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón 3, 2003, **Anais...**Tapachula.

GRIGARICK, A.A.; STANGE, L.A. The pollen-collecting bees of the Anthidiini of California (Hymenoptera: Megachilidae). **Bulletin of the California Insect Survey**. v.9, p. 1-114. 1968.

GUARIGUATA, M.R.; GILBERT, S.G. Interspecific variation in rates of trunk wound closure in a Panamanian lowland forest. **Biotropica**. v 28, n.1, p. 23-29. 1996.

GUTIÉRREZ, F.; MASIÁ, M.; RAMOS, J.M.; ELÍA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CUECA-ESTRELLA, M. **Clinical Infectious Diseases**. v.40, n.11, p. 1706-1707. 2005.

GUZZO, P.; CARNEIRO, R.M.A (orgs). **Vamos arborizar Ribeirão Preto**. Ribeirão: Secretaria Municipal do Meio Ambiente. 2008. 40p.

HADAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, P.A.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. M. **Microbiology**.v. 153, p. 1677-1692. 2007.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. 2 ed. London: Chapman and Hall. 1984.

HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**. An update and translation of the German third edition. Elsevier: Amsterdam. 2005. 630p.

HILL, D.S. **The economic importance of insects**. 1ed. London; New York : Chapman & Hall. 1997. 293-294pp.

Hölldobler, B.; Wilson, E.O. **The ants**. Harvard University Press: Cambridge, 732p. 1990.

HONG, E.J.; NA, K.J.; CHOI, I.G.; CHOI, K.C.; JEUNG, E.B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Biol. Pham. Bull.** v. 27, v.6. p.863-866. 2004.

HOWARD, J.J. Observations on resin collecting by six interacting species of stingless bees (*Apia*: Meliponinae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 58, n.2, p. 337-345. 1985.

HRAZDINA, G.; JENSEN, R.A. Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of pheypropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.237 p.88-100. 1984.

HUNZIKER, J.H.; PALACIOS, R.A.; de VALES, A.G.; POGGIO, L. Species disjunctions in *Larrea*: Evidence from morphology, cytogenetics, phenolic compounds and seed albumins. **Annals OF THE Missouri Botanical Garden**. v.59, n.2, p.224-233. 1972.

IBGE **Mapas interativos – Banco de dados geodésicos**. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 01 de abr. 2006a. Disponível em <www.ibge.gov.br>

IBGE **Mapas interativos - Mapas de biomas**. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 01 de abr. 2006b. Disponível em <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2004/default.shtm>

JANZEN, D.H. Behavior of *Hymenea courbaril* when its predispersal seed is

absent predator. **Science**. v. 189, n.4197, p 145-147. 1975.

JUSTÉ, A.; LIEVENS, B. ; KLINGEBERG, M.; MICHIELS, C.W.; MARSH, T.L.; WILLEMS, K.A. Predominance of *Tetragenococcus halophilus* as the cause of sugar thick juice degradation. **Food Microbiology**. v. 25, p413-421. 2008.

KEBARLE, P.; HO, Y. On the mechanism of electrospray mass spectrometry. In COLE, R. B. (org). **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamental instrumentation, and applications**. New York:John Wiley & Sons. 1997. 577p.

KEELING, C.I.; BOHLMANN, J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**. v.170, n.4, p.657-675. 2006.

KERR, E.W.; SAKAGAMI, S.F.; ZUCCHI, R.; PORTUGAL-ARAÚJO, V.; CAMARGO, J.M.F. Observações sobre a arquitetura dos ninhos e comportamento de algumas espécies de abelhas sem ferrão das vizinhanças de Manaus, Amazonas (Hymenoptera, Apoidea). **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica**. v.5 (Zoologia), p.255-309. 1967.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Paracatu: Fundação Acangaú. 144 p. 1996.

KOJIMA, J. Meconium egestion by larvae of *Ropalidia* Guérin (Hymenoptera: Vespidae) without adult aid, with a note on the evolution of meconium extraction behaviour in the tribe Ropalidiini. **Australian Journal of Entomology**. v.35, p. 73-75. 1996.

KRELL, R. Value added products from beekeeping. **FAO Agricultural Services Bulletin**. n. 124. 1996. Website. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076E00.htm#con>> . Acesso em: 14 mai. 2009.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**. v.64, p. 235-240. 1999.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**. V.64, p. 235-240. 1999.

LANGENHEIM, J. H. **Plant Resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany**. Timber Press: Portland – Cambridge. 2003. 586p.

LANGENHEIM, J.H.; FOSTER, C.E.; LINCOLN, D.E.; STUBBLEBINE, W.H.

Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.6, p. 299-313. 1978.

LANGENHEIM, J.H.; FOSTER, C.E.; MCGINGLEY, B. Inhibitory effects of different quantitative compositions of *Hymenaea* leaf resins on a generalist herbivore *Spodoptera exigua*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.6, p.299-313. 1980.

LANGENHEIM, J.H.; LEE, Y. Reinstatement of the genus *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Africa. **Brittonia**. v.26, n.1, p.3-21. 1974.

LANGENHEIM, J.H.; LINCOLN, D.E.; STUBBLEBINE, W.H.; GABRIELLI, A.C. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioidea: Leguminosae) **American Journal of Botany**. v. 69 n. 4 p.595- 607. 1982.

LANGENHEIM, J. H. Amber: a botanical inquiry. **Science**. v.163, p. 1157-1168. 1969.

LANGENHEIM, J. H. Amber: a botanical inquiry. **Science**. v.163, p. 1157-1168. 1969.

LEE, S.K.; LEE, H.J.; MIN, H.Y.; PARK, E.J.; LEE, K.M.; AHN, Y.H.; CHO, Y.J.; PYEE, J.H. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. **Fitoterapia**. v. 76, p.258-260. 2005.

LEMKIN, P.F.; THORNWALL, G. C.; EVANS, J. Comparing 2-D Electrophoretic Gels Across Internet Databases: An Open Source Application. In: WALKER, J.M. **The Proteomics Protocols Handbook**. Human Press. P. 279-305. 2005.

LEVIN, D.A. Plant phenolics: an ecological perspective. **The American Naturalist**. v. 105, n.942, p.157-181.1971.

LEVIN, D.A. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.7, 121-139.1976.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M.; CROTEAU, R. Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. **Plant Physiology**. v.96, n.1, p. 44-49. 1991.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Paraná, Universidade Estadual do Paraná e Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas.1968. 350p.

MACHADO, J. O. **Isolamento e caracterização de bactérias aeróbicas do pólen, alimento de larvas e alimento contido no papo e esôfago de *Melipona quadrifasciata anthidioides***. Franca 1973. 97f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Franca.

MARTÍNEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, n. 3, p. 171-174. 1996.

MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology. *Australian Journal of Botany*. v.44, n.6, p.613-634. 1996.

McGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Plant Cell**. v.7, p.1015-1026. 1995

McGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**. v.7, p.1015-1026. 1995.

MEGIOLARO, R.; BRANCHI, I.; SOUTO, A.; SANTOS, C.; BLOCHTEIN, B. Análise química de própolis viscosa e de revestimento em colônias de *Plebeia emerina* (Hymenoptera, Meliponina). In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 26, 2006. **Anais...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina. p. 51.

MELO, G.A.R.; GONÇALVES, R.B. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.22, n.1, p.81-83. 2005.

MICHENER, C.D. Comparative external morphology, phylogeny and a classification of the bees, **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.82, p. 108-113. 1944.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. 2ed . Baltimore: Johns Hopkins University. 2007. 951p.

MICHENER, C.D: **The social behavior of the bees - a comparative study**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University, 1974. 404p.

MICHENER, C.D: **The social behavior of the bees - a comparative study**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University, 1974. 404p.

MIDI – Microbial Identification Inc. **Similarity Index Calculation for the Sherlock MIS** 05 de jan de 2009. Disponível em: [http://: www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)

MMA **Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – Resoluções**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente Planejamento, 02 de jan. 2007 Disponível em : <http://www.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=85&idC>

MOURE, J.S. Abelhas de Solobra (Hym. Apoidea). **Papéis Avulsos, São Paulo**. v.2, n21, p.291-321. 1942.

MOURE, J.S. Notas sobre Meliponinae (Hymenopt.- Apoidea). **Dusenía**. v.2, fascículo 1, p.24-70. 1951.

MOURE, J.S. Preliminary supra-specific classification of the Old World

meliponine bees. **Studia Entomologica**.v.4, n.1-4), p.181-242.1961.

MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia: Curitiba. pp. 475-492. 2007. Apinae.

NCCLS **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standart – sixth edition.** Document M7-A6 Wayne, Pennsylvania. 2003.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação de sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos; norma aprovada** Documento do NCCLS. Wayne, Pennsylvania. 2002.

NERG, A.-M; HEIJARI, J.; NOLDT, U; VIITANEN, H; VUORINEN, M.; KAINULAINEN, P.; HOLOPAINEN, J.K. Significance of wood terpenoids in the resistance of scots pine provenances against the old house borer, *Hylotrupes bajulus*, and brown-rot fungus, *Coniophora puteana*. **Journal of Chemical Ecology**. v.30, n.1, p.125-141. 2004.

NEWMAN, J.D.; CHAPPELL, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmatic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v.34, p.95-106.

NHUNG, P.H.; OHKUSU, K.; MISHIMA, N.; NODA, M.; SHAH, M.M.; SUN, X.; HAYASHI, M.; EZAKI, TAKAYUKI. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* base don dnaJ sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.58, p. 153-161. 2007.

NOGUEIRA-NETO, P. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Chácaras e Quintais. 1953. 280p.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Nogueirapis, 1997. 426p.

NORIN, T. Some aspects of the chemistry of the order Pinales. **Phytochemistry**. v.11, p.1231-1242. 1972.

OBANA, H.; KUMEDA, Y. NISHIMUNE, T.; USAMI, Y. Direct detection using the *Drosophila* dna-repair rest and isolation of a dna-damaging mycotoxin, 5,6-dihydropenicillic acid, in fungal culture. **Fd Chem. Toxic.** v.32, n.1, p. 33-41, 1994.

OGURA, K.; KOYAMA, T. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. **Chemical Reviews**. v.98, n.4, p.1263-1276. 1998.

PATERSON, R.R.M.; SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M. **Journal of Invertebrate Pathology**. n. 50, p.124-133. 1987.

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

PHILLIPS, M. A.; CROTEAU, R. B. Resin-based defenses en conifers. **Trends in Plant Science**. v.4, n.5, p.184-190. 1999.

PIRES, V. c.; DRUMMOND, M.S.; LACERDA, L.M. Perfil anual da produtividade de *Melipona fasciculata* Smith 1864 (Apidae Meliponina), na região nordeste do Maranhão, Brasil. In: Encontro sobre abelhas, 7, 2006. **Anais...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

POINAR Jr., G. O. Fossil evidence of resin utilization by insects. **Biotropica**. v. 24, n. 3, p. 466-468. 1992.

PRASHANTH KUMAR, V.; CHAUHAN, N.S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.107, p.182-188. 2006.

RHOADES, D. F. Integrative antiherbivore, antidesiccante and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. **Biochemical Systematics and Ecology**. vol. 5, p.281-290. 1977.

RHOADES, D.F. Integrated antiherbivore, antidesiccant and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.6, p.281-290. 1977.

RIBEIRO, M.C.M. Estudo químico e biológico da própolis brasileiras. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 10, 1994. **Anais...**Pousada do Rio Quente: Confederação Brasileira de Apicultura. p. 246-249.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1-2, p. 80-84. 2005.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Products Reports**. v.16, p.565-574. 1999.

ROMERO, S.M.; COMERIO, R.M.; LARUMBE, G.; RITIENI, A.; VAAMONDE, G.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**. v. 104, p. 43-49. 2005.

ROSENGAUS, B. R.; MAXIMEN, A. B.; CONTES, L. E.; TRANIELLO, J. F. A.

Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v.44, p.125-134. 1998.

ROSENGAUS, B. R.; MAXIMEN, A. B.; CONTES, L. E.; TRANIELLO, J. F. A. Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v.44, p.125-134. 1998.

ROUBIK, D. W. Singless bee nesting biology. **Apidologie**. v.37, p.124-143. 2006.

ROUBIK, D.W. **Ecology and natural history of tropical bees**. First published. Cambridge: Cambridge University. 1989. 504p.

ROUBIK, D.W. Nest and colony characteristics of stingless bees from French Guiana (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 52, n.3, p. 443-470, jul. 1979.

ROUBIK, D.W. Nest and colony characteristics of stingless bees from French Guiana (Hymenoptera:Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. v. 52, n.3, p. 443-470, jul. 1979.

ROUBIK, D.W.; MICHENER, C.D. The seasonal cycle and nests of *Epicharis zonata*, a bee whose cells are below the wet-season water table (Hymenoptera: Anthophoridae). **Biotropica**. v. 12, p 56-60. 1980.

ROUBIK, D.W.; SEGURA, J.A.;CAMARGO, J.M.F. New stingless bee genus endemic to Central American cloudforests: phylogenetic and biogeographic implications (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Systematic Entomology**. v.22, p.67-80. 1997.

SAKAKIBARA, M.; DIFEO Jr., D.; NAKATANI, N.; TIMMERMANN, B.; MABRY, T.J. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*.

SAKAKIBARA, M.; TIMMERMANN, B.N.; NAKATANI, N.; WALDRUM, H. New 8-hydroxyflavonols from *Larrea tridentata*. **Phytochemistry**. v.14, n.3, pp. 849-851. 1975.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth Publishing Company. 1992. 682p

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian própolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **eCAM**. p. 1-8. 2007

SANTOS, C.G. **Aspectos comportamentais e morfológicos de *Plebeia emerina* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) relacioandos a própolis**. Porto Alegre, 2007. 59f. Tese (Doutorado) – Faculdade de

Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. Campinas, 2006, 87f. Tese (Doutorado em Ciências). – Instituto de Química, UNICAMP. Campinas.

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

SAWAYA, A.C.H.F **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. Campinas 2006. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de Campinas.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C.; de OLIVEIRA RODRIGUES, R.F.; EBERLIN, M.N. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**. v.37, p.399-407. 2006.

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

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

SCHWARZ, H.F. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere : Lestrimelitta and the following subgenera of Trigona : Trigona, Paratrigona, Schwarziana, Parapartamona, Cephalotrigona, Oxytrigona, Scaura, and Mourella. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 90, p.1-546. 1948.

SCHWARZ, H.F. The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. **The American Museum of Natural History**. v.74, artigo 7, p.431-508. 1938

SCHWARZ, H.F. The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.74, p. 437-508. 1944

SCHWARZ, H.F. The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.74, artigo 7, p.437-508. 1939.

SCOTT, A.C.; ANDERSON, J.M.; ANDERSON, H.M. Evidence of plant–insect interactions in the Upper Triassic Molteno Formation of South Africa. **Journal of the Geological Society**. v. 161, n.3, p.401-410. 2004.

SEIDEL, V.; PEYFOON, E.; WATSON, D.G.; FEARNLEY, J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. **Phytopherapy Research**. v.22, p. 1256-1263. 2008.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras - sistemática e identificação**. 1 ed. Belo Horizonte : MMA - Fundação Araucária. 2002. 253p.

SIMMONS, N.A.; WILLIAMS, J.D. Use of a solid reagent in the triphenyl tetrazolium chloride test for bacteriuria. **Journal of Clinical Pathology**.v.20, p.767. 1967.

SMITH, A. L. **Principles of microbiology**. Capítulo Enteric bacilli and vibrios 10 ed. Saint Louis: Times Mirror/Mosby. 1984. 527-550p.

SNYDER, M.A. Interactions between Abert's squirrel and ponderosa pine: The relationship between selective herbivory and host plant fitness. **The American Naturalist**. v.141, n.6, p.866-879. 1993.

SNYDER, M.A. Selective herbivory by Abert's squirrel mediated by chemical variability in ponderosa pine. **Ecology**. v.73, n.5, p.1730-1741.1992.

STURGEON, K. B.; MITTON, J.B. Biochemical diversity of ponderosa pine and predation by bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 79, n.4, p.1064-1068. 1986.

STURGEON, K.B. Monoterpene variation in ponderosa pine xylem resin related to western pine beetle predation. **Evolution**. v.33, p.803-814. 1979.

SUFFREDINI, I.B.; PACIÊNCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF BRAZILIAN PLANT EXTRACTS – clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, n.3, p.287-290, 2006.

SZEWCZAK, E.H.; GODOY, G.F.; CHOCIAI, J.G. Estudo comparativo entre a sensibiliade de *Staphylococcus aureus* à própolis e antibióticos. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 7, 1980. **Programa e resumos...**Salvador: Confederação Brasileira de Apicultura. p. 64-65.

THOMSON, W.W.; PLATT-ALOIA, K.; KOLLER, D. Ultrastructure and development of the trichomes of *Larrea* (Creosoto Bush). **Botanical Gazette**. v.140, n.3, p.249-260. 1979.

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

TORTORA, G.J. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Artes Médicas Sul. 2000.

827p.

TRAPP, S.; CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**. v.52, p.689-724. 2001.

UFSCAR **Caracterização ambiental de uma unidade de conservação. Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP. Projeto Jataí 1987-2000.** São Carlos: SEMA-SP. 2000.

VAN TOL FILHO, P. **Criação racional de abelhas**. 2ed. revista e ampliada, Criação e Lavoura nº14. São Paulo: Melhoramentos. 155p. 1952.

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. 2000.

VENTURIERI, G.C. Meliponicultura I: Criação de abelhas indígenas sem ferrão, caixa racional para criação. **Receituário Técnico, Embrapa Amazônia Oriental**. 2003.

VILLAS-BÔAS, J.K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade de mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**. São Paulo, n.82 p. 6-16, jul. 2005. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/msgdoce.htm>>. Acesso em: 07 de mai. 2009.

VOIGT, D.; GORB, S. An insect trap as habitat: cohesion-failure mechanism prevents adhesion of *Pameridae roridulae* bugs to the sticky surface of the plant *Roridula gorgonias*. **The Journal of Experimental Biology**. v.211, p.2647-2657. 2008.

WHEELER, W. M. Colonies of ants (*Lasius neoniger* Emery) infested with *Laboulbenia formicarum* Thaxter. **Psyche**. v.17, n.3, p. 83-85. 1910.

WILLIE, A. Biology of the stingless bees. **Annual Review of Entomology**. v.28, p.41-64. 1983.

WILLIE, A.; MICHENER, C.D. The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae). **Revista de Biologia Tropical**. v. 21, suplemento 1, p. 9-271. 1973.

WILLIE, A.; MICHENER, C.D. The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae). **Revista de Biologia Tropical**. v. 21, suplemento 1, p. 9-271. 1973.

WINKEL-SHIRLEY, B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. **Physiologia Plantarum**. v. 107 p. 142-149. 1999.

WITHERELL, P.C. Otros productos de la colmena. In: DADANT E HIJOS (org.). **La colmena y la abeja melífera**. Montevideo: Hemisferio Sur. 1975.

pp. 685-715.

WOLLENWEBER, E.; DIETZ, V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycone in plants. **Phytochemistry**. v.20 p.869-932. 1981.

YAMAMOTO, D.Y. **Análise e quantificação do mel de *Scaptotrigona sp.* (Hymenoptera, Apidae, Apinae) no município de Luiz Antônio, São Paulo, Brasil.** Ribeirão Preto 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo

ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S. F.; CAMARGO, J M F . Biological observations on a neotropical parassocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hym., Apidae). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido University** Ser VI Zool, Japão, v. 17, n. 2, p. 271-380, 1969.

APÊNDICE 1- METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO PRÉVIA DE ATIVIDADE ANTIBACTERINA E ANTIFÚNGICA DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona* BASEADO EM FUNED (2008a ;2008b)

A verificação de atividade antibacteriana, do “pool” de própolis de *Scaptotrigona sp.* e *S. aff. depilis* foi através de ensaio de difusão em placa realizado em triplicata. Utilizou-se culturas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) que foram cultivadas em estufa por 24 horas a 37°C em tubo de ensaio com caldo Mueller-Hinton (Difco). A partir destas culturas foram preparadas suspensões bacterianas padrão. Para tanto, adicionou-se as bactérias cultivadas em tubos com 3000µL de salina 0,85% até que as suspensões atingissem turbidez igual à de uma solução de BaSO₄, equivalente a escala Mc Farland de 0,5, que corresponde a 10⁸ UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) de bactérias. Em seguida, diluiu-se dez vezes as suspensões padrões adicionando 300µL destas em 2700µL de salina 0,85%. Estas novas suspensões foram novamente diluídas 1:10 da mesma forma, obtendo-se as suspensões de trabalho com 10⁶ UFC/mL. Então, foi adicionado 100µL das suspensões de trabalho, de *S. aureus*, em cada uma de três placas de Petri de 15cm com 20mL de ágar Mueller-Hinton (Acumedia). Procedeu-se da mesma forma com *E. coli*, em outras três placas semelhantes. As suspensões de trabalho foram espalhadas pela superfície do meio em três direções diferentes com auxílio de suab até a eliminar o excesso de líquido. Logo após, foram feitos dois orifícios na superfície do ágar Mueller-Hinton em cada uma das placas. Para tanto, utilizando-se ponteiras de 200µL invertidas. Em cada placa, no interior de um orifício foi adicionado 40µL de solução etanólica (500mg/mL) do “pool” de resina de Barra do Corda e em outro o mesmo volume na mesma concentração, do “pool” da EELA. Como controle uma das placas recebeu um orifício extra no qual se adicionou 40µL de etanol (controle). Também como controle e parâmetro de comparação, uma placa com *E. coli* recebeu um disco de gentamicina 10µg (Sensifar, Cefar, Diagnóstica). Enquanto uma placa com *S. aureus* recebeu um disco de vancomicina 30µg (Sensifar, Cefar, Diagnóstica). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, e avaliadas após 24h através da mensuração do halo de inibição, com régua.

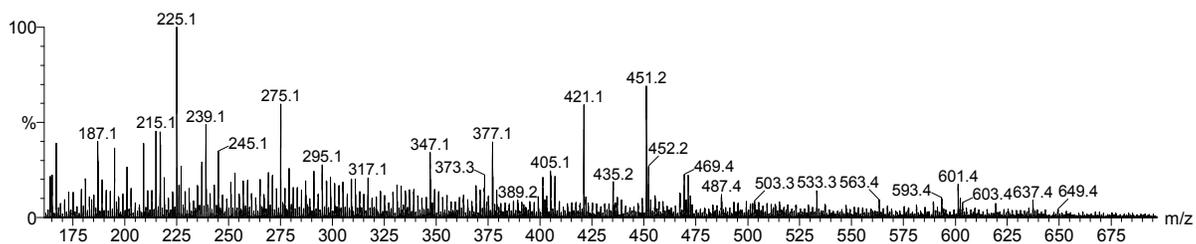
Para avaliar a atividade antifúngica, efetuou-se um ensaio em triplicata. Para tal, primeiramente, prepararam-se placas de Petri de 15cm para o ensaio. Para a

preparação das placas, tomou-se 600µL de soluções de cada resina feitas em dimetilsulfóxido (DMSO - Calbiochem) a 500mg/mL. Cada uma das soluções foi incorporada sob agitação a 60mL (em recipientes distintos) de ágar batata dextrose (BDA) (Himedia) ainda fundido. Em seguida, 20mL de meio com cada tipo de “pool” foi vertido em cada uma de três placas. Concomitantemente, culturas de *Candida albicans* (ATCC 18804) foram cultivadas por 24h a 37°C. A partir desta cultura preparou-se em um tubo com 3000µL de salina 0,85% uma suspensão padrão com turbidez igual de uma solução de BaSO₄, equivalente a escala Mc Farland de 0,5, que representa 10⁶ UFC/mL de *C. albicans*. Então, diluiu-se a solução padrão em dez vezes, tomando-se 300µL desta e adicionando-se a 2700µL de salina. A nova solução foi diluída 1:10 da mesma forma como anteriormente, produzindo a solução de trabalho (10⁴ UFC/mL). A seguir, foi adicionado 100µL da solução de trabalho em cada uma das seis placas com resina incorporada ao meio. A solução foi espalhada pela superfície com auxílio de suab até a eliminação do excesso de líquido. Para servir como controles do nível de toxicidade do DMSO, foram preparadas três placas com 20mL de BDA a cada qual foi incorporada 2µL de DMSO. Estas três placas foram inoculadas como as placas contendo resina. Como controle de crescimento de *C. albicans*, foi preparada uma placa com 20mL de BDA a qual foi inoculada como as placas com resina. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após a incubação foi feita a contagem das colônias que cresceram. A avaliação do nível de atividade foi feita através da comparação entre as placas da quantidade de colônias que surgiram.

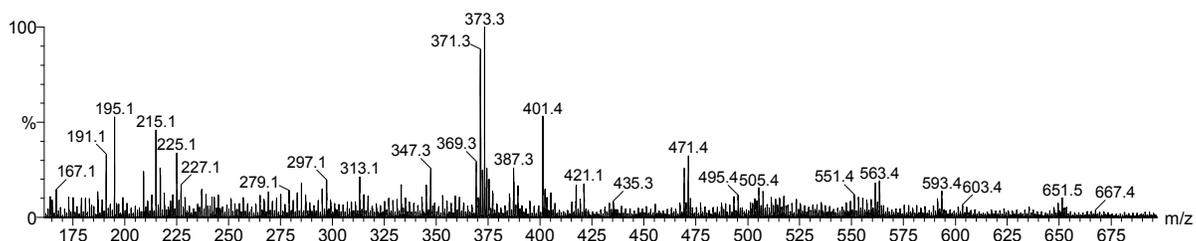
ANEXO 1 – “ESI(-)-MS FINGERPRINTS” DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona* sp. (BARRA DO CORDA, MA) E *Scaptotrigona* aff. *depilis* (ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DE LUIZ ANTÔNIO, SP)

Ss = *Scaptotrigona* sp.; Sd = *Scaptotrigona* aff. *depilis*

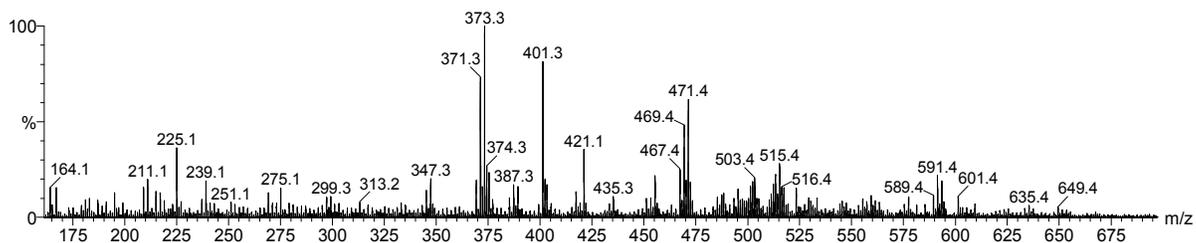
Ss05/06



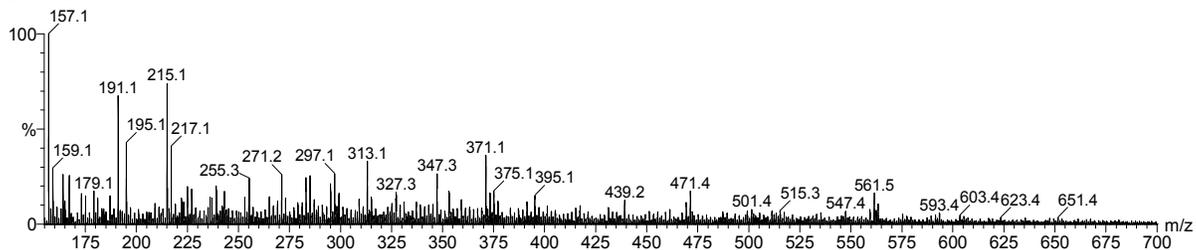
Ss06/06



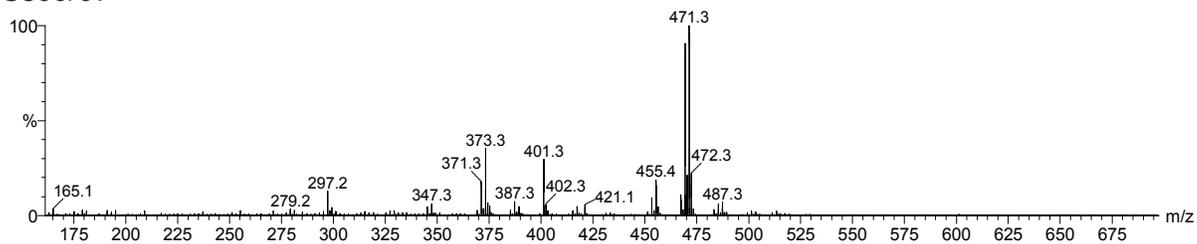
Ss07/06



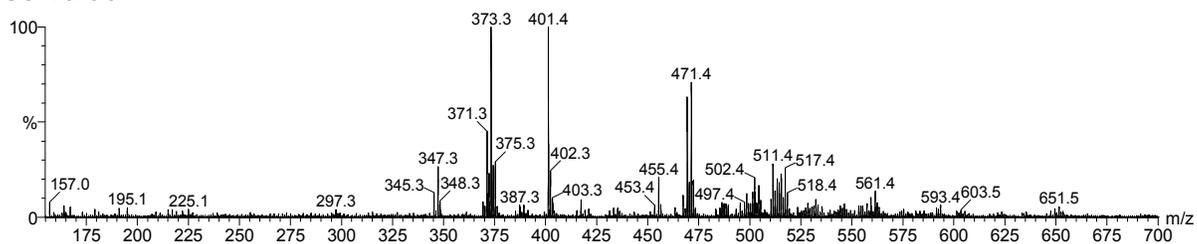
Ss 08/06



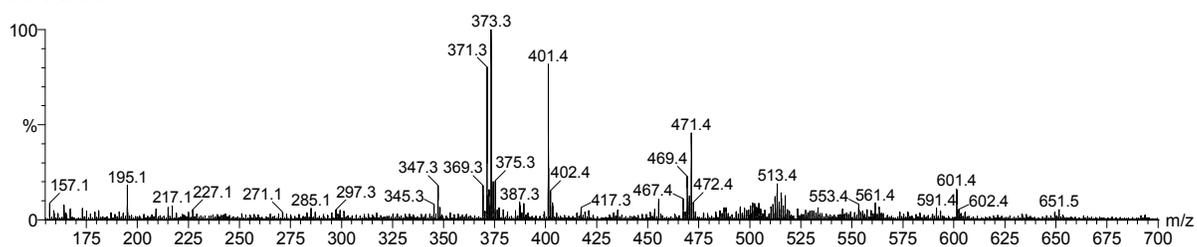
Ss09/07



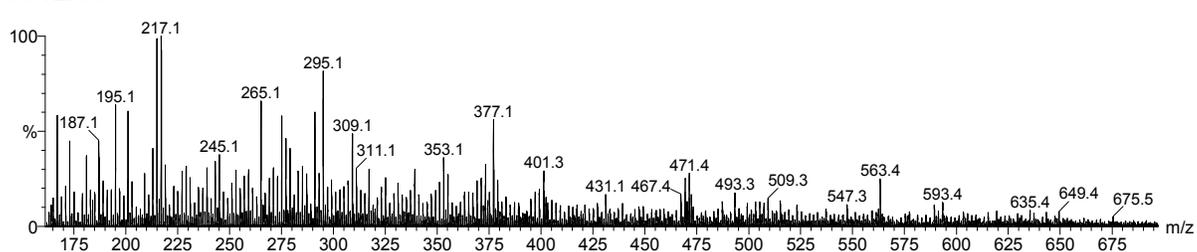
Ss 10/06



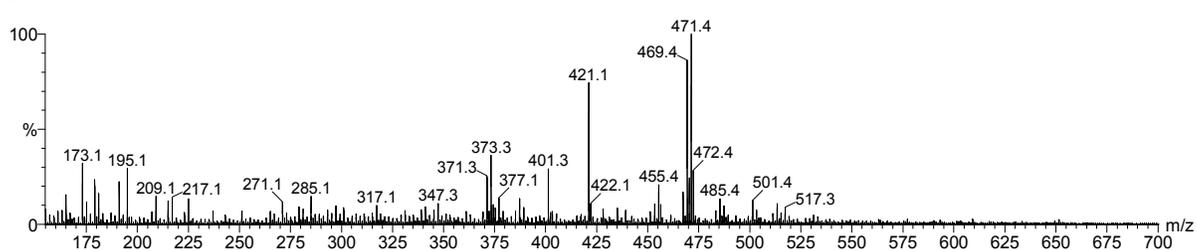
Ss11/06



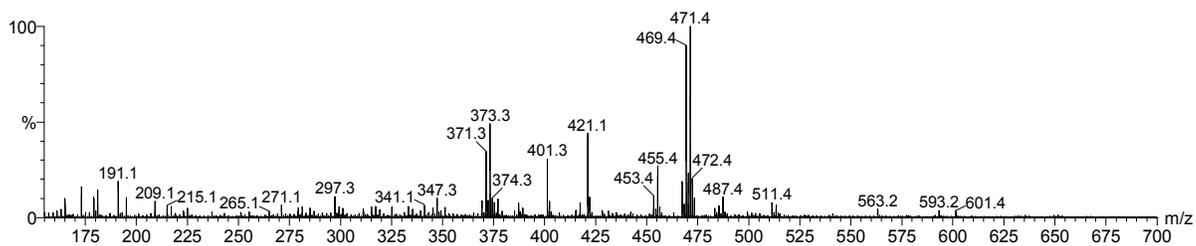
Ss12/06



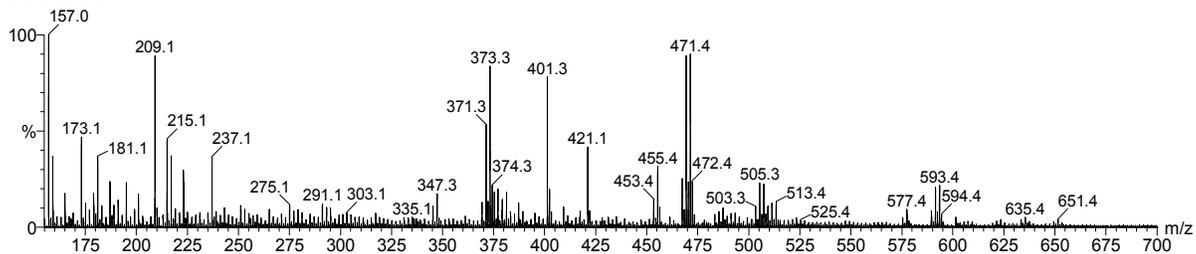
Ss01/07



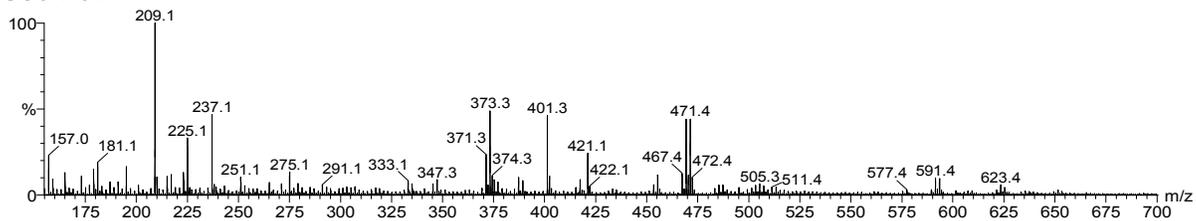
Ss02/07



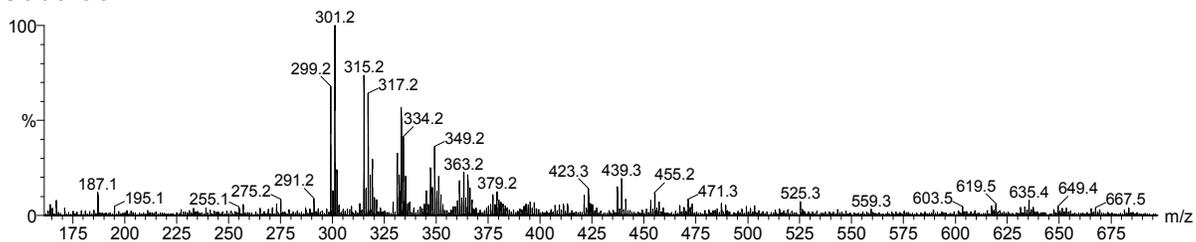
Ss03/07



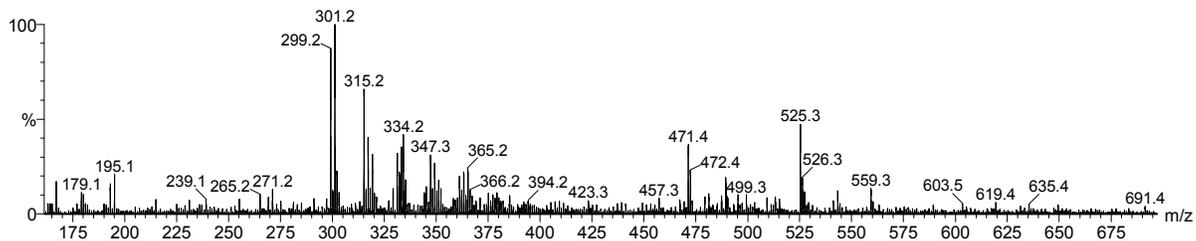
Ss04/07



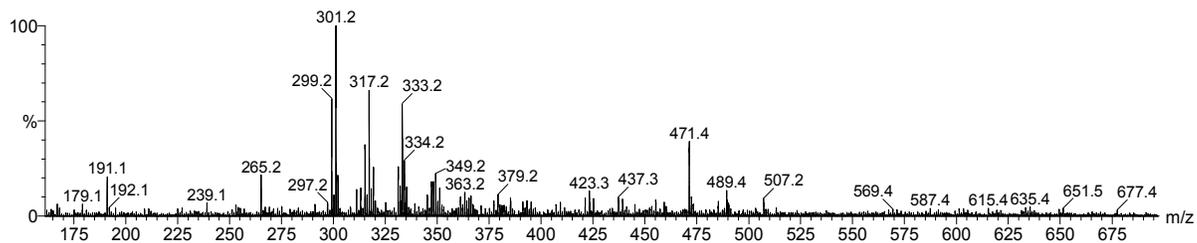
Sd09/06



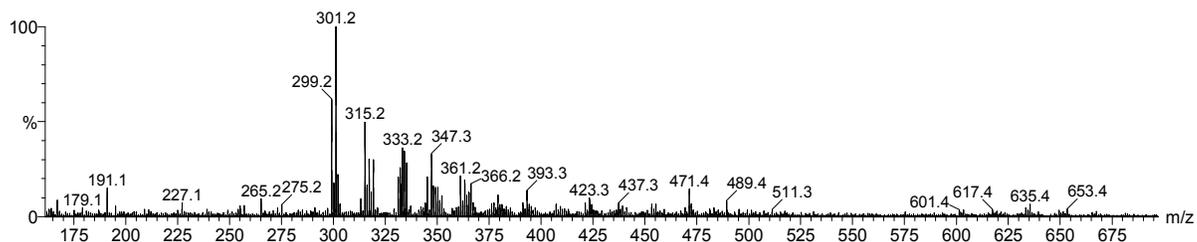
Sd10/06



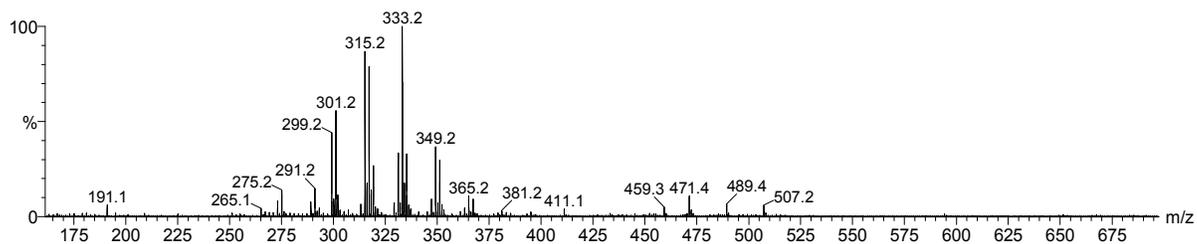
Sd11/06



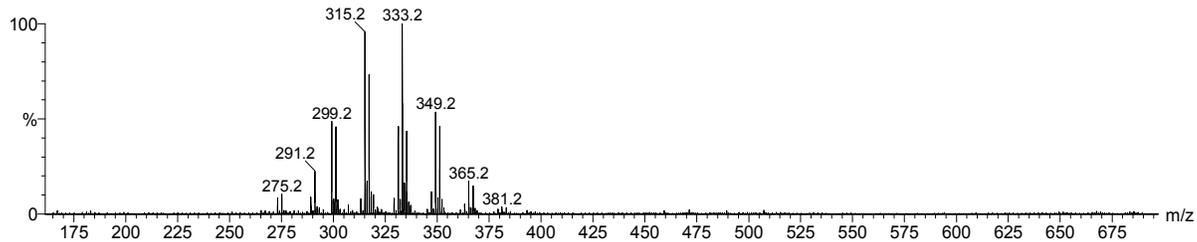
Sd12/06



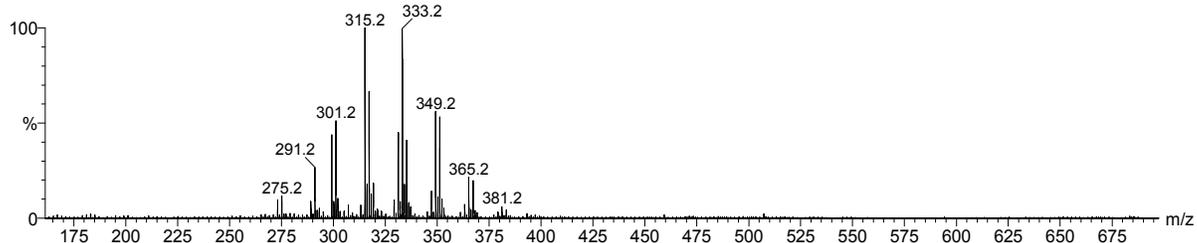
Sd01/07



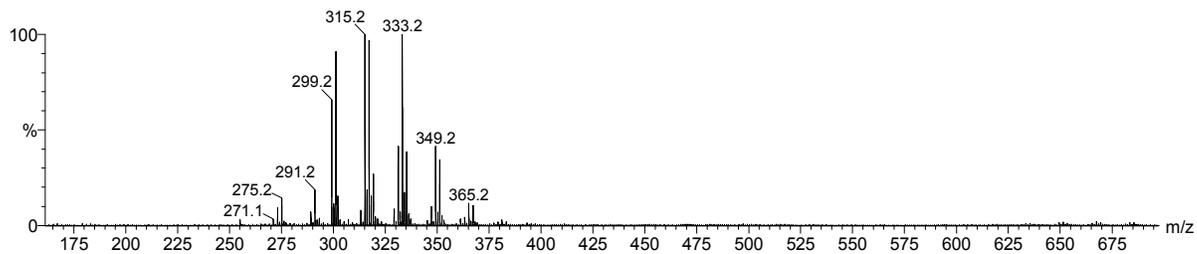
Sd02/07



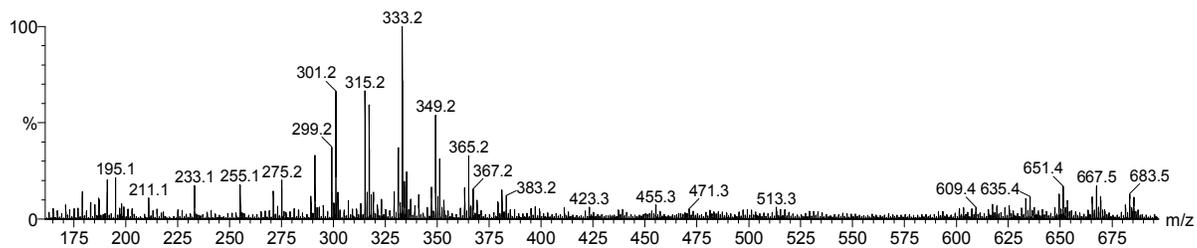
Sd03/07



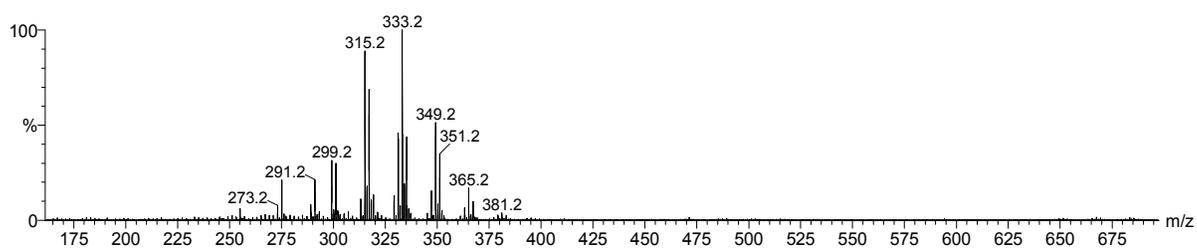
Sd04/07



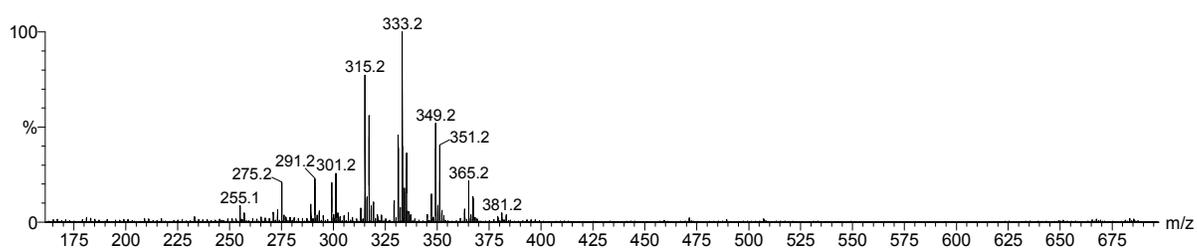
Sd05/07



Sd06/07



Sd07/07



Sd08/07

