

Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de melipona fasciculata Smith

/

Chemical approach and toxicity in zebrafish model of geipropolis of melipona fasciculata Smith

DOI:10.34119/bjhrv2n6-059

Recebimento dos originais: 27/10/2019

Aceitação para publicação: 05/12/2019

Josianne Rocha BarbozaPós-graduando (Doutoranda), Programa BIONORTE, Laboratório Farmacognosia I,
Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA - Brasil

E-mail: josi.anne.r@hotmail.com

Francisco Assis Nascimento PereiraGraduando (Farmácia), Laboratório Farmacognosia I, Departamento de Farmácia, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA - Brasil

E-mail: franciscopho2015@gmail.com

José Antônio Costa LeiteMestre em Ciências da Saúde, Laboratório Farmacognosia II, Departamento de Farmácia,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA - Brasil**Denise Fernandes Coutinho**Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Farmacognosia II,
Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA - Brasil

Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Doutora em Química Orgânica, Laboratório Farmacognosia I, Departamento de Farmácia,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus

Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil

E-mail: mnribeiro@ufma.br

RESUMO

Melipona fasciculata Smith, espécie nativa do Maranhão, é uma abelha sem ferrão que produz mel, cera e geoprópolis, que é constituído por material resinoso coletado das plantas, secreções salivares, cera e barro ou terra. A espécie é bastante cultivada no estado do Maranhão, principalmente nas regiões da Baixada e Cerrado, criada comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, que constituem a meliponicultura. Estudos demonstram que a geoprópolis possui atividades biológicas como antimicrobiana, leishmanicida, antioxidante, anti-helmíntica, antiproliferativa mostrando ser um produto natural promissor para novas pesquisas. Desta forma, o artigo tem como objetivo verificar o perfil químico dos extratos de geoprópolis de Melipona fasciculata Smith e investigar a toxicidade dos extratos frente ao modelo zebrafish. As amostras foram coletadas diretamente das colmeias dos meliponários no município de Pinheiro e Viana, no estado do Maranhão. Foram secas, separadamente, extraídas por maceração com álcool etílico 70% por 48 horas, obtendo as soluções extrativas, as quais foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo e liofilizadas, obtendo-se o EHGP e EHG. A composição química foi avaliada por abordagem fitoquímica, CCD e HPLC/UV-Vis e a toxicidade aguda dos extratos foram avaliados frente Danio rerio. A composição química por CLAE-UV-vis demonstrou a predominância de compostos de baixa polaridade nos tempos de retenção a partir de 40 min. A CCD revelou a presença de saponinas, terpenos e esteroides. Os dois extratos apresentaram baixa toxicidade, sendo o EHGP com menor toxicidade (1222,38 µg/mL) quando comparado ao EHG (476,39 µg/mL). Portanto, os dados sobre toxicidade abrem perspectiva para uma futura exploração biotecnológica, sendo a geoprópolis um produto natural promissor na busca de moléculas bioativas com potencial terapêutico.

Palavras-chave: Melipona fasciculata. Geoprópolis. Toxicidade.

ABSTRACT

Melipona fasciculata Smith, native to Maranhão, is a stingless bee that produces honey, wax and geopropolis, which is made up of resinous material collected from plants, salivary secretions, wax and clay or earth. One species is widely cultivated in the state of Maranhão, mainly in the Baixada and Cerrado regions, commercially created in groups of colonies, called meliponários, that produce a meliponicultura. Studies show that a geopropolis has biological activities such as antimicrobial, leishmanicidal, antioxidant, anthelmintic, antiproliferative, showing to be a promising natural product for further research. Thus, the article aims to verify the chemical profile of the geographic extracts of the Melipona fasciculata Smith and to investigate the toxicity of the extracts against the zebrafish model. As samples collected directly from meliponary hives in the municipality of Pinheiro and Viana, in the state of Maranhão. They were dried, selected, extracted by maceration with 70% ethyl alcohol for 48 hours, obtaining as extractive solutions, which were filtered and concentrated in the rotary and lyophilized evaporator, obtaining the EHGP and EHG. The chemical composition was

evaluated by phytochemical approach, CCD and HPLC / UV-Vis and the acute toxicity of the extracts were caused by the front of the radius. A HPLC-UV-Vis chemical composition demonstrated a predominance of low polarity compounds in retention times from 40 min. A CCD revealed a presence of saponins, terpenes and steroids. Both extracts showed low toxicity, being EHGP with lower toxicity ($1222.38\mu\text{g} / \text{mL}$) when compared to EHG (476.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Therefore, toxicity data open a perspective for future biotechnological exploration, being a geopropolis a promising natural product in the search for bioactive molecules with therapeutic potential.

Keywords: *Melipona fasciculata*. Geopropolis. Toxicity

1 INTRODUÇÃO

A meliponicultura, criação de abelhas sem ferrão, é uma prática bastante antiga, desenvolvida há muitos séculos, cujos relatos dessa atividade remonta aos primórdios das civilizações antigas, no Egito Antigo (PALAZUELOS BALLIVIAN, 2008). Ainda hoje no Brasil, esta prática ainda é muito comum, sendo especialmente mantida por povos indígenas, mas também por comunidades tradicionais e camponesas, em diversas regiões do Brasil (ALVES et al., 2007).

No estado do Maranhão, a espécie *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) já vem sendo cultivada há séculos pela população indígena, para produção de mel. Atualmente são criadas comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, que constituem a meliponicultura (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A espécie *Melipona fasciculata* Smith coleta material resinoso das plantas e traz para sua colmeia, mistura com cera e barro ou terra formando a geoprópolis, a qual utiliza para fechar pequenas frestas, na defesa contra invasores e vedar entradas de ventilação excessiva (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* é composta por algumas classes de compostos químicos, como ácidos graxos, álcoois, ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, açúcares, triterpenos, esteroides, etc (DUTRA, 2012; ARAÚJO, 2013; BATISTA et al., 2016). Na espécie são relatadas algumas atividades biológicas: antioxidante, antileishmanicida, anti-helmíntica, antimicrobiana e antitumoral (DUTRA, 2012; ARAÚJO, 2013; BATISTA, 2016; CUNHA, 2017).

O estudo da toxicidade de geoprópolis predomina com estudos de citotoxicidade *in vitro* em células tumorais e normais (DA CUNHA et al., 2013; CUNHA, 2017; SANTOS et al., 2017). Nos últimos anos, o zebrafish, conhecido como paulistinha ou peixe-zebra (*Danio rerio*) vem atraindo a atenção da comunidade científica, por ser excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas

doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos. Tem as seguintes vantagens: são peixes de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e apresentam importante homologia com os mamíferos (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Sendo assim, o presente artigo tem como objetivo avaliar o perfil químico e investigar a toxicidade dos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, oriundo do município de Pinheiro e Viana, Maranhão, frente ao modelo zebrafish.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DA AMOSTRA DE GEOPRÓPOLIS

Duas amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foram coletadas diretamente da colmeia do meliponário do município de Viana e Pinheiro, na região da Baixada maranhense, Maranhão. As amostras foram acondicionadas em sacos coletores estéreis e mantidas sob refrigeração até a utilização no Laboratório de Farmacognosia I da Universidade Federal do Maranhão, Campus Dom Delgado, em São Luís – MA.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA GEOPRÓPOLIS

As amostras de geoprópolis foram trituradas em moinho de facas e submetidas à maceração exaustiva com etanol 70% (v/v), hidromódulo 1:5 (p/v), filtradas, concentradas em evaporador rotativo e liofilizadas, obtendo-se o extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro (EHGP) e o extrato hidroetanólico de geoprópolis de Viana (EHGV) (CUNHA, 2009).

2.3 PERFIL QUÍMICO

2.3.1 Abordagem química

O extrato foi submetido à abordagem química para verificação de compostos das classes dos compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides. A mudança de coloração, formação de precipitado e/ou formação de espuma foram usados para expressar os resultados das análises fitoquímicas (MATOS, 2009).

2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta (CLAE/UV-Vis)

A análise por CLAE/UV-Vis foi realizada num cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Autosampler (Thermo) (San Jose, CA, EUA), equipado com um injetor com loop de 25µL, e um detector de UV-Vis. A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6mm, 5µm, Hypersil BDS) fornecido por Thermo Electron Corporation (Waltham, MA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3mm, 5µ, Gemini, Phenomenex). A separação dos compostos dos extratos da geoprópolis foram

realizadas à temperatura ambiente com um programa de gradiente de eluição a uma taxa de fluxo de 1,0mL/min. As fases móveis utilizadas foram água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B) com gradiente de 0-1 min, 5% B; 1-60 min, 5-30% B; 60-90 min, 30-100% B. As amostras antes de serem injetadas no CLAE foram diluídas em metanol e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico e filtradas em filtro de seringa de Nylon (0,22 µm, Allcrom). O volume da amostra injetado foi de 25µL e detecção foi realizada em 280nm.

2.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (EHGV e EHGP) foram submetidos à cromatografia em camada delgada, utilizando placas de sílica gel 60F254+366 (Merck), usando como fase móvel diclorometano e metanol (8:2). A revelação da cromatoplaça foi realizada através da borrifação de uma solução de p-anisaldeído sulfúrico. Esta foi preparada segundo a metodologia de WAGNER & BLADT (1996). Preparou-se uma solução contendo anisaldeído 5% (v/v) em ácido acético glacial e adicionou-se a esta solução 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

2.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Os extratos foram submetidos à avaliação de toxicidade frente a peixes *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), uma espécie tropical, ovípara, onívora, de comprimento variando entre 4 e 5 centímetros vulgarmente conhecida como paulistinha ou zebrafish, usado como indicador de ecotoxicidade. O ensaio de toxicidade foi realizado por método estático, sem reposição de água, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15088, 2011), utilizando peixes adultos (3,0 a 4,0 cm). Grupos de quatro organismos foram colocados em mini-aquários (1,5L) contendo água, obedecendo a proporção de 1 grama de peixe para um litro de solução-teste. Posteriormente calculou-se as CL₅₀ para os peixes. O experimento teve duração de 48h, sendo que a cada 24h foi verificado o número de animais mortos e aferidas variáveis tais como pH, oxigênio dissolvido e temperatura. O controle negativo foi a água desclorada. Esse ensaio foi desenvolvido conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal do Maranhão.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

As concentrações letais (50%) de cada extrato foram obtidas por análise de regressão linear modelo probit (software SPSS®, versão 13.0), assumindo nível de confiança 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a caracterização do perfil químico foi realizado o ensaio fitoquímico apresentando como resultado para os extratos EHGv e EHGP a presença de taninos condensados, saponinas e esteroides (Tabela 1). Nossos resultados corroboram com os dados publicados por Cunha et al., 2009 e Cunha, 2017.

Tabela 1. Avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

	EHGV	EHGP
Fenois	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensáveis, Antocianinas, Antocianinas	++	-
Flavonas, Flavononas, Xantonas	-	-
Flavononois	-	-
Saponinas	+	++
Alcalóides	-	-
Esteroides	+	+
Triterpenos	++	+

* Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata nos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, sendo EHGv, extrato hidroetanólico de geoprópolis de Viana; EHGP, extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro. Critérios quanto ao grau de intensidade dos constituintes analisados: (+++) resultado fortemente positivo, (++) resultado moderadamente positivo, (+) resultado fracamente positivo e (-) resultado negativo.

Também foi possível verificar o perfil fitoquímico das amostras a partir da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das amostras de EHGv e EHGP (Figura 1). Desta forma, as amostras apresentaram bandas de coloração lilás, após aplicação do revelador químico anisaldeído sulfúrico que quando em contato com as substâncias da amostra, as tornam coloridas e visíveis. O anisaldeído sulfúrico revelou a presença das classes saponinas, terpenos e esteroides através das manchas observadas em lilás. Substâncias triterpênicas têm sido detectadas em própolis tropicais de *Apis mellifera* e geoprópolis (DUTRA et al., 2012; DUTRA et al., 2014). No cromatograma foi observada também presença de compostos majoritários nas amostras de EHGv e EHGP e similaridade do perfil cromatográfico entre as amostras.



Figura 1. Cromatograma obtido por CCD de amostras de extratos hidroetanólicos de geopropolis, analisadas após aplicação do revelador químico anisaldeído sulfúrico. 1 = EHGv; 2 = EHGP.

O perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV comprovou a predominância de compostos apolares nos tempos de retenção a partir de $T_r \cong 40$ min presente nos extratos EHGv (Figura 2) e EHGP (Figura 3). Também foi possível observar que os extratos embora tenham sido coletados de municípios diferentes (Viana e Pinheiro), por ambos os municípios estarem localizados na região da baixada maranhense, os extratos apresentam perfil cromatográficos semelhantes (Figura 4).

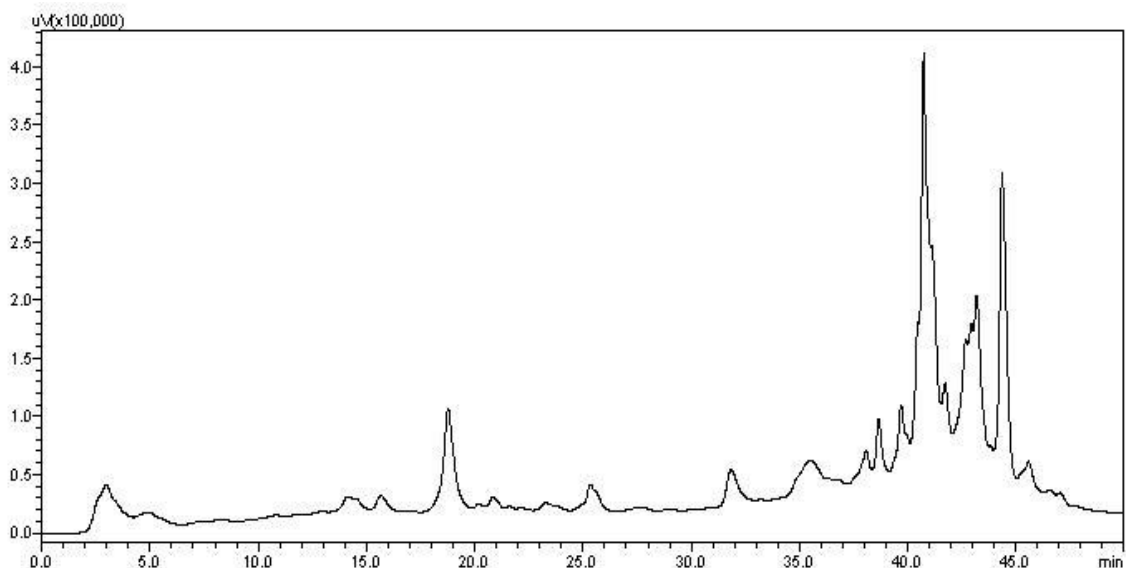


Figura 2. Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGv.

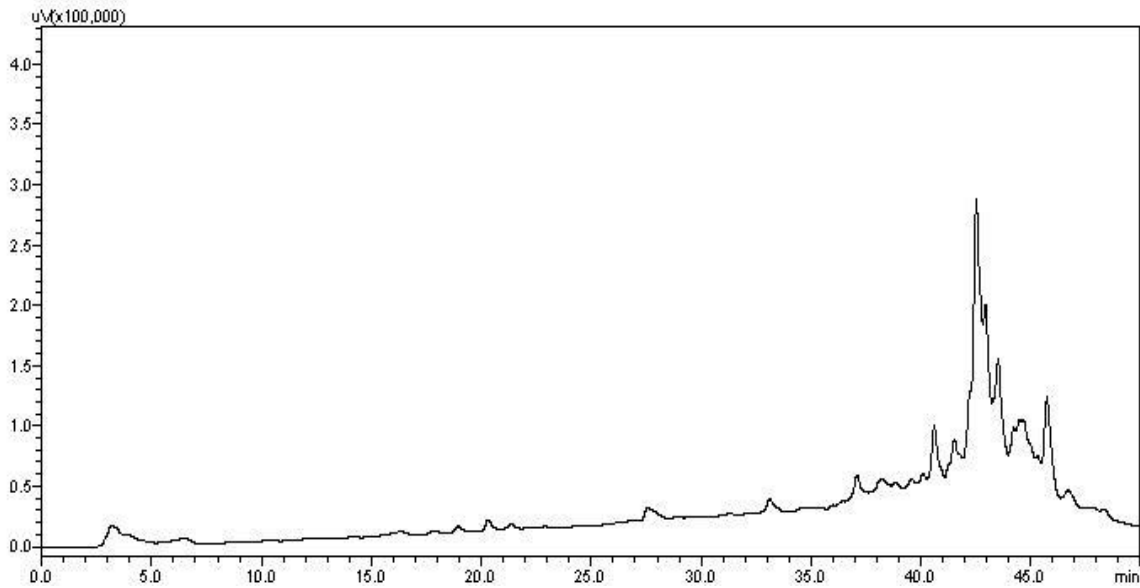


Figura 3. Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGP.

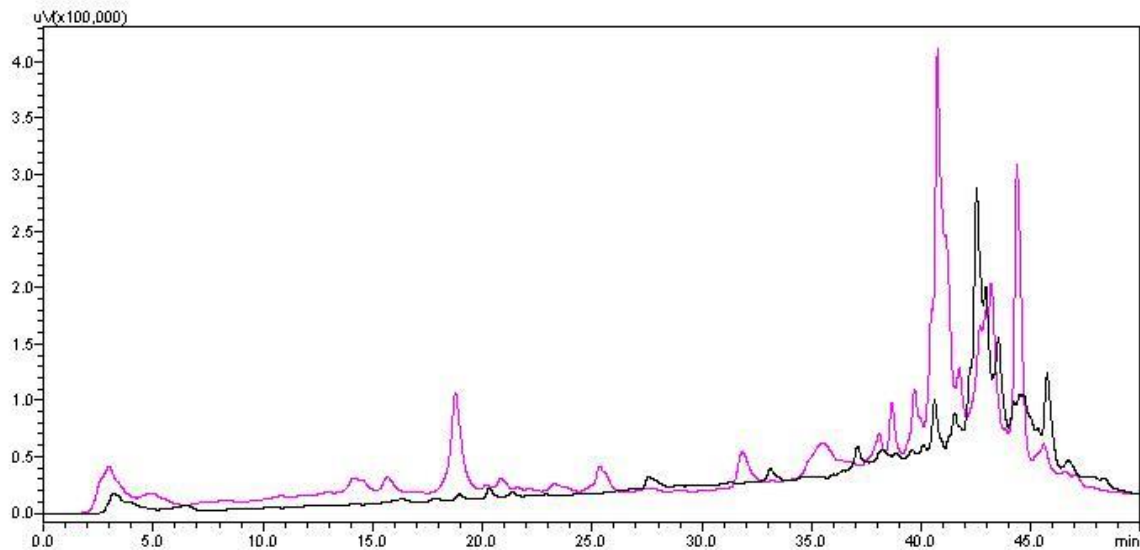


Figura 4. Sobreposição dos Cromatogramas obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHG (cor lilás) e EHGP (cor preta).

Pesquisas do grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFMA vêm demonstrando, que a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de diferentes localidades do estado do Maranhão apresenta composição química com presença de compostos polifenólicos:

ácidos fenólicos, flavonoides (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2012; BATISTA, 2011); taninos hidrolizáveis (DUTRA et al., 2014), triterpenos, esteroides e saponinas (BATISTA et al, 2016; ARAUJO et al, 2015; CUNHA, 2017), ácidos graxos, (CUNHA, 2013; SILVA et al., 2013, BATISTA et al, 2016) e benzofenonas (CUNHA, 2017) . Desta forma, nossos resultados do perfil químico demonstrados a partir da CCD e HPLC dos extratos EHGP e EHGTV no qual apresentam a predominância de compostos apolares e as classes saponinas, terpenos e esteroides corroboram com os dados da literatura.

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado através da exposição dos extratos em *Danio rerio* (Tabela 2). Os resultados mostram que o EHGP apresentou menor toxicidade (1222,38 μ g/mL) quando comparado ao EHGTV (476,39 μ g/mL).

Tabela 2. Ensaio de toxicidade dos extratos frente *Danio rerio*.

Amostra	Toxicidade aguda em <i>Danio rerio</i>	
	CL ₅₀ (μ g/mL)	
EHGP	1222,38*	
EHGTV	476,39*	

* Concentrações letais obtidas após 48 horas de exposição aos extratos.

Não há relatos na literatura da avaliação da toxicidade aguda de geoprópolis em modelo zebrafish. SILVA, MUNIZ & NUNOMURA (2013) estudaram a toxicidade de extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* em *Artemia salina* que apresentou valor médio da CL₅₀ de 1282,61 μ g/mL.

O zebrafish é um pequeno teleóstéo usado como organismo modelo em diversas áreas das ciências. Por apresentar bases moleculares da neurobiologia e o genoma similar ao dos humanos proporcionam o seu uso em diversos tipos de estudos, que incluem toxicológicos, genéticos e patológicos (BARBAZUK et al., 2000).

O crescimento no número de artigos publicados usando o zebrafish está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. O sequenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Senger em 2001, possibilitou o uso em diversos estudos genéticos (STERN; ZON 2003). Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

4 CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de Pinheiro e Viana, do Estado do Maranhão apresentaram composição química de baixa polaridade. Além disso, os dois extratos apresentaram baixa toxicidade. Sendo assim, são necessários mais estudos químicos para entender a bioatividade dos extratos e os dados sobre toxicidade abre perspectiva para uma futura exploração biotecnológica.

Os resultados obtidos permitem obter parâmetros de controle qualidade para o geoprópolis e seus derivados da Baixada maranhense. Considerando que a região é uma grande produtora de mel, produto base do negócio apícola e meliponícula, o conhecimento do perfil de qualidade agrega valores a mais um produto deste setor, contribuindo para o desenvolvimento do agronegócio no estado do Maranhão.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMA pelo suporte financeiro para realização do trabalho e pela bolsa de doutorado de Josianne Rocha Barboza. Ao CNPq pela bolsa de IC de Francisco Assis Nascimento Pereira.

REFERÊNCIAS

ABNT. Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2011. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011.

ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; SODRE, G. S.; FONSECA, A. A. O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. *Mensagem Doce*. 91: 2-8, 2007.

ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; AZEVEDO, C. C.; NOGUEIRA, A.M. C.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. *Revista de Ciências da Saúde*, 8, 1, 18-24, 2006.

ARAÚJO, M. J. A. M. Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith: ações citotóxicas, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-

Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu/SP, 2013.

ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; FERNANDES JR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *Journal of Molecular Pathophysiology*, v. 4, p.12-20, 2015.

BARBAZUK, W.B., KORF, I., KADAVI, C., HEYEN, J., TATE, S., WUN, E., BEDELL, J.A., MCPHERSON, J.D., JOHNSON, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351-1358, 2000.

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

BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B; DUTRA, R. P; CUNHA, M.S; AMARAL, F.M.M; TORRES, L.M.B; RIBEIRO, M.N.S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. *Acta Amazônica*. v.46(3), p. 315– 322, 2016.

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

CUNHA, M. S. Composição química e atividade antitumoral de *Melipona fasciculata* Smith. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. São Luís. 2017.

DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. DE C.; DE RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN,

P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. BMC Complementary and Alternative Medicine, v.13, p.1-9, 2013.

DUTRA, R. P. Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. Journal Agriculture Food Chemical. 26;62(12):2549-57, 2014.

KARI, G.; RODECK, U; DICKER, A.P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v.82, n.1, 2007.

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

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nature Reviews-Genetics, v.8, n.5, 2007.

MATOS, F.J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). São Paulo: Nogueirapes, 1997.

PALAZUELOS BALLIVIAN, J. M. P. Abelhas nativas sem ferrão – Mÿg. São Leopoldo, Oikos, 2008.

SANTOS, C. M., CAMPOS, J. F., SANTOS, H. F., BALESTIERI, J. B. P., SILVA, D. B., PICOLI SOUZA, K., CAROLLO, C. A., ESTEVINHO, L. M., & SANTOS, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata* anthidioides. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017.

SILVA, E.C.C; MUNIZ, M.P; NUNOMURA, R.C.S. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quim. Nova*, v.36, n.5, p.628-633, 2013.

STERN, H.M. & ZON, L.I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer* 3, 1-7, 2003.